

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Natália Baltazar do Nascimento

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS, COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR**

Porto Alegre

2022

Natália Baltazar do Nascimento

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS, COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Jade de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Daiane Fátima Engel

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Baltazar do Nascimento, Natália
AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS, COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR / Natália Baltazar do
Nascimento. -- 2022.

70 f.

Orientadora: Jade de Oliveira.

Coorientador: Daiane Fátima Engel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Hipercolesterolemia familiar. 2. Camundongos
LDLr-/- . 3. Prejuízos cognitivos. 4. Metformina. 5.
Astrócitos. I. de Oliveira, Jade, orient. II. Fátima
Engel, Daiane, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais e minha irmã pelo apoio incondicional. Sem suas palavras de incentivo eu não teria achado coragem para perseguir este objetivo. Nunca esquecerei dos sacrifícios que tivemos que fazer juntos para que eu pudesse chegar aqui.

Sou imensamente grata à minha orientadora, Prof. Dra. Jade de Oliveira, por ter me dado a oportunidade de aperfeiçoar minha carreira científica sob sua mentoria. A sua diligência e rigorosidade foram imprescindíveis para mim, e esses são valores que eu adoto para a minha conduta profissional.

Não existem meios suficientes para que eu agradeça integralmente pelo apoio que recebi dos meus colegas do laboratório 21. Agradeço ao Matheus por ter me recebido na porta do departamento de bioquímica no meu primeiro dia e por ter me ensinado em tempo recorde várias das técnicas que eu tive que dominar para realizar este trabalho. Agradeço a Hémelin por todo o seu auxílio. A sua inteligência, proatividade, sinceridade e companheirismo causaram uma mudança na minha vida que eu duvido ser capaz de retribuir. Agradeço muitíssimo a Arieli, Jéssica, Lílian, Gabriela e Sâmili por todos os momentos dentro e fora do laboratório. Vocês, minhas meninas do laboratório 21, foram meu suporte neste percurso, e eu guardarei para sempre nossas amizades.

Não poderia deixar de agradecer ao corpo técnico, docentes e demais servidores do departamento de Bioquímica, bem como dos departamentos associados que forneceram os meios para que grande parte das análises pudessem ser realizadas.

Por fim, agradeço ao CNPq pela bolsa de mestrado e às agências de fomento que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

“[...] É sempre a mesma coisa: quer seja na alegria ou na tristeza,

O caminho da partida ainda está livre:

O homem de ontem nunca pode ser o mesmo do dia seguinte;

Nada perdura, apenas a mutabilidade!”

Percy Bysshe Shelley

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	27
4.2 TRATAMENTO.....	27
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	28
4.4.1 Campo aberto.....	28
4.4.2 Reconhecimento de objetos.....	29
4.4.3 Realocação de objetos.....	29
4.4.4 Suspensão pela cauda	30
4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	30
4.5.1 Parâmetros metabólicos	30
4.5.2 Imunofluorescência	30
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5 RESULTADOS	32
5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS ASSOCIADAS À HF.....	32
5.2 TRATAMENTO COM METFORMINA ATENUOU OS PREJUÍZOS COGNITIVOS EM CAMUNDONGOS LDLR-/-	33
5.3 TRATAMENTO COM METFORMINA DIMINUI ASTROGLIOSE HIPOCAMPAL CAUSADA PELA HF EM CAMUNDONGOS LDLR-/-	36
5.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE A DENSIDADE MICROGLIAL	41
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO.....	54

8 PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA	70

PARTE I

RESUMO

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença prevalente que nos últimos anos vem sendo fortemente associada a alterações cerebrais características de doenças neurodegenerativas. A HF é causada por mutações no gene que codifica o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLr), a principal carreadora de colesterol periférico. Estudos com camundongos nocautes para o LDLr (LDLr^{-/-}) apontaram que a neuroinflamação e disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) são eventos importantes no distúrbio cerebral associado à HF. Nesse sentido, foi demonstrado em camundongos LDLr^{-/-} que a inibição da mTOR pode atenuar a quebra da BHE. Dessa forma, nesta dissertação nós hipotetizamos que a exposição dos animais modelos experimentais de HF à metformina, um fármaco que potencialmente modula a sinalização da mTOR via AMPK, poderia atenuar as alterações cerebrais causadas pela HF. Camundongos LDLr^{-/-} e selvagens (WT) machos adultos receberam metformina (200 mg/Kg) ou salina diariamente por 30 dias. Todos os animais foram pesados semanalmente. Na última semana de tratamento, foram realizados o teste de campo aberto para avaliação da atividade locomotora e exploratória, os testes de reconhecimento e realocação de objetos para avaliação da memória e o teste de suspensão pela cauda para avaliação do fenótipo depressivo. Uma coorte de animais foi eutanasiada por exsanguinação via punção cardíaca ao fim do tratamento. Na sequência, o plasma heparinizado foi usado para dosagem de colesterol total e triglicérides. Outra coorte de animais foi perfundida com paraformaldeído para a coleta de cérebros fixados. O colesterol total dos camundongos LDLr^{-/-} se mostrou aumentado em relação aos grupos WT. O tratamento com metformina aumentou os triglicérides e diminuiu o peso corporal nos camundongos LDLr^{-/-} em comparação com os animais administrados com salina. Os camundongos LDLr^{-/-} mostraram atividade hiperlocomotora, danos cognitivos e um fenótipo depressivo, o que foi parcialmente atenuado pela metformina. Não se observou diferença significativa entre os grupos com relação à imunorreatividade microglial no córtex pré-frontal ou hipocampo, mas a metformina pareceu melhorar a astrogliose no hipocampo de camundongos LDLr^{-/-}. No geral, o tratamento com metformina mostrou efeito promissor contra o dano de memória e a reatividade astrogliosa observados em camundongos LDLr^{-/-}, independentemente da redução do colesterol plasmático.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia familiar; Camundongos LDLr^{-/-}; Prejuízos cognitivos; Metformina; Astrócitos.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia (FH) is a prevalent disease that has been strongly associated with brain alterations characteristic of neurodegenerative diseases in recent years. FH is caused by mutations in the gene that encodes the low-density lipoprotein receptor (LDLr), the main carrier of peripheral cholesterol. Studies with LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}) showed that neuroinflammation and blood-brain barrier (BBB) breakdown are important events in FH-related brain dysfunction. In this sense, it was demonstrated in LDLr^{-/-} mice that mTOR inhibition can attenuate BBB disruption. Thus, in this dissertation, we hypothesized that exposure of experimental FH animal models to metformin, a drug that potentially modulates mTOR signaling via AMPK, could attenuate the brain alterations caused by FH. LDLr^{-/-} and wild-type (WT) male adult mice received a daily oral administration of metformin (200 mg/Kg) or saline for 30 days. All animals were weighed weekly. In the last week of treatment, mice performed the open field test to evaluate locomotor and exploratory activity, the novel object recognition, the object reallocation task for evaluation of memory, and the tail suspension test to evaluate a depressed phenotype. A cohort of animals was euthanized by exsanguination via cardiac puncture at the end of the treatment protocol. Heparinized plasma was used to determine total cholesterol and triglyceride levels. Another cohort of animals was perfused with paraformaldehyde to collect fixed total brains. Total cholesterol levels of the LDLr^{-/-} mice were significantly higher than the WT groups. Metformin treatment increased triglyceride levels and decreased total body weight in LDLr^{-/-} mice in comparison to saline administration. LDLr^{-/-} mice showed hyperlocomotive activity, cognitive damage, and a depressed phenotype, which was in parts attenuated by metformin treatment. We did not observe significant differences between groups regarding microglia immunoreactivity in the pre-frontal cortex or hippocampus of the animals, but metformin treatment seemed to ameliorate astrogliosis in the hippocampus of LDLr^{-/-} mice. Overall, metformin treatment showed a promising effect on the memory impairment and astrocyte reactivity observed in LDLr^{-/-} mice, which was not via a cholesterol-lowering outcome.

Keywords: Familial hypercholesterolemia; LDLr^{-/-} mice; Cognitive impairment; Metformin; Astrocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Estrutura química da molécula de colesterol e de alguns de seus derivados.....	15
Figura 2 — Transporte plasmático de lipídeos	16
Figura 3 — Metabolismo de colesterol em astrócitos e neurônios	18
Figura 4 — Mecanismos de ação da metformina	22
Figura 5 — Desenho experimental	28
Figura 6 — Efeitos do tratamento com metformina no colesterol plasmático, triglicerídeos e peso corporal	33
Figura 7 — Efeitos do tratamento com metformina na atividade locomotora e exploratória, memórias dependentes de hipocampo e fenótipo depressivo.....	35
Figura 8 — Imunorreatividade de GFAP no córtex pré-frontal.....	37
Figura 9 — Imunorreatividade de GFAP na região CA3 do hipocampo.....	38
Figura 10 — Imunorreatividade de GFAP na região CA1 do hipocampo.....	39
Figura 11 — Imunorreatividade de GFAP na região giro denteado do hipocampo	40
Figura 12 — Imunorreatividade de IBA-1 no córtex pré-frontal.....	42
Figura 13 — Imunorreatividade de IBA-1 na região CA3 do hipocampo.....	43
Figura 14 — Imunorreatividade de IBA-1 na região CA1 do hipocampo.....	44
Figura 15 — Imunorreatividade de IBA-1 na região giro denteado do hipocampo	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACAT — Acil-CoA colesterol aciltransferase
- ACC — Acetil-CoA carboxilase
- AMPK — Proteína cinase ativada por AMP (do inglês, *AMP-activated protein kinase*)
- ANOVA — Análise de Variância (do inglês, *Analysis of Variance*)
- Apo — Apolipoproteína
- BHE — Barreira hematoencefálica
- CEUA — Comitê de Ética no Uso de Animais
- DA — Doença de Alzheimer
- EPM — Erro Padrão da Média
- GFAP — Proteína Ácida Fibrilar Glial (do inglês, *Glial Fibrillary Acidic Protein*)
- HDL — Lipoproteína de alta densidade (do inglês, *High-density Lipoprotein*)
- HF — Hipercolesterolemia Familiar
- HMG-CoA — 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
- IBA-1 — Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (do inglês, *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*)
- IRS-2 — Substrato 2 do Receptor de Insulina (do inglês, *insulin-receptor substrate-2*)
- LDL — Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density Lipoprotein*)
- LDLr — Receptor da lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density Lipoprotein Receptor*)
- LDLr^{-/-} — Nocaute para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density Lipoprotein Receptor Knockout*)
- LKB-1 — Cinase B1 do fígado (do inglês, *Liver Kinase B1*)
- LPL — Lipase Lipoproteica
- LXR — Receptor X do fígado (do inglês, *Liver X Receptor*)
- mTOR — Alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês, *Mammalian Target of Rapamycin*)
- mTORC1 — Complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês, *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*)
- mTORC2 — Complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês, *Mammalian Target of Rapamycin Complex 2*)
- NF- κ B — Fator nuclear *kappa* B (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*)
- PBS — Solução fosfato-salina (do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*)

RAPTOR — Proteína regulatória associada de mTOR (do inglês, *Regulatory-associated Protein of mTOR*)

SNC — Sistema Nervoso Central

TSC1 — Complexo 1 da esclerose tuberosa (do inglês, *Tuberous Sclerosis Complex 1*)

TSC2 — Complexo 2 da esclerose tuberosa (do inglês, *Tuberous Sclerosis Complex 2*)

UFRGS — Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VLDL — Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês, *Very-low-density Lipoprotein*)

WT — Selvagem (do inglês, *wild-type*)

1 INTRODUÇÃO

O colesterol foi isolado pela primeira vez por Poulletier de la Salle em 1769, na bile e em cálculos biliares, mas somente no século XIX este lipídio foi descrito estar presente na corrente sanguínea (OLSON, 1998). Desde então, diversas funções essenciais para o funcionamento das células e do organismo foram atribuídas ao colesterol e seus derivados: estrutura e funcionamento da membrana celular, digestão e absorção de lipídios intestinais, participação em vias de sinalização celular, resposta ao estresse, modulação da atividade reprodutiva, morfogênese, além de outras (CORTES *et al.*, 2014; TABAS, 2002). Vale citar que o colesterol é precursor de uma série de moléculas bioativas, tais como os hormônios esteroidais: colecalciferol, progesterona, testosterona, estradiol, aldosterona e cortisol (TABAS, 2002).

A molécula de colesterol pode ser dividida em um domínio hidrofílico proximal contendo um radical hidroxila, um domínio hidrofóbico distal formado por uma cadeia de hidrocarbonetos e um núcleo esteroide com quatro anéis que conferem rigidez à sua estrutura (SCHADE; SHEY; EATON, 2020). As estruturas do colesterol e alguns de seus derivados estão apresentados na figura 1. Este lipídeo pode ser proveniente da dieta ou da síntese endógena, sendo amplamente distribuído aos tecidos devido a sua vasta importância (CORTES *et al.*, 2014; TABAS, 2002). Em condições normais, estima-se que aproximadamente 60% do colesterol presente no organismo seja sintetizado endogenamente, enquanto os outros 40% são provenientes da dieta (LEONI; CACCIA, 2013). Dessa forma, os níveis de colesterol são definidos pela interação entre a síntese de novo a partir de acetil-CoA, a sua absorção por meio dos enterócitos, pelo seu armazenamento na forma esterificada em gotas lipídicas citoplasmáticas e pela sua exportação e transporte por carreadores plasmáticos (LEONI; CACCIA, 2013; LUO; YANG; SONG, 2020).

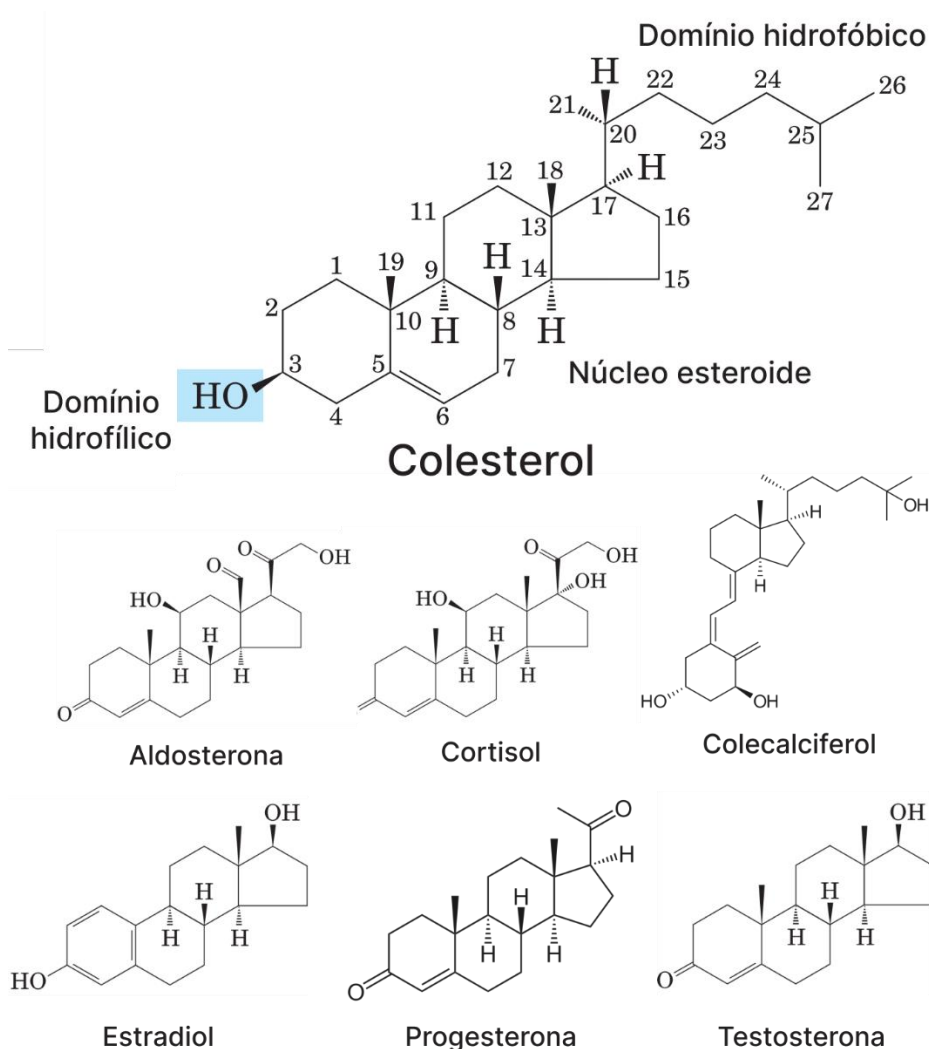


Figura 1: Estrutura química da molécula de colesterol e de alguns de seus derivados. Fonte: Imagem adaptada de Nelson e Cox (2014).

Assim como outros lipídeos, o colesterol é pronunciadamente hidrofóbico, e por isso precisa ser transportado no sangue por macromoléculas chamadas de lipoproteínas (HEGELE, 2009; NARWAL *et al.*, 2019). As lipoproteínas são formadas por uma porção hidrofílica na sua parte externa, contendo fosfolipídios, colesterol livre e apolipoproteínas (Apo); e um interior hidrofóbico, composto de triglicerídeos e ésteres de colesterol (HEGELE, 2009). As Apo, componentes proteicos das lipoproteínas, são a porção reconhecida pelos receptores de membrana e enzimas (NELSON; COX, 2014). Um ponto importante é que a combinação de diferentes Apo e lipídeos formam partículas lipoproteicas com tamanhos e densidades diferentes (MAHLEY *et al.*, 1984, NELSON; COX, 2014). As principais lipoproteínas humanas são os quilomícrons, a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL) (LUO; YANG; SONG, 2020; NARWAL *et al.*, 2019).

Os lipídeos hidrolisados provenientes da alimentação são absorvidos pelos enterócitos e empacotados como ésteres de colesterila e triacilgliceróis em quilomícrons, as maiores e menos densas lipoproteínas (OLSON, 1998). Os quilomícrons circulam pela corrente sanguínea até interagirem com lipases lipoproteicas (LPL) para liberação parcial dos triacilgliceróis (HEGELE, 2009). Os quilomícrons remanescentes são captados por células hepáticas, principalmente por receptores de LDL (LDLr), onde o colesterol restante pode ser esterificado, convertido à ácidos biliares, secretado na bile ou reempacotado para formar VLDL (HEGELE, 2009; OLSON, 1998). A VLDL também contém os lipídeos provenientes da síntese endógena hepática (VOET; VOET. PRATT, 2014). Os lipídeos contidos nas VLDL são liberado por interações com LPL em tecidos extra-hepáticos, formando a LDL (HEGELE, 2009; NELSON; COX, 2014). A LDL distribui colesterol para células periféricas, e o seu remanescente retorna ao fígado para ser reprocessado (NELSON; COX, 2014). O recolhimento do colesterol extra-hepático é feito pela HDL, responsável pelo transporte reverso do colesterol até o fígado para que este seja reutilizado ou excretado (LEWIS; RADER, 2005). A figura 2 apresenta um esquema do metabolismo de lipoproteínas:

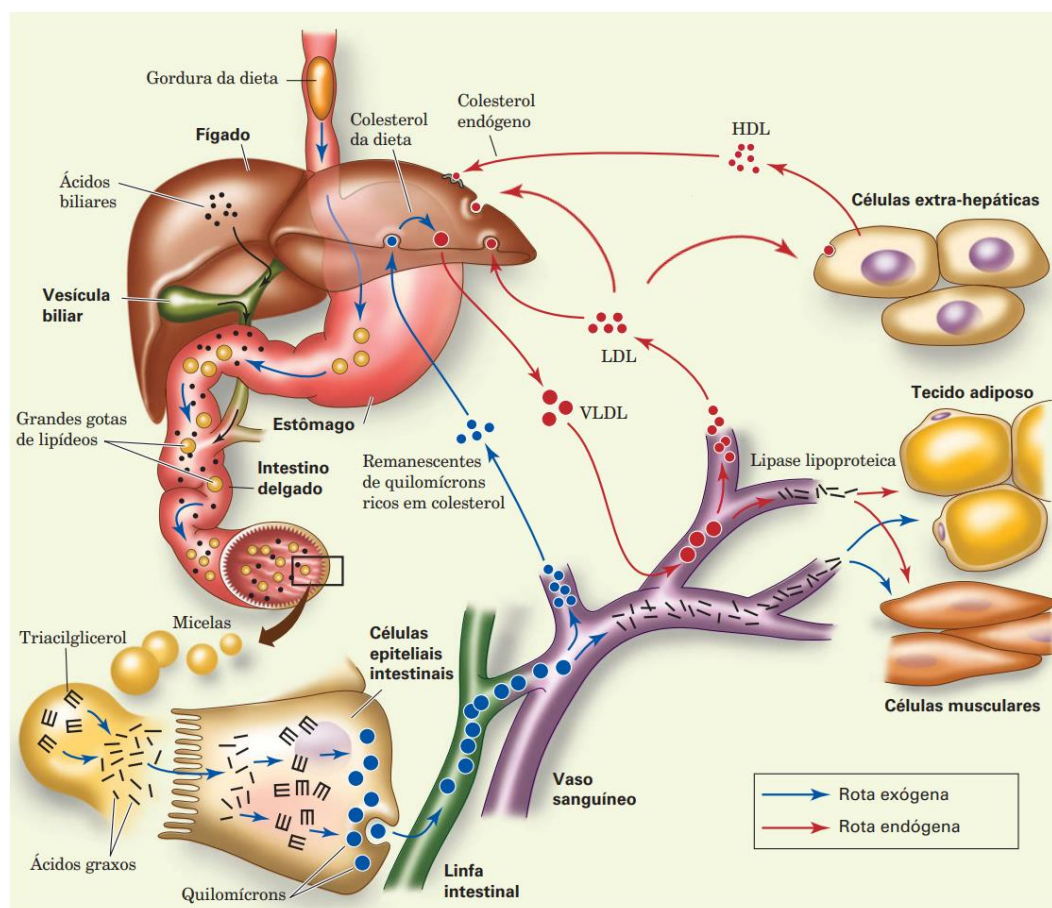


Figura 2: Transporte plasmático de lipídeos provenientes da dieta e da síntese endógena por meio de lipoproteínas. Fonte: Imagem adaptada Voet, Voet e Pratt (2014).

O LDLr, localizado na superfície celular, é imprescindível no processo de homeostase do metabolismo de colesterol, uma vez que realiza a depuração do colesterol plasmático através de interações com as lipoproteínas (GOLDSTEIN; BROWN, 2009). O mais importante ligante deste receptor é a LDL, que destaca-se como o mais abundante carreador sérico de colesterol (BENITO-VICENTE *et al.*, 2018; NARWAL *et al.*, 2019). A captação de LDL pelas células ocorre por endocitose e é mediada pela ligação da Apo B100, presente na sua superfície, com o LDLr (BAIGENT *et al.*, 2011; BROWN; GOLDSTEIN, 1986; SCHADE; SHEY; EATON, 2020). A lipoproteína internalizada em endossomos é separada do receptor por conta do pH ácido e é transportada até os lisossomos, onde sofre hidrólise e dá origem a aminoácidos, ácidos graxos e colesterol livre (LUO; YANG; SONG, 2020). O receptor, por sua vez, é reciclado e volta para a membrana plasmática, onde atua em ciclos repetidos de internalização de LDL (BENITO-VICENTE *et al.*, 2018).

O acúmulo intracelular do colesterol captado do sangue desencadeia mecanismos de regulação do seu próprio conteúdo citosólico: a) ativação da acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT), enzima que catalisa a esterificação do colesterol para que este seja armazenado; b) diminuição da síntese do LDLr, diminuindo a captação de colesterol; c) inativação da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) redutase, enzima regulatória na síntese deste lipídeo, o que inibe a síntese de colesterol (NELSON; COX, 2014). As perturbações no ciclo de captação da LDL, seja na biossíntese do receptor, sua localização na membrana, internalização do complexo receptor-ligante ou reciclagem e degradação do LDLr, causam o acúmulo do colesterol na circulação sanguínea, condição chamada de hipercolesterolemia (LUO; YANG; SONG, 2020; NARWAL *et al.*, 2019).

No cérebro, onde está presente quase 25% do colesterol corporal, todo o conteúdo deste lipídeo é formado pela síntese de novo (DIETSCHY; TURLEY, 2004; LEONI; CACCIA, 2013). Durante o desenvolvimento, os oligodendrócitos são os principais responsáveis pela síntese da bainha de mielina, que contém cerca de 70% do colesterol cerebral (PFRIEGER; UNGERER, 2011). Os neurônios também sintetizam colesterol durante o desenvolvimento, que é utilizado na formação de sinapses e para a sobrevivência celular (DIETSCHY; TURLEY, 2004). Contudo, após o período de mielinização, no sistema nervoso central (SNC) de indivíduos adultos, a síntese de colesterol diminui significativamente em decorrência de um eficiente sistema de reciclagem (BJÖRKHEM; MEANEY; FOGELMAN, 2004). Além disso, os neurônios dependem do colesterol fornecido por astrócitos para manter suas funções normais (LEONI; CACCIA, 2013).

Os astrócitos possuem capacidade de sintetizar lipoproteínas contendo Apo E, colesterol e fosfolipídeos (PFRIEGER; UNGERER, 2011). A captação dessas lipoproteínas pelos neurônios acontece por endocitose através de receptores da família dos receptores de LDL, incluindo o LDLr, presentes principalmente em axônios (DIETSCHY; TURLEY, 2004). Ainda, o colesterol livre em excesso dos neurônios pode ser convertido pela enzima CYP46 a 24S-hidroxicolesterol (24S-OH) que, além de inibir a síntese de colesterol, consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e chegar à circulação periférica, onde pode ser depurado no fígado (LEONI; CACCIA, 2013). Além disso, o 24S-OH regula o metabolismo do colesterol cerebral por meio da interação com receptores X do fígado (LXR, do inglês *liver X receptor*), que aumentam a expressão de transportadores ABCA1, responsáveis pelo efluxo de colesterol dos astrócitos (BJÖRKHEM; MEANEY; FOGELMAN, 2004). O metabolismo simplificado do colesterol no cérebro está presente na figura 3:

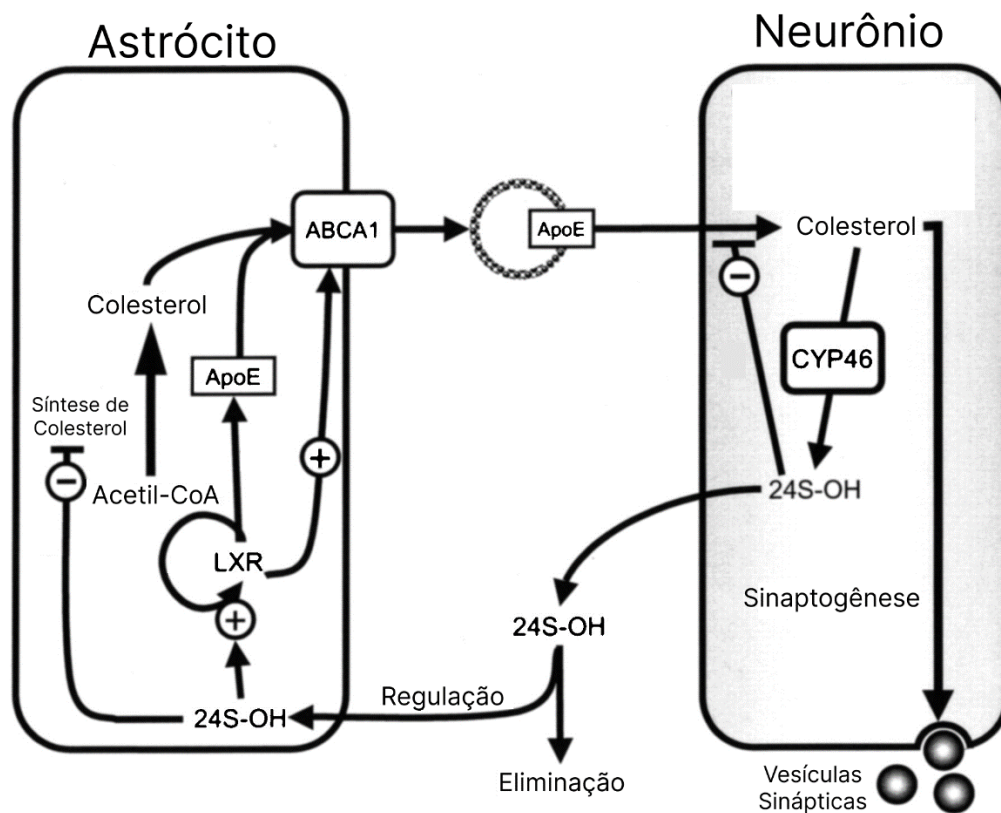


Figura 3: Metabolismo de colesterol em astrócitos e neurônios através de apoE. Fonte: Imagem adaptada de Björkhen, Meaney e Fogelman (2004).

Apesar de seu papel fundamental em sistemas biológicos, o aumento do colesterol no sangue (ie., a hipercolesterolemia) tem efeitos deletérios para a saúde (SUGIYAMA *et al.*, 2015). A Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017) determina que níveis séricos de colesterol total superiores a 190 mg/dL caracterizam hipercolesterolemia. O excesso de colesterol,

principalmente na forma de LDL, está diretamente ligado ao desenvolvimento de alterações ateroscleróticas, e por isso é um importante fator de risco cardiovascular (CORTES *et al.*, 2014; MOZAFFARIAN *et al.*, 2015).

A hipercolesterolemia pode ser de origem genética ou adquirida (TABAS, 2002). Dentre as patologias mais prevalentes causadas por disfunções genéticas no metabolismo do colesterol, destaca-se a Hipercolesterolemia Familiar (HF) com uma frequência de 1:250 pessoas no mundo na sua forma heterozigótica (AKIOYAMEN *et al.*, 2017). A HF é causada, na maioria dos casos, por mutações no gene responsável pela codificação do LDLr, o que causa diminuição da expressão do receptor e/ou baixa interação entre ligante e receptor, resultando em uma diminuição da endocitose de LDL (BENITO-VICENTE *et al.*, 2018; BROWN; GOLDSTEIN, 1986). Conseqüentemente, os indivíduos portadores de HF apresentam níveis elevados de colesterol plasmático desde o nascimento, e sofrem com os efeitos deletérios da doença já na infância (GOLDSTEIN; BROWN, 2009).

De maneira relevante, a hipercolesterolemia vem sendo relacionada também com prejuízos cognitivos e comportamentais ligados às doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA) ou Parkinson (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; KIVIPELTO *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2021; SOLOMON *et al.*, 2009). O interesse na relação entre os níveis aumentados de colesterol e a neurodegeneração advém de uma observação inicial de Sparks e colaboradores (1990), que identificaram placas amiloides (marcador patológico de DA) no cérebro de pacientes que morreram por doença arterial coronariana; indivíduos comumente caracterizados por apresentarem hipercolesterolemia.

Em concordância, um estudo realizado por Zambón *et al.* (2010) com a participação de 47 indivíduos hipercolesterolêmicos de meia-idade, reportou associação entre HF e comprometimento cognitivo leve, que pode representar, em alguns casos, um estágio de transição entre as alterações cognitivas que fazem parte do envelhecimento normal e os primeiros sintomas da DA (MARIANI; MONASTERO; MECOCCI, 2007; PETERSEN *et al.*, 1999). Ademais, Ariza e colaboradores (2016) demonstraram que indivíduos com idades entre 18 e 40 anos e portadores de HF já apresentam prejuízos cognitivos em comparação com indivíduos saudáveis da mesma idade.

Corroborando com os dados clínicos supracitados, estudos experimentais com modelos animais também associam a hipercolesterolemia com o surgimento de déficit cognitivo e alterações cerebrais. Refolo e colaboradores (2000) demonstraram que o emprego de uma dieta hipercolesterolêmica resulta em aumento significativo no acúmulo de peptídeo β -amiloide,

importante marcador patológico da DA, no SNC de camundongos transgênicos modelos desta doença neurodegenerativa, e que esse aumento se correlaciona fortemente com os níveis plasmáticos de colesterol. Já Moreira e coautores (2014) reportaram que camundongos *Swiss* adultos expostos a uma dieta rica em colesterol por oito semanas apresentaram comprometimento de aprendizado e memória, que foram associados com o aumento da atividade da acetilcolinesterase no córtex pré-frontal e no hipocampo. Além disso, camundongos nocautes para o LDLr (LDLr^{-/-}), um modelo experimental de HF, já apresentam prejuízo de memória e aprendizado aos 3 meses de idade em associação com níveis elevados de colesterol no sangue (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Animais hipercolesterolêmicos também apresentaram aumento de comportamento do tipo depressivo quando comparados com seus controles saudáveis (ENGEL *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2021; STREKALOVA *et al.*, 2015).

Sparks e colaboradores (2000) também demonstraram que a hipercolesterolemia afeta a integridade da BHE e promove inflamação no endotélio de vasos no SNC de coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol. O mesmo grupo de pesquisa também reportou um aumento na ativação da micróglia e infiltração de leucócitos no cérebro de coelhos hipercolesterolêmicos (STREIT; SPARKS, 1997). Ademais, diversas alterações foram descritas no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos LDLr^{-/-}, tais como desregulação da produção de citocinas e mediadores inflamatórios, ativação de células gliais e disfunção da BHE (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014, 2020; THIRUMANGALAKUDI *et al.*, 2008). Por exemplo, o trabalho de De Oliveira *et al.* (2020) observou que camundongos LDLr^{-/-} apresentam aumento da permeabilidade da BHE e astrogliose no hipocampo, o que é ainda pior quando os mesmos são expostos à uma dieta rica em colesterol. Os autores também reportaram que os camundongos modelos de HF são mais sensíveis aos danos cerebrais causados pela dieta rica em colesterol quando comparados aos animais selvagens (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Deste modo, a HF parece estar mais fortemente relacionada à disfunção cerebral característica das doenças neurodegenerativas, em particular a DA.

Nesse contexto, estudos prévios sugerem que a inibição do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian target of rapamycin*) por meio do uso da rapamicina se associa com a preservação da integridade da BHE (VAN SKIKE *et al.*, 2018), atenuação de dano cognitivo e redução sistêmica e cerebral de inflamação em modelos de demência e de HF (eg., os camundongos LDLr^{-/-}) (FARR *et al.*, 2019; JAHRLING *et al.*, 2018). A mTOR é uma proteína cinase serina/treonina formada por dois complexos proteicos chamados de complexo

mTOR 1 (mTORC1) e complexo mTOR2 (mTORC2) que desempenha importante papel no controle da síntese e degradação de proteínas e na inibição da autofagia em resposta a disponibilidade de nutrientes e fatores de crescimento (CACCAMO *et al.*, 2014; LAPLANTE; SABATINI, 2012; SPILMAN *et al.*, 2010). Ambas as subunidades são grandes, com mTORC1 contendo 6 e mTORC2 contendo 7 componentes proteicos conhecidos, e possuem substratos e efeitos distintos (ABDO QAID *et al.*, 2021).

A mais bem descrita subunidade de mTOR é mTORC1, que é classicamente conhecida por ser sensível à rapamicina (SARBASSOV *et al.*, 2006). mTORC1 responde aos níveis de nutrientes, energia, estresse, oxigênio a fatores de crescimento, promovendo a síntese de lipídeos, proteínas e energia, bem como inibindo a autofagia e a biogênese de lisossomos quando ativada (JUNG *et al.*, 2010). Já mTORC2, ativada principalmente por fatores de crescimento, regula a organização do citoesqueleto, crescimento e sobrevivência celular e apoptose (ABDO QAID *et al.*, 2021). Além disso, a via de sinalização de mTOR está envolvida com processos de memória (LANA *et al.*, 2013).

A síntese de proteínas, principalmente nas regiões das sinapses neuronais, é necessária para a consolidação da memória de longo prazo; dessa forma, a sinalização de mTOR é crucial nesse processo (GIOVANNINI; LANA, 2016). Em um estudo de 2017, Lana e colaboradores demonstraram que a inibição de mTOR no hipocampo, por meio da injeção intracerebroventricular de rapamicina, causou prejuízo de memória espacial de ratos adultos saudáveis. No entanto, a hiperatividade de mTOR tem efeitos deletérios e causa déficit cognitivo em humanos e modelos animais (CACCAMO *et al.*, 2014; EHNINGER, 2013; PUIGHERMANAL *et al.*, 2009). De particular interesse, a hipercolesterolemia em modelos animais já foi relacionada com hiperatividade de mTOR (GIRICZ *et al.*, 2017; GLAZER *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2022). Portanto, a modulação de vias vinculadas a mTOR pode ser uma estratégia interessante para atenuar as alterações cerebrais causadas pela hipercolesterolemia.

A metformina é um fármaco da classe das biguanidas utilizado no tratamento da diabetes tipo 2 e, atualmente, é o hipoglicemiante oral mais utilizado na prática clínica (CAMPBELL *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2001). A metformina se tornou amplamente utilizada não só por seu importante efeito hipoglicemiante independente dos níveis de insulina, no qual causa diminuição da gliconeogênese hepática e aumento da captação de glicose, ou por ser biologicamente segura com poucos efeitos adversos; mas porque apresenta diversos efeitos pleiotrópicos (LAMOIA; SHULMAN, 2021). Já foi demonstrada sua capacidade de redução

do apetite e do peso corporal, além de promover melhora de marcadores de risco cardiovascular, como a diminuição dos níveis de LDL em indivíduos diabéticos (XU *et al.*, 2015) e não diabéticos (GLUECK *et al.*, 2001). A figura 4 apresenta alguns mecanismos pelos quais a metformina modula os níveis plasmáticos de lipídeos e de glicose:

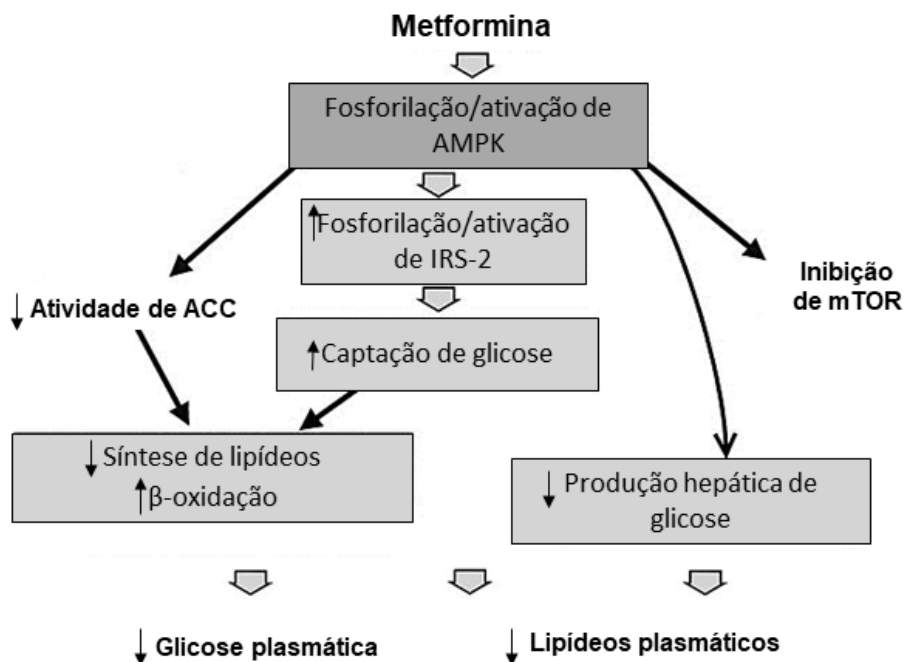


Figura 4: Mecanismos de ação da metformina no metabolismo de glicose e de lipídeos através da ativação de AMPK. Fonte: Imagem adaptada de Zhou *et al.* (2001).

Apesar de seu mecanismo de ação exato não ser ainda totalmente elucidado, a ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK, do inglês *AMP-activated protein kinase*) parece ser uma das principais vias pela qual este medicamento interage com outros processos celulares (AMIN; LUX; O'CALLAGHAN, 2019). A AMPK fosforila e aumenta a ativação do receptor de insulina e do substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2, do inglês *insulin-receptor substrate-2*) e também a translocação de transportadores de glicose, além de inibir a síntese de ácidos graxos e estimular a β -oxidação através da regulação da atividade da acetil-CoA carboxilase (ACC) e da expressão de outras enzimas envolvidas com a lipidogênese (GUNTON *et al.*, 2003; PERNICOVA; KORBONITS, 2014). Ademais, a metformina inibe mTOR por meio da ativação de AMPK (AMIN; LUX; O'CALLAGHAN, 2019). AMPK interage com uma série de moléculas intermediárias: a) ativa os genes supressores de tumor complexo da esclerose tuberosa 1/2 (TSC1/2, do inglês *tuberous sclerosis complex*); b) inibe a proteína adaptadora associada de mTOR (RAPTOR, do inglês *regulatory-associated protein of mTOR*); c) ativa a

proteína supressora de tumor p53; que culminam na inibição de mTOR (GWINN *et al.*, 2008; KARUMAN *et al.*, 2001; NING; CLEMMONS, 2010).

Em estudos experimentais, a metformina já mostrou ter efeitos terapêuticos sobre parâmetros cognitivos e inflamatórios. O tratamento de modelos genéticos de DA levou a uma melhora de memória e aprendizado, bem como reduziu neuroinflamação e promoveu a neurogênese (FARR *et al.*, 2019; OU *et al.*, 2018). Em animais diabéticos, o tratamento com metformina foi capaz de reduzir a o tamanho de lesões ateroscleróticas na aorta (ASAI *et al.*, 2019). Já pesquisas clínicas evidenciaram que a metformina é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de LDL em indivíduos diabéticos e não diabéticos (GLUECK *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2015), e melhorar a função neurológica de pacientes diabéticos após acidente vascular cerebral (ZHAO *et al.*, 2019). A metformina demonstra então, além de propriedades cardioprotetoras, capacidade neuroprotetora importante. Nesse sentido, nesta dissertação nós avaliamos o potencial efeito metabólico e neuroprotetor da metformina na HF, por meio do tratamento oral de camundongos LDLr^{-/-}.

2 JUSTIFICATIVA

A HF tem alta frequência mundial, desencadeando doenças cardiovasculares em indivíduos ainda jovens. Além disso, a HF parece ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DA, visto que pessoas jovens acometidas por essa patologia podem já apresentar dano cognitivo antes dos 40 anos de idade. Em estudos experimentais, foi visto que camundongos jovens modelos de HF, os camundongos LDLr^{-/-}, apresentam prejuízos de memória. Estudos experimentais também evidenciaram a presença de alterações na BHE e eventos neuroinflamatórios coexistentes em modelos animais de HF. Deste modo, se faz necessária a investigação dos mecanismos fisiopatológicos que causam tais alterações, bem como o surgimento de novas estratégias terapêuticas que sejam capazes de amenizar, reverter ou preveni-las. Considerando a sua gama de efeitos pleiotrópicos e ascendente propriedade neuroprotetora, a metformina se apresenta como uma opção farmacológica promissora. O uso da metformina se justifica principalmente devido ser uma possível inibidora de mTOR, o que parece causar uma melhora na disfunção da BHE associada à HF e demência.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do tratamento com metformina sobre alterações cognitivas e parâmetros bioquímicos periféricos e centrais em um modelo experimental genético de hipercolesterolemia familiar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito do tratamento com metformina sobre o peso corporal e níveis de colesterol total e triglicerídeos em camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-} machos adultos;
- Avaliar a atividade locomotora e exploratória e a memória espacial de camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-} machos adultos tratados com metformina por meio dos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e realocação de objetos, respectivamente;
- Avaliar o fenótipo depressivo em camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-} machos adultos tratados com metformina por meio do teste de suspensão pela cauda;
- Analisar marcadores astrocitários e microgliais no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-} machos adultos tratados com metformina por meio de ensaios de imunofluorescência.

PARTE II

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos machos adultos (90 dias de idade no início do tratamento) da linhagem C57BL/6 (20-30 g) selvagens (WT, do inglês *wild-type*) e LDLr^{-/-}, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os progenitores destes camundongos foram adquiridos do *Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA)* e cedidos pela professora Andreza Fabro de Bem do Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Os animais foram alojados em grupos de até 5 camundongos por caixa moradia (dimensões de 42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7:00 às 19:00), e com livre acesso a água potável e ração padrão. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sob protocolo número 41034 (ANEXO A).

4.2 TRATAMENTO

Os camundongos foram tratados diariamente, durante 30 dias, pela administração via oral por gavagem com metformina na dose de 200 mg/Kg de peso corporal. O medicamento foi adquirido na forma de comprimidos revestidos, e sua diluição foi realizada em uma solução com 0,9% de cloreto de sódio (solução salina) a cada dois dias. Os animais dos grupos de controle de tratamento foram administrados com a solução salina (veículo) na mesma frequência e período dos grupos de tratamento farmacológico. Ambas as soluções de tratamento foram armazenadas em geladeira após diluição.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental de tratamento foi realizado com duas coortes diferentes de animais. Os animais foram organizados em 4 grupos experimentais (n total por grupo=19-24) de acordo com o tratamento recebido e o genótipo apresentado:

1. Camundongos C57BL/6 WT + salina;

2. Camundongos C57BL/6 WT + metformina;
3. Camundongos C57BL/6 LDLr^{-/-} + salina;
4. Camundongos C57BL/6 LDLr^{-/-} + metformina.

A partir do primeiro dia de tratamento, os animais foram pesados 1 vez por semana até o final do protocolo experimental. Nos últimos 4 dias do protocolo experimental de tratamento, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais do campo aberto, reconhecimento de objetos, realocação de objetos e suspensão pela cauda, para avaliação da atividade locomotora, memória e comportamento do tipo depressivo.

Em sequência aos testes comportamentais, uma parte dos animais foi mantida em jejum por 12 horas e em seguida anestesiada via injeção intraperitoneal com uma mistura de xilazina (10 mg/Kg) e quetamina (80 mg/Kg) e teve o sangue coletado por punção cardíaca para a determinação de parâmetros metabólicos. Já o restante dos camundongos foi anestesiado e então perfundido com paraformaldeído 4% e teve seu cérebro colhido para a realização de ensaios de imunofluorescência. É importante mencionar que foram realizadas duas coortes experimentais. O desenho experimental está representado na figura 1:

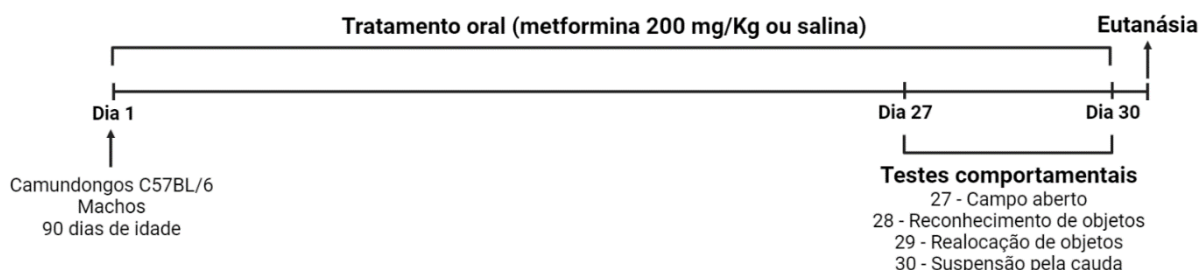


Figura 5: Desenho experimental. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Campo aberto

No 27º dia após o início do tratamento foi realizado o teste de campo aberto. O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora e exploratória dos animais (PRUT; BELZUNG, 2003). O aparato consiste em uma caixa de acrílico cinza (dimensões 30 x 40 x 40 cm), sem cobertura e com o assoalho dividido por linhas em 9 quadrantes. Cada camundongo foi colocado no centro da arena, livre para se movimentar no aparato durante o período de 5 minutos. Para avaliação das atividades locomotora e exploratória, foram

verificados o número total de cruzamentos, quando o animal atravessa por um quadrante com as quatro patas, e o número total de levantamentos, quando o animal se mantém sobre as duas patas traseiras após 1 sessão de teste de 5 minutos.

4.4.2 Reconhecimento de objetos

No 28º dia após o início do tratamento, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos para avaliação da memória de curto prazo. Neste teste, o animal é familiarizado com dois objetos idênticos e, após um intervalo, é apresentado simultaneamente ao mesmo objeto e a um novo objeto (GRECO *et al.*, 2010). O teste aconteceu no mesmo aparato utilizado para o campo aberto, em duas sessões de 5 minutos. Na primeira sessão, de treinamento e aquisição, os animais foram expostos a dois objetos idênticos no campo aberto e sua atividade exploratória foi registrada. Após 60 minutos, foi realizada a segunda sessão, de teste e retenção, onde os animais foram expostos a dois objetos diferentes, um objeto familiar da primeira sessão e um novo objeto. Foi registrado o tempo de exploração de cada objeto no segundo ensaio. O índice de discriminação é expresso em porcentagem e determinado pela seguinte equação através dos tempos de exploração dos objetos: $[\text{objeto novo (s)} \times 100] / [\text{objeto novo (s)} + \text{objeto conhecido (s)}]$.

4.4.3 Realocação de objetos

No 29º dia do protocolo experimental, os animais realizaram o teste de realocação de objetos para a avaliação da memória espacial de referência (ASSINI; DUZZIONI; TAKAHASHI, 2009). Assim como o teste de reconhecimento de objetos, este teste se baseia na tendência espontânea de roedores de explorar um objeto novo ou realocado por um tempo maior que um objeto conhecido. Neste teste, também utilizando o aparato do campo aberto, uma sessão treino foi realizada, onde dois objetos idênticos foram apresentados aos animais e o tempo de exploração de cada objeto durante 5 minutos foi registrado. Após 180 minutos, na sessão teste, um dos objetos foi reposicionado no aparato, e foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos pelo período de 5 minutos. O índice de localização, expresso em porcentagem, é determinado pela seguinte equação através dos tempos de exploração de cada objeto: $[\text{objeto realocado (s)} \times 100] / [\text{objeto realocado (s)} + \text{objeto conhecido (s)}]$.

4.4.4 Suspensão pela cauda

No último dia de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda para avaliação do fenótipo depressivo (STERU *et al.*, 1985). Neste teste os camundongos foram suspensos a 50 cm do chão pela extremidade distal da cauda pelo período de 6 minutos, e o tempo total de imobilidade foi contabilizado.

4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.5.1 Parâmetros metabólicos

Após a realização dos testes comportamentais uma parte dos camundongos foi anestesiada com xilazina e quetamina para coleta de sangue por punção cardíaca, que em sequência foi centrifugado para obtenção de plasma heparinizado. Os níveis totais de colesterol e triglicerídeos foram determinados por meio do soro utilizando kits comerciais colorimétricos, de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.5.2 Imunofluorescência

Os animais anestesiados foram perfundidos pelo ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina 0,9% seguida por uma solução de paraformaldeído 4%. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e imersos em uma solução de 4% de paraformaldeído por 24 horas e criopreservados em uma solução de 30% de sacarose em solução fosfato-salina (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*). Cortes coronais sequenciais de 30 μ m do córtex pré-frontal e do hipocampo foram realizados em micrótomo de lâmina vibratória e armazenados em PBS 0,1 M com 0,5% de azida sódica. Os ensaios de imunofluorescência foram realizados como previamente descrito por De Oliveira *et al.* (2014, 2020). Inicialmente, os cortes foram lavados duas vezes com PBS 0,1 M e bloqueados com 1% de albumina bovina diluída em PBS 0,1 M com 0,3% de Triton X durante 45 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* com anticorpos primários específicos para a marcação de proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*) e de molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (IBA-1, do inglês *ionized calcium-binding adapter molecule 1*), marcadores de astrócitos e micróglia, respectivamente. Depois de 5 lavagens com PBS 0,1 M, as amostras foram incubadas com os

anticorpos secundários fluorescentes diluídos em PBS 0,1 M com 0,3% de Triton X por 2 horas. Por fim, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS 0,1 M e montados em lâminas com meio de montagem CC/mount e cobertos com lamínulas. Imagens dos cortes de córtex pré-frontal e hipocampo foram obtidas por um microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000 do Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS. A análise das imagens foi realizada pelo programa de domínio público ImageJ.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A diferença entre os grupos nos testes de comportamento e nos parâmetros metabólicos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias e o teste *post hoc* de Tukey foi aplicado quando apropriado para comparações múltiplas. Nos testes de reconhecimento de objetos e realocação de objetos, os grupos foram comparados ao valor hipotético de 50% para avaliação dos níveis de chance por meio do teste t. Para as análises dos dados da imunofluorescência foi utilizada a ANOVA de duas vias, e o teste *post hoc* de Duncan foi utilizado para múltiplas comparações. Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística foi considerada para valores de p menores que 0,05. Os testes estatísticos foram realizados pelo *software* Statistica© 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) ou pelo GraphPad Prism © 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS ASSOCIADAS À HF

A figura 6 apresenta os níveis de colesterol total, triglicerídeos e o peso corporal total dos camundongos C57BL/6 WT e LDLr^{-/-}. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do genótipo sobre os níveis de colesterol total [F(1,21)=38,020, p<0,001]. A posterior análise de *post hoc* apontou que os camundongos LDLr^{-/-} que receberam salina apresentam níveis mais altos de colesterol quando comparados com os camundongos selvagens que também receberam salina. O tratamento com metformina não foi capaz de reduzir os níveis de colesterol no modelo animal de HF (Figura 6A). Com relação aos níveis de triglicerídeos, apresentados na Figura 6B, a ANOVA de duas vias mostrou efeito do tratamento [F(1,21)=4,606, p<0,05] e do genótipo [F(1,21)=4,446, p<0,05]. O *post hoc* de Tukey apresentou aumento dos triglicerídeos no grupo LDLr^{-/-} tratado com metformina em comparação com os animais WT que receberam o mesmo tratamento (p<0,05). A ANOVA de duas vias apontou efeito do genótipo [F(1,82)=15,212, p<0,001] também no peso dos animais, apresentado na figura 6C. Além disso, por meio do *post hoc* de Tukey, verificou-se redução do peso corporal no grupo LDLr^{-/-} + Metformina em comparação ao grupo WT + Metformina (p<0,05).

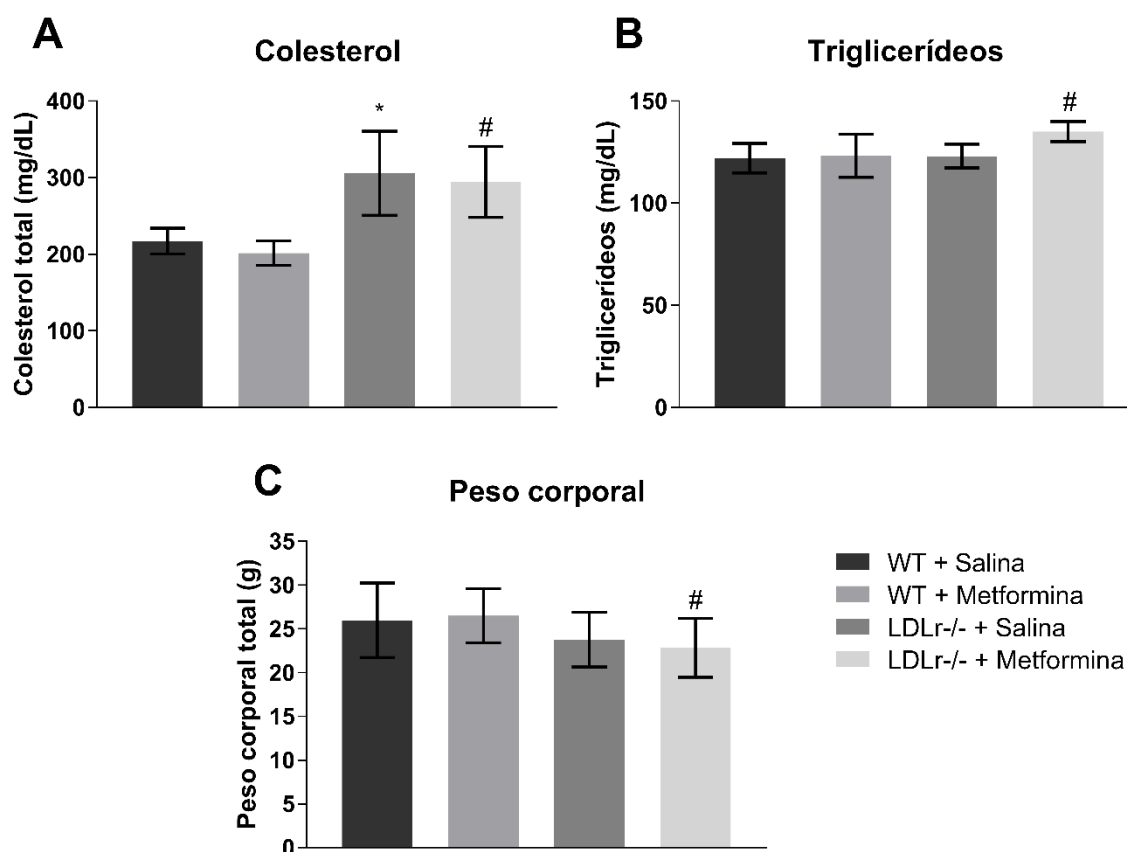


Figura 6: Efeitos do tratamento com metformina no colesterol plasmático, triglicerídeos e peso corporal de camundongos C57BL/6 WT e LDLr-/-. (A) Níveis de colesterol total (n por grupo=5-7), (B) triglicerídeos (n por grupo=5-7) plasmático e (C) peso corporal total (n por grupo=19-24) de animais WT e LDLr-/- tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com WT + Salina # $p < 0,05$ comparado com WT + Metformina (ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey).

5.2 TRATAMENTO COM METFORMINA ATENUOU OS PREJUÍZOS COGNITIVOS EM CAMUNDONGOS LDLR-/-

A análise dos dados dos testes comportamentais está representada na figura 7. O campo aberto foi utilizado para avaliação da atividade locomotora e exploratória dos animais, por meio da análise do número de cruzamentos e de levantamentos durante sua permanência no aparato. A ANOVA de duas vias mostrou diferença entre os genótipos em ambos os parâmetros ([$F(1,77)=22,729$, $P < 0,001$] nos cruzamentos, e [$F(1,77)=38,004$, $P < 0,001$] nos levantamentos). Na sequência, o *post hoc* de Tukey apontou aumento no número de cruzamentos (figura 7A) e de levantamentos (figura 7B) nos animais LDLr-/- que receberam salina ou metformina em comparação com os grupos WT + Salina ($p < 0,05$) e WT + Metformina ($p < 0,05$), respectivamente.

Para avaliação de memórias dependentes do hipocampo, foram realizados os testes de reconhecimento de objetos (figura 7C) e realocação de objetos (figura 7D). Os grupos WT + Salina [t(14)=2,767, p<0,05] e LDLr^{-/-} + Metformina [t(18)=2,914, p<0,05] apresentaram um índice de discriminação maior do que o valor teórico de 50% (nível de chance), por avaliação do teste t. Contudo, o mesmo não foi observado em relação aos grupos WT + Metformina e LDLr^{-/-} + Salina, indicando prejuízo de memória e aprendizado. Já o teste ANOVA de duas vias não apontou diferença no índice de discriminação entre os objetos nos grupos experimentais estudados, bem como não apontou significância do tratamento ou genótipo.

No teste de realocação de objetos (figura 7D), os grupos WT administrados com salina [t(11)=4,927] ou com metformina [t(19)=5,426] demonstraram aprendizado da tarefa (p<0,05 comparado ao valor teórico de 50%), enquanto danos de memória e aprendizado foram observados nos grupos LDLr^{-/-}. Além disso, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do genótipo sobre o índice de localização [F(1,67)=29,343, p<0,001]. Foram observadas por meio do *post hoc* de Tukey a diminuição do índice de localização no grupo LDLr^{-/-} que recebeu salina em comparação com o grupo WT + Salina (p<0,05), e um aumento desse índice no grupo LDLr^{-/-} tratado com metformina quando comparado aos animais LDLr^{-/-} + Salina (p<0,05). Logo, o tratamento com a metformina, pelo menos em parte, atenuou os déficits de memórias dependentes do hipocampo nos animais LDLr^{-/-}. No entanto, nos camundongos controle a metformina pareceu causar alterações de memória no teste de reconhecimento do objeto.

Ainda, o teste de suspensão pela cauda é utilizado para avaliação do fenótipo depressivo pela análise do tempo de imobilidade do animal. Os resultados da análise estatística dos dados deste teste estão expressos na figura 7E. A ANOVA de duas vias indicou interação positiva entre as variáveis genótipo e tratamento [F(1,76)=7,141, p<0,05]. O *post hoc* de Tukey apontou aumento significativo do tempo de imobilidade do grupo LDLr^{-/-} que foi administrado com salina em comparação com o grupo controle que também recebeu o veículo (p<0,05). Ademais, foi observada uma tendência de diminuição do fenótipo depressivo nos camundongos LDLr^{-/-} que receberam a metformina quando comparado ao grupo LDLr^{-/-} administrado com salina (p=0,057).

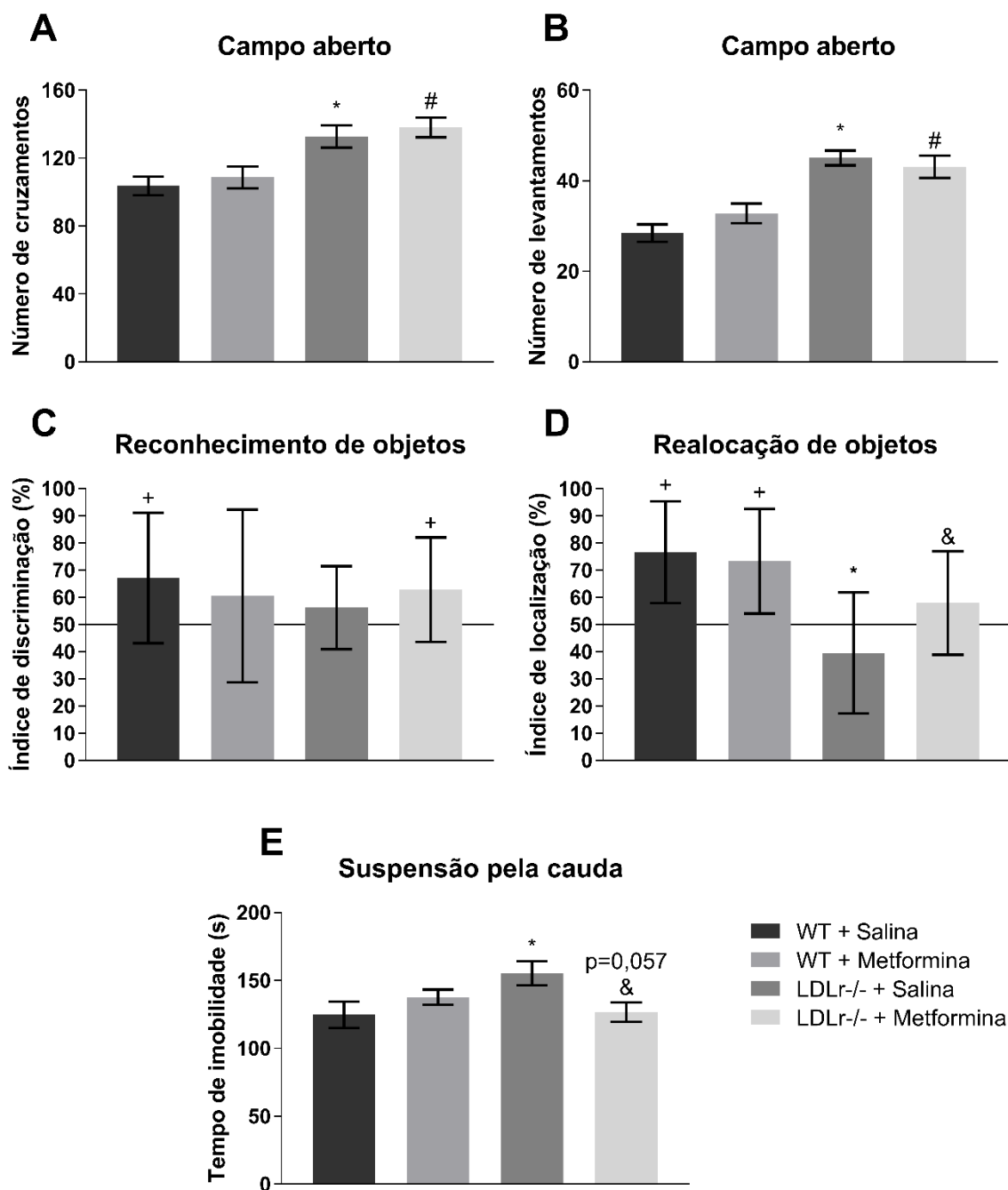


Figura 7: Efeitos do tratamento com metformina na atividade locomotora e exploratória, memórias dependentes de hipocampo e fenótipo depressivo de camundongos C57BL/6 WT e LDLr-/-. (A) Número de cruzamentos (n por grupo=18-22) e (B) levantamentos (n por grupo=16-24), (C) índice de discriminação (n por grupo=15-20), (D) índice de localização (n por grupo=12-21), e (E) tempo de imobilidade (n por grupo=18-23) de animais WT e LDLr-/- tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Dados estão expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com WT + Salina # $p < 0,05$ comparado com WT + Metformina & $p < 0,05$ comparado com LDLr-/- + Salina (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey). + $p < 0,05$ comparado a 50% (índice de localização e discriminação por teste t).

5.3 TRATAMENTO COM METFORMINA DIMINUI ASTROGLIOSE HIPOCAMPAL CAUSADA PELA HF EM CAMUNDONGOS LDLR-/-

A imunorreatividade de GFAP foi determinada para avaliação da densidade e reatividade astrocitária em 3 regiões hipocampais e no córtex pré-frontal dos animais. O painel da figura 8A apresenta imagens representativas de córtex pré-frontal marcado com GFAP nos aumentos de 20x, 40x (+) e zoom digital (++). O resultado da análise estatística dos dados desta imunofluorescência está expresso na figura 8B. O teste ANOVA de duas vias não apontou diferença na marcação de GFAP entre os grupos no córtex pré-frontal.

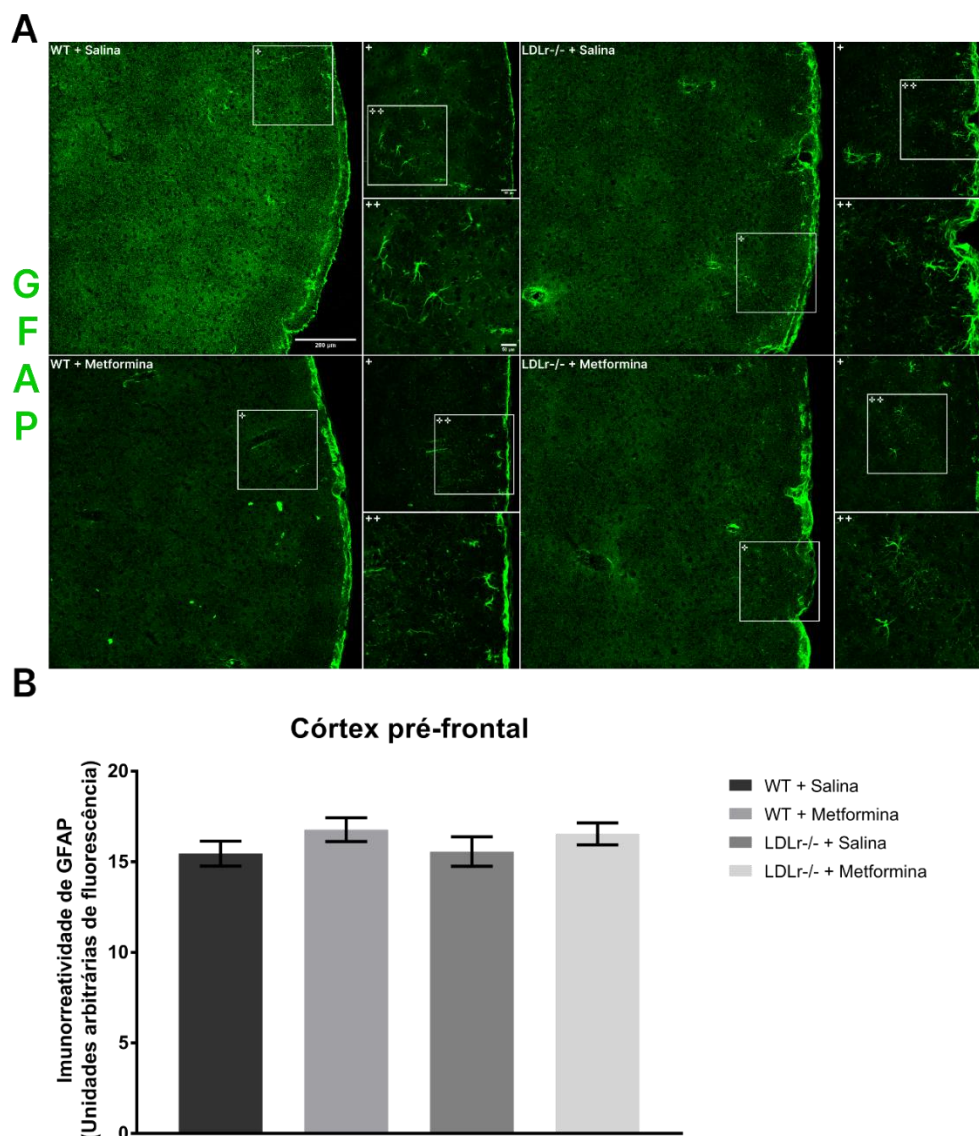


Figura 8: Imunorreatividade de GFAP no córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 WT e LDLr^{-/-}. (A) Imagens representativas da marcação de GFAP em seções coronais de córtex pré-frontal (n por grupo=6-9) de animais WT e LDLr^{-/-} tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Imagens foram adquiridas por microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000. Barras de escala = 200μm para imagens obtidas com objetiva de 20x, 100μm para imagens obtidas com objetiva de 40x (representadas por +) e 50μm para imagens com zoom digital de 100% (representadas por ++). (B) Quantificação da imunorreatividade de GFAP em imagens obtidas com objetiva de 20x. Dados estão expressos como a média ± EPM. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias.

Imagens representativas nos aumentos de 20x, 40x (+) e zoom digital (++) da região CA3 do hipocampo marcado com GFAP estão apresentadas na figura 9A. Na avaliação estatística dos dados (figura 9B), a ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre o genótipo e o tratamento [$F(1,26)=4,860$, $p<0,05$]. Na sequência, o teste *post hoc* de Duncan mostrou um aumento da imunorreatividade de GFAP no CA3 dos animais LDLr^{-/-} que receberam salina em comparação com o grupo WT + Salina ($p<0,05$), e diminuição deste

parâmetro nos animais LDLr^{-/-} tratados com metformina em comparação com o grupo LDLr^{-/-} + Salina.

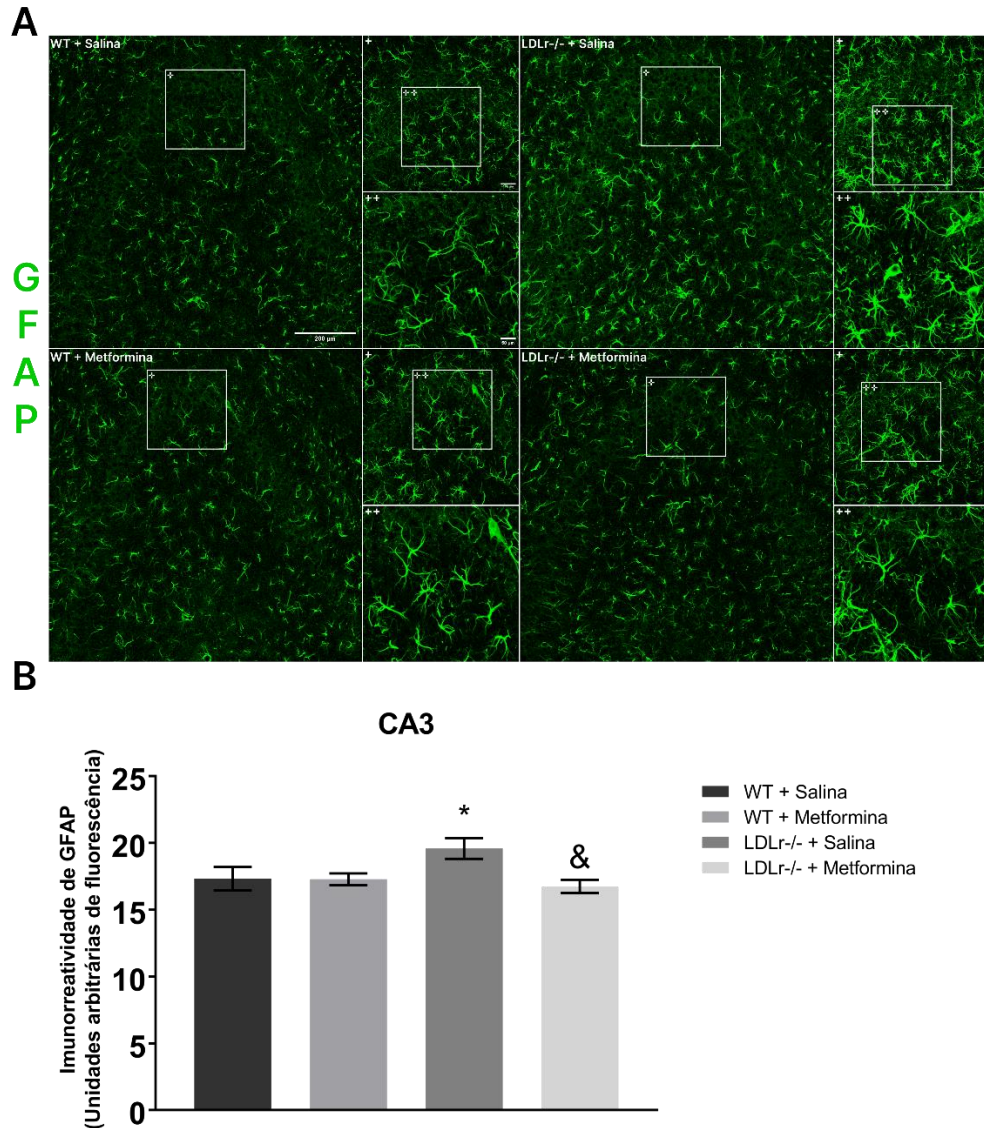


Figura 9: Imunorreatividade de GFAP na região CA3 do hipocampo de camundongos C57BL/6 WT e LDLr^{-/-}. (A) Imagens representativas da marcação de GFAP em seções coronais de hipocampo (n por grupo=6-9) de animais WT e LDLr^{-/-} tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Imagens foram adquiridas por microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000. Barras de escala = 200µm para imagens obtidas com objetiva de 20x, 100µm para imagens obtidas com objetiva de 40x (representadas por +) e 50µm para imagens com zoom digital de 100% (representadas por ++). (B) Quantificação da imunorreatividade de GFAP em imagens obtidas com objetiva de 20x. Dados estão expressos como a média ± EPM. * p<0,05 comparado com WT + Salina # p<0,05 comparado com WT + Metformina & p<0,05 comparado com LDLr^{-/-} + Salina (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

A figura 10A apresenta um painel com imagens representativas da marcação de GFAP na região CA1 do hipocampo nos aumentos de 20x, 40x (+) e zoom digital (++). A análise estatística (figura 10B) por ANOVA de duas vias não detectou diferenças significativas entre os grupos.

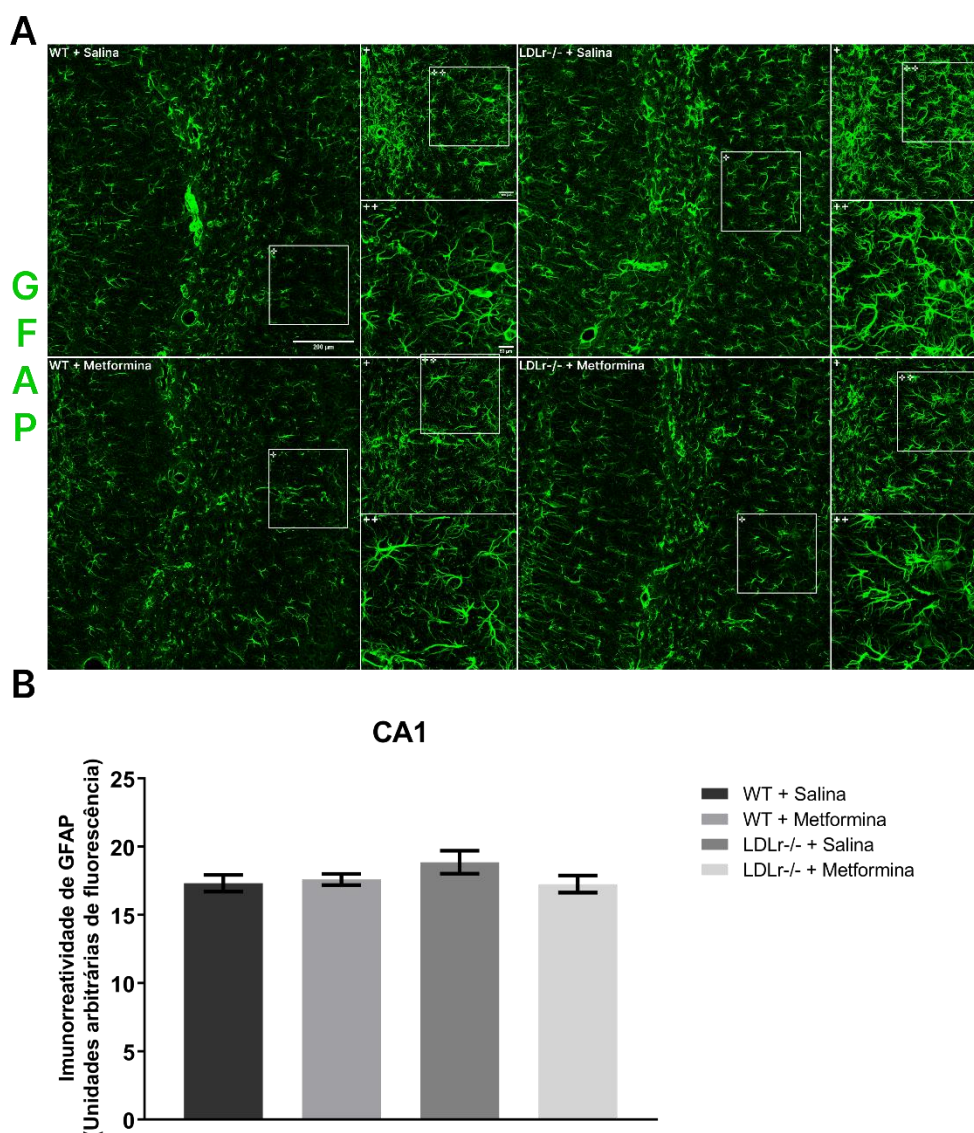


Figura 10: Imunorreatividade de GFAP na região CA1 do hipocampo de camundongos C57BL/6 WT e LDLr-/- . (A) Imagens representativas da marcação de GFAP em secções coronais de hipocampo (n por grupo=5-9) de animais WT e LDLr-/- tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Imagens foram adquiridas por microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000. Barras de escala = 200µm para imagens obtidas com objetiva de 20x, 100µm para imagens obtidas com objetiva de 40x (representadas por +) e 50µm para imagens com zoom digital de 100% (representadas por ++) (B) Quantificação da imunorreatividade de GFAP em imagens obtidas com objetiva de 20x. Dados estão expressos como a média ± EPM. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias.

Imagens representativas da marcação de GFAP na região giro denteado do hipocampo nos aumentos de 20x, 40x (+) e zoom digital (++) estão apresentadas na figura 11A. A figura 11B mostra o resultado das análises estatísticas. A ANOVA de duas vias apontou efeito significativo do tratamento sobre a imunorreatividade de GFAP [$F(1,22)=4,544$, $p<0,05$] no giro denteado dos camundongos. Foram observados, por meio do *post hoc* de Duncan, um aumento da densidade de astrócitos no grupo LDLr-/- + Salina em comparação com os animais

WT administrados com salina ($p < 0,05$), e atenuação da imunorreatividade após tratamento com metformina nos animais LDLr^{-/-} em comparação com os mesmos animais que receberam salina ($p < 0,05$).

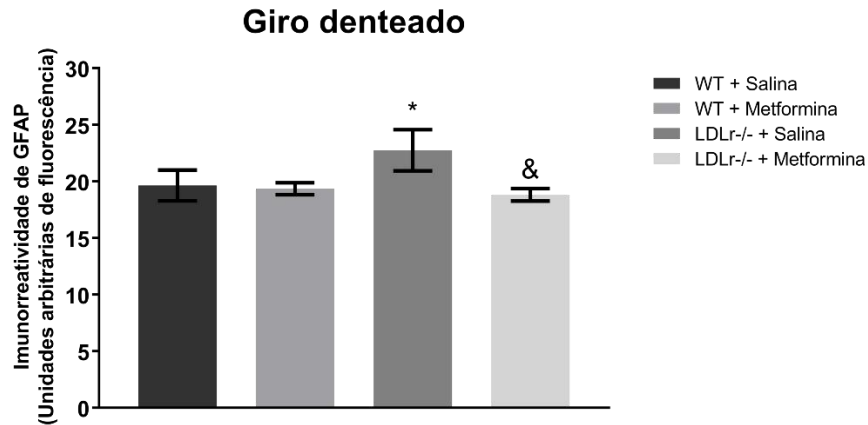
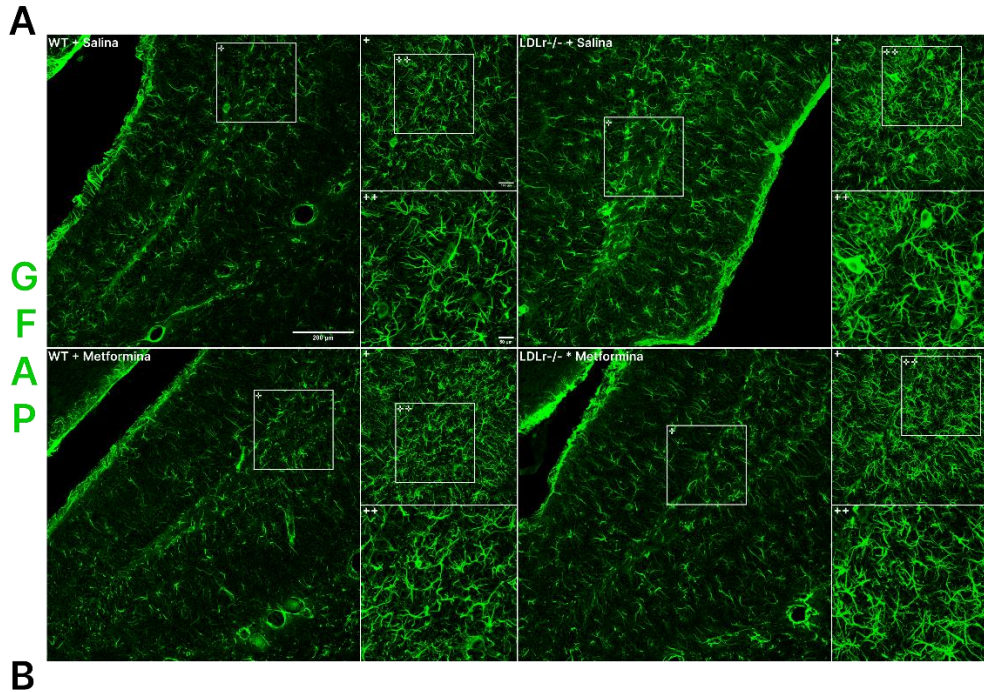


Figura 11: Imunorreatividade de GFAP na região giro denteado do hipocampo de camundongos C57BL/6 WT e LDLr^{-/-}. (A) Imagens representativas da marcação de GFAP em secções coronais de hipocampo (n por grupo=4-9) de animais WT e LDLr^{-/-} tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Imagens foram adquiridas por microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000. Barras de escala = 200µm para imagens obtidas com objetiva de 20x, 100µm para imagens obtidas com objetiva de 40x (representadas por +) e 50µm para imagens com zoom digital de 100% (representadas por ++). (B) Quantificação da imunorreatividade de GFAP em imagens obtidas com objetiva de 20x. Dados estão expressos como a média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado com WT + Salina # $p < 0,05$ comparado com WT + Metformina & $p < 0,05$ comparado com LDLr^{-/-} + Salina (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

5.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE A DENSIDADE MICROGLIAL

Para investigar os efeitos do tratamento com metformina sobre a densidade microglial, foram realizados ensaios de imunofluorescência com IBA-1 em secções coronais seriadas de córtex pré-frontal e hipocampo dos animais. A figura 12A apresenta um painel representativo de imagens de córtex pré-frontal marcado com IBA-1 nos aumentos de 20x, 40x (+) e zoom digital (++). A análise estatística por ANOVA de duas vias não detectou diferenças significativas entre os grupos (figura 12B).

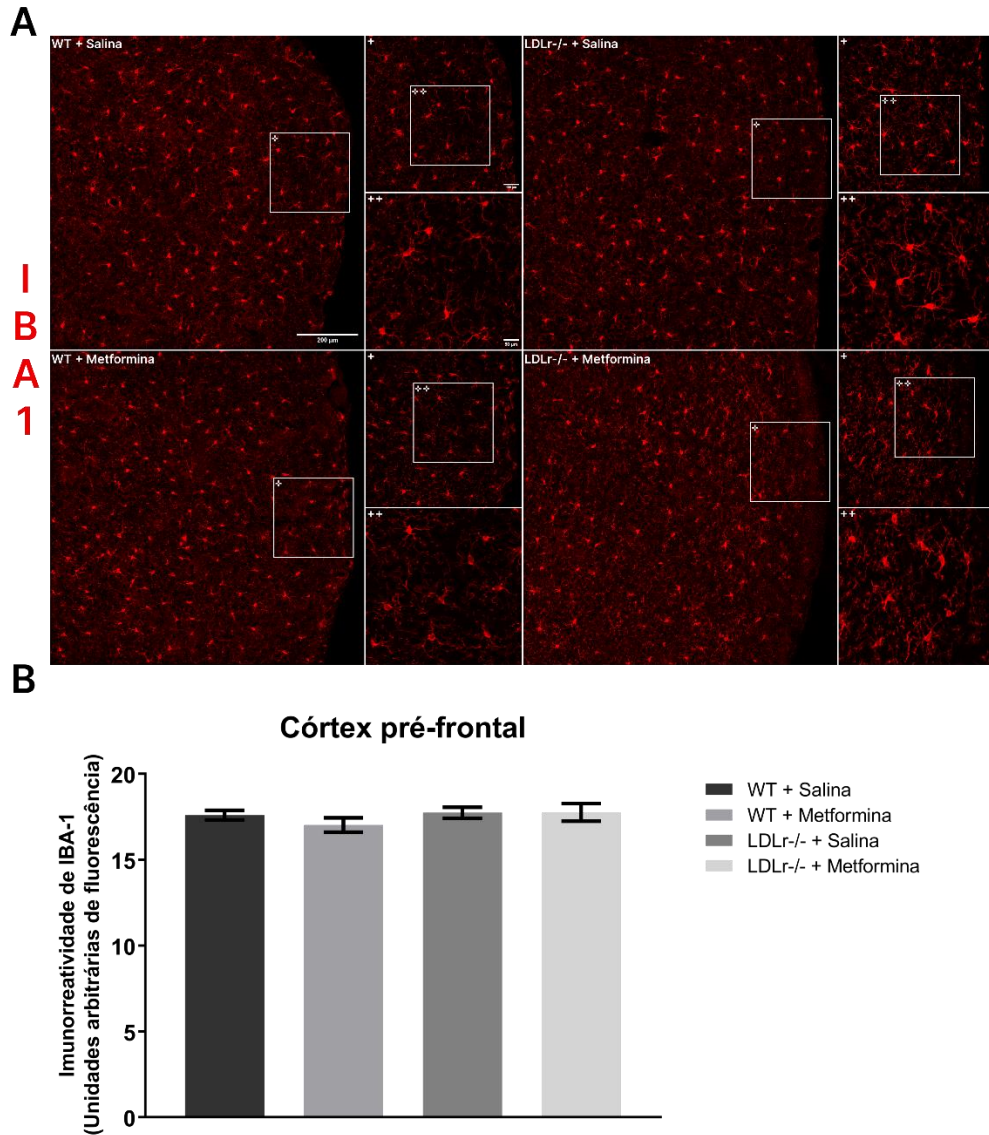


Figura 12: Imunorreatividade de IBA-1 no córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 WT e LDLr-/- . (A) Imagens representativas da marcação de IBA-1 em secções coronais de córtex pré-frontal (n por grupo=6-9) de animais WT e LDLr-/- tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Imagens foram adquiridas por microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000. Barras de escala = 200µm para imagens obtidas com objetiva de 20x, 100µm para imagens obtidas com objetiva de 40x (representadas por +) e 50µm para imagens com zoom digital de 100% (representadas por ++). (B) Quantificação da imunorreatividade de IBA-1 em imagens obtidas com objetiva de 20x. Dados estão expressos como a média ± EPM. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias.

O painel da figura 13A apresenta imagens representativas da região CA3 do hipocampo marcada com IBA-1 nos aumentos de 20x, 40x (+) e zoom digital (++). O resultado da análise estatística dos dados deste ensaio de imunofluorescência está expresso na figura 13B. O teste ANOVA de duas vias não apontou diferença na densidade microglial entre os grupos na região CA3 do hipocampo dos animais.

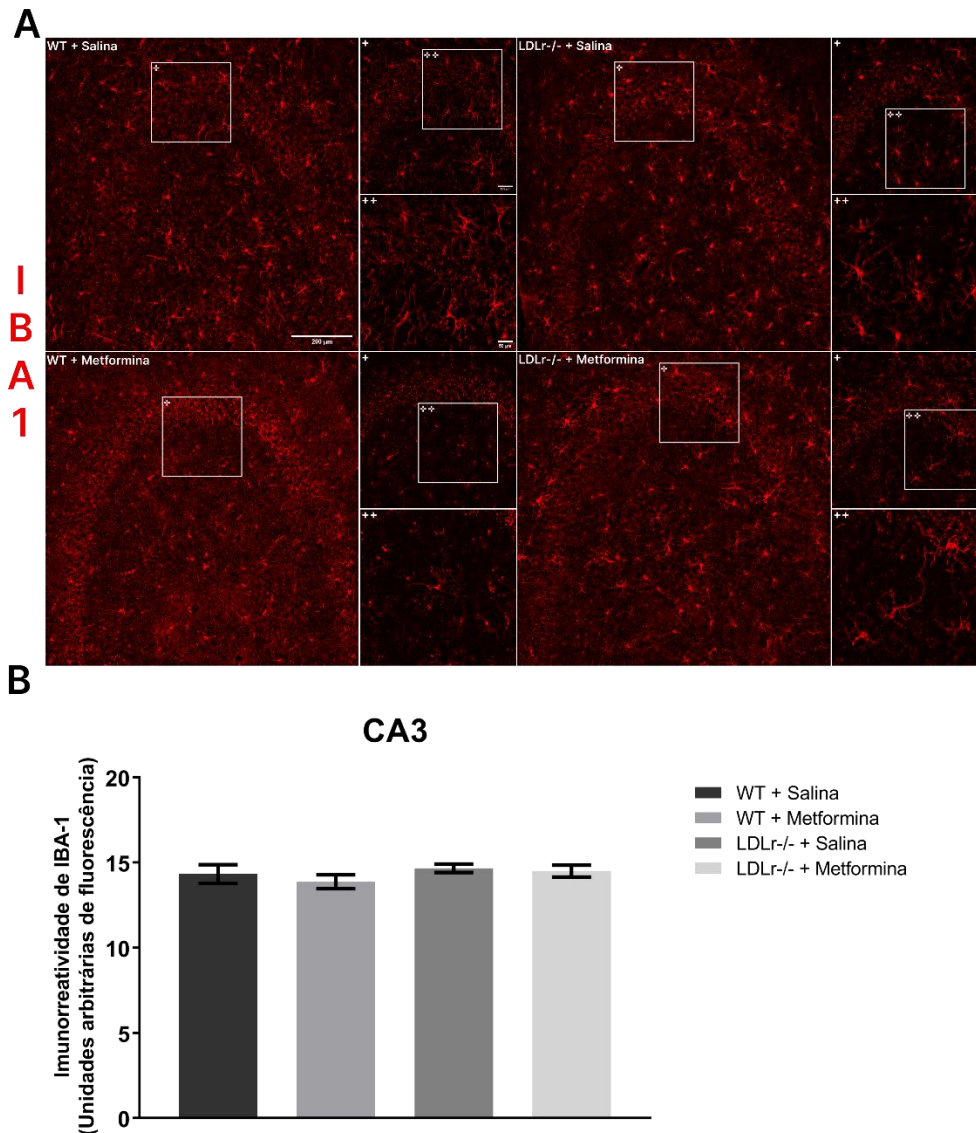


Figura 13: Imunorreatividade de IBA-1 na região CA3 do hipocampo de camundongos C57BL/6 WT e LDLr^{-/-}. (A) Imagens representativas da marcação de IBA-1 em secções coronais de hipocampo (n por grupo=6-9) de animais WT e LDLr^{-/-} tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Imagens foram adquiridas por microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000. Barras de escala = 200µm para imagens obtidas com objetiva de 20x, 100µm para imagens obtidas com objetiva de 40x (representadas por +) e 50µm para imagens com zoom digital de 100% (representadas por ++). (B) Quantificação da imunorreatividade de IBA-1 em imagens obtidas com objetiva de 20x. Dados estão expressos como a média ± EPM. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias.

Imagens representativas da marcação de IBA-1 na região CA1 do hipocampo nos aumentos de 20x, 40x (+) e zoom digital (++) estão apresentadas na figura 14A. A figura 14B mostra o resultado das análises estatísticas. A ANOVA de duas vias não apontou efeito significativo do tratamento ou do genótipo sobre a imunorreatividade de IBA-1 na região CA1 do hipocampo dos camundongos.

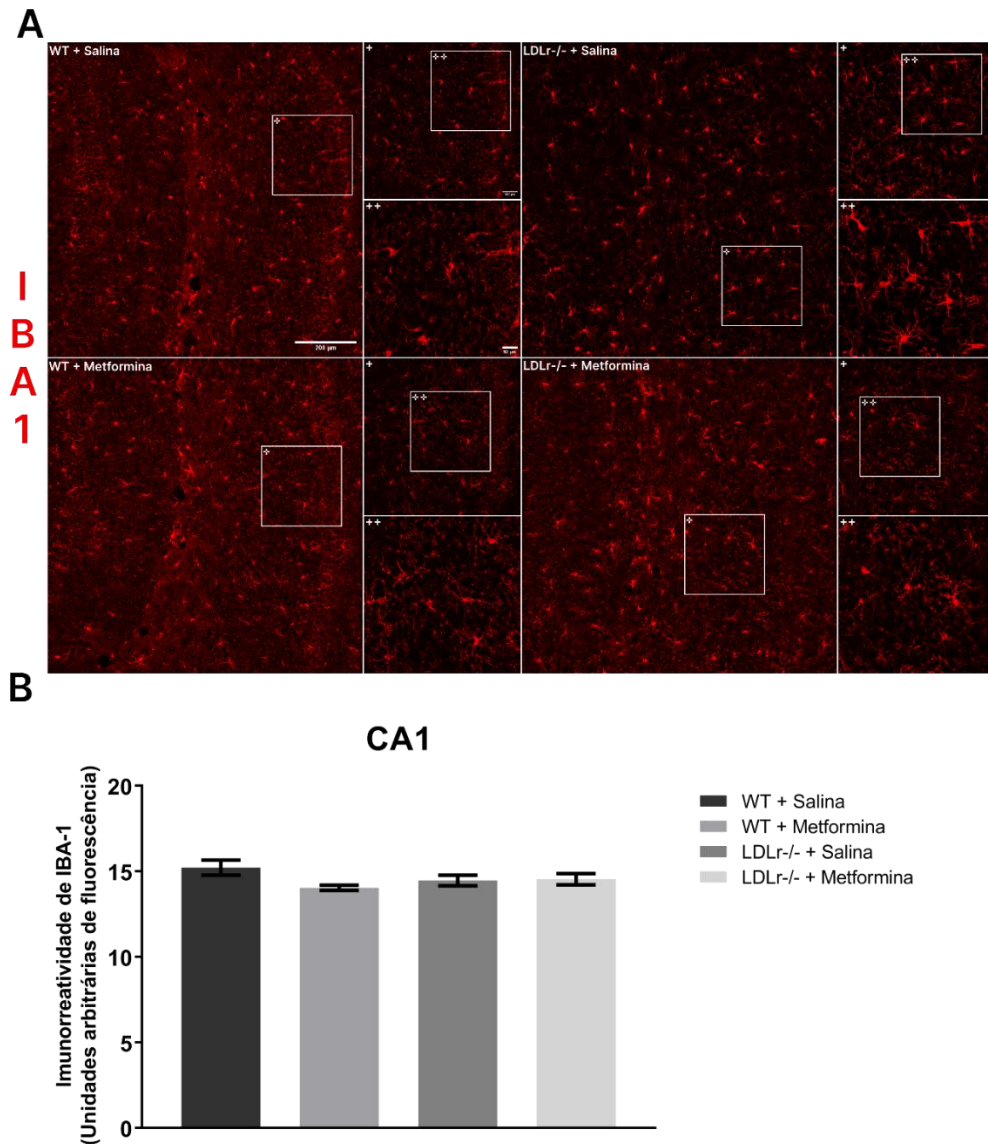


Figura 14: Imunorreatividade de IBA-1 na região CA1 do hipocampo de camundongos C57BL/6 WT e LDLr-/- . (A) Imagens representativas da marcação de IBA-1 em secções coronais de hipocampo (n por grupo=5-9) de animais WT e LDLr-/- tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Imagens foram adquiridas por microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000. Barras de escala = 200µm para imagens obtidas com objetiva de 20x, 100µm para imagens obtidas com objetiva de 40x (representadas por +) e 50µm para imagens com zoom digital de 100% (representadas por ++). (B) Quantificação da imunorreatividade de IBA-1 em imagens obtidas com objetiva de 20x. Dados estão expressos como a média ± EPM. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias.

A figura 15A exibe um painel com imagens representativas da marcação para IBA-1 na região giro denteado do hipocampo nos aumentos de 20x, 40x (+) e zoom digital (++). A análise estatística dos dados desta imunofluorescência por ANOVA de duas vias não detectou diferenças significativas entre os grupos (figura 15B).

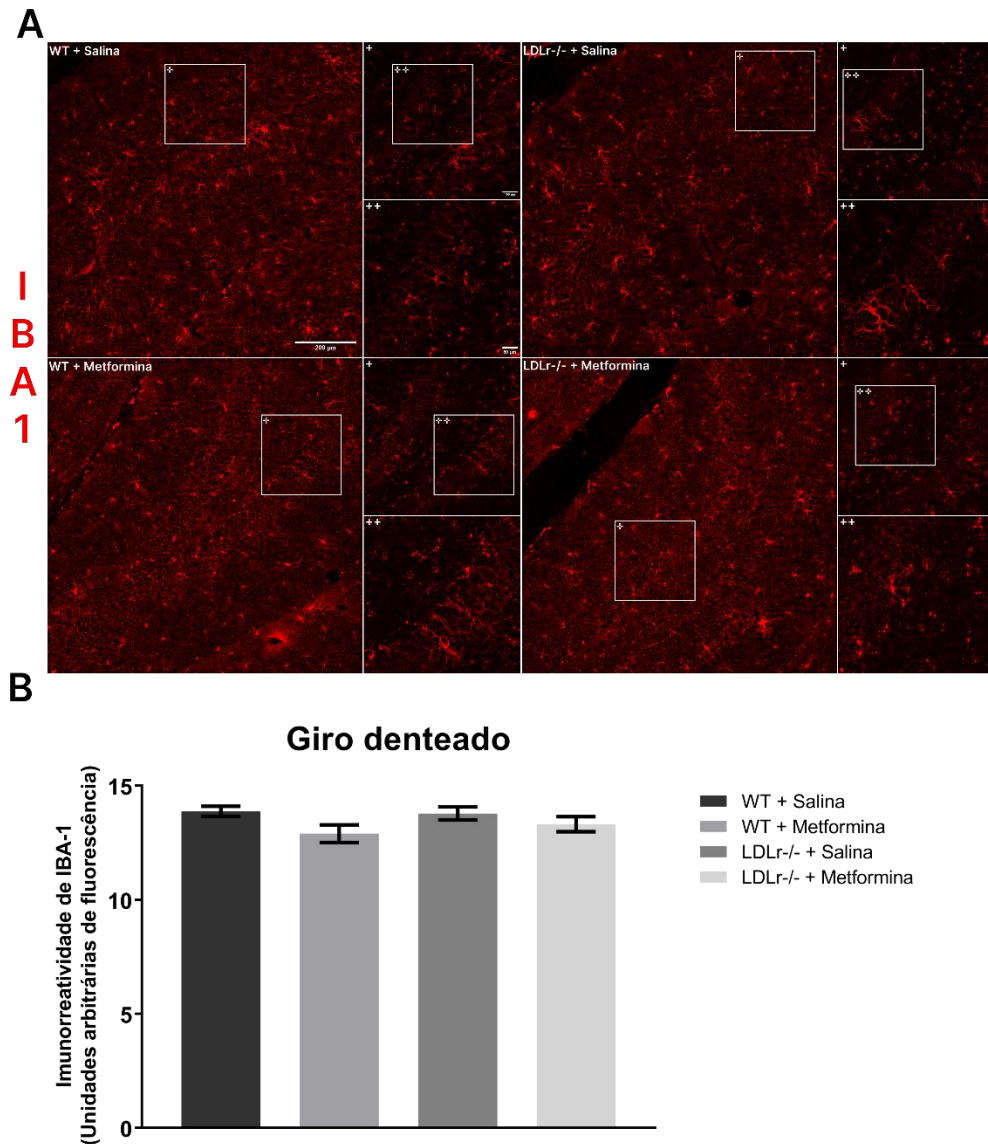


Figura 15: Imunorreatividade de IBA-1 na região giro denteado do hipocampo de camundongos C57BL/6 WT e LDLr-/. (A) Imagens representativas da marcação de IBA-1 em secções coronais de hipocampo (n por grupo =5-9) de animais WT e LDLr-/- tratados com salina ou 200 mg/Kg de metformina. Imagens foram adquiridas por microscópio confocal de fluorescência Olympus®FV1000. Barras de escala = 200μm para imagens obtidas com objetiva de 20x, 100μm para imagens obtidas com objetiva de 40x (representadas por +) e 50μm para imagens com zoom digital de 100% (representadas por ++). (B) Quantificação da imunorreatividade de IBA-1 em imagens obtidas com objetiva de 20x. Dados estão expressos como a média ± EPM. Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias.

PARTE III

6 DISCUSSÃO

Alterações no metabolismo do colesterol, além de serem fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, vêm sendo consideradas como causadoras de disfunções cerebrais e declínio cognitivo associados com a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas. A HF é a mais prevalente patologia genética decorrente de disfunções no metabolismo do colesterol, causada usualmente por mutações genéticas que perturbam a captação da LDL circulante (AKIOYAMEN *et al.*, 2017; BENITO-VICENTE *et al.*, 2018). Diversos estudos apontam a conexão entre HF e comprometimento cognitivo, tanto em humanos, quanto em modelos animais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; KIVIPELTO *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2012; SOLOMON *et al.*, 2009). Zambón *et al.* (2010) reportaram que pacientes de meia-idade portadores de HF apresentam comprometimento cognitivo leve. Nessa mesma linha de evidência, Ariza *et al.* (2016) observaram que indivíduos portadores de HF, com idades entre 18 e 40 anos, já apresentam déficits de cognição em comparação com pessoas saudáveis da mesma idade. Pesquisas com modelos animais de HF (ie., os camundongos LDLr-/-) descrevem também dano de memória já aos 3 meses de idade (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011), neuroinflamação (THIRUMANGALAKUDI *et al.*, 2008), astrogliose e aumento da permeabilidade da BHE (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Dessa forma, a busca por estratégias que possam controlar as alterações cerebrais na HF torna-se relevante. Neste estudo, nós buscamos prover evidências pré-clínicas de que a metformina possa ser uma molécula interessante para atenuar as alterações cerebrais associadas à HF. Nós avaliamos os efeitos do tratamento com metformina sobre as alterações metabólicas, comportamentais e de reatividade glial em camundongos LDLr-/-, um modelo genético de HF.

Já existem evidências clínicas e pré-clínicas que sugerem que a hiperatividade de mTOR no cérebro se associa com a progressão da DA (AN *et al.*, 2003; CACCAMO *et al.*, 2010). Outrossim, em estudos com modelos genéticos de DA, a inibição da mTOR com rapamicina causou a reversão de danos de memória e aprendizado, bem como induziu diminuição do conteúdo cerebral de peptídeo β -amiloide (CACCAMO *et al.*, 2010; SPILMAN *et al.*, 2010). Em concordância, o tratamento de camundongos LDLr-/- com o inibidor de mTOR, rapamicina, teve efeito protetor sobre a integridade da BHE e também melhorou as memórias espacial e de reconhecimento (JAHRLING *et al.*, 2018; VAN SKIKE *et al.*, 2018). Ademais, ao tratar um modelo murino de diabetes induzido por estreptozotocina com metformina, Yang *et al.*, (2019)

observaram diminuição da sinalização inflamatória mediada por NLRP3 no tecido cardíaco em decorrência da inibição de mTOR.

Uma guanidina derivada da planta arruda-caprária (*Gallega officinalis* L.), a metformina, tem sido usada há anos no tratamento da diabetes (ROJAS; GOMES, 2013). A metformina age primariamente no fígado, reduzindo a produção de glicose, e de maneira secundária aumentando a captação de glicose nos tecidos periféricos (GOODARZI; BRYER-ASH, 2005). Esses efeitos são mediados pela ativação da proteína cinase B1 do fígado (LKB-1, do inglês *liver kinase B1*) que, por sua vez, fosforila e ativa AMPK (VIOLETT *et al.*, 2012). A AMPK é responsável pela inativação de fatores de transcrição que promovem a síntese de enzimas que participam da gliconeogênese (SHAW *et al.*, 2005). A inibição do complexo I mitocondrial também já foi proposta como mecanismo que contribui para a redução da gliconeogênese hepática, visto que diminui o suprimento energético necessário para este processo (ROJAS; GOMES, 2013; VIOLETT *et al.*, 2012). Mais recentemente, a metformina vem sendo associada com recuperação da função ovariana na síndrome do ovário policístico, diminuição da lipogênese hepática e diminuição de risco cardiovascular (LAMANNA *et al.*, 2011; VIOLETT *et al.*, 2012). Apesar de ainda não estar elucidada a maquinaria pela qual a metformina exerce estas funções, a inibição de mTOR através da via de sinalização da AMPK apresenta uma variedade de efeitos (ROTERMUND; MACHETANZ; FITZGERALD, 2018). Em destaque, a modulação de mTOR está relacionada com diversos processos patológicos ligados à progressão de alterações cerebrais (ABDO QAID *et al.*, 2021; OU *et al.*, 2018; RÉUS; QUEVEDO; RODRIGUES, 2015; SONG *et al.*, 2018; XIONG *et al.*, 2021).

Neste contexto, vale citar que os eventos primordiais que desencadeiam os processos patológicos de doenças neurodegenerativas acontecem principalmente no córtex e hipocampo (FREITAS; PY, 2016; REITZ; MAYEUX, 2014). O processamento e assimilação de informações espaciais e temporais captadas do ambiente são funções atribuídas ao hipocampo (HOWARD; EICHENBAUM, 2015; PALOMBO; KEANE; VERFAELLIE, 2016). De particular importância, já foi descrito que os camundongos LDLr^{-/-} apresentam diminuição do número de células proliferativas e de botões pré-sinápticos no hipocampo, o que parece contribuir com o comprometimento cognitivo observado neste modelo de HF (ENGEL *et al.*, 2019; ETTCHETO *et al.*, 2015; MULDER *et al.*, 2004, 2007). Neste sentido, empregamos os testes de reconhecimento e realocação de objetos para avaliar as memórias dependentes de hipocampo. O tratamento com metformina foi capaz de melhorar o dano de aprendizado e memória espacial exibido pelos camundongos LDLr^{-/-}. Os animais hipercolesterolêmicos

tratados com a metformina passaram mais tempo explorando os objetos novos ou realocados do que aqueles que receberam salina. É importante mencionar que no teste de realocação de objetos, apesar de existir diferença entre os grupos LDLr^{-/-}, o tratamento com metformina não reverteu completamente o dano de memória, visto que não houve diferença estatística significativa entre o índice de localização e o valor hipotético de 50% (nível de chance).

Além do mais, o tratamento com metformina teve um efeito ambíguo sobre a memória de curto prazo; nos animais hipercolesterolêmicos foi capaz de atenuar o dano cognitivo induzido pelo modelo, mas nos animais selvagens funcionou em detrimento da memória. Estes dados corroboram com trabalhos que apontam que o tratamento com metformina parece melhorar o prejuízo de memória espacial e de curto prazo em modelos de DA, obesidade e diabetes (ALLARD *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2016a; FARR *et al.*, 2019; PINTANA *et al.*, 2012). Já em camundongos saudáveis, a administração de metformina causou danos ou não melhorou o desempenho cognitivo em testes para avaliação da memória (LI *et al.*, 2019; THANGTHAENG *et al.*, 2017). Assim, aperfeiçoamentos do esquema de tratamento podem ser sugeridos, como alteração da dose de medicamento, do método de aplicação ou do tempo de exposição. No geral, estudos dos efeitos da metformina em modelos animais não apresentam concordância com relação à esses critérios (ROTERMUND; MACHETANZ; FITZGERALD, 2018).

De modo semelhante a estes achados experimentais, nos ensaios clínicos a administração prolongada de metformina se mostrou benéfica principalmente para os pacientes diabéticos (YING *et al.*, 2014). Em um trabalho com uma coorte de 25.393 pacientes diabéticos, Hsu *et al.* (2011) observaram que o tratamento crônico com metformina reduziu o risco de desenvolvimento de demência. Em concordância, Ng *et al.* (2014) relataram que o tratamento prolongado com metformina relacionou-se com diminuição do risco de declínio cognitivo em uma população diabética. No geral, estudos epidemiológicos apontam que a ativação de AMPK se relaciona com respostas celulares que amenizam ou adiam a patogênese de doenças neurodegenerativas (eg., DA), como regulação da fosforilação da proteína tau, da amiloidogênese, da autofagia e da inflamação mediada pelo fator nuclear *kappa* B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) (SALMINEN *et al.*, 2011).

Outro prejuízo comportamental frequentemente descrito em modelos animais de hipercolesterolemia é o fenótipo depressivo. Alterações condizentes com um comportamento do tipo depressivo em testes como o nado forçado e suspensão pela cauda foram reportadas em estudos com camundongos hipercolesterolêmicos induzidos por dieta (RODRIGUES *et al.*,

2021; STREKALOVA *et al.*, 2015). Os mesmos resultados foram observados no estudo de Engel *et al.* (2016), onde animais LDLr^{-/-} exibiram um fenótipo depressivo nos testes de suspensão pela cauda, preferência por sacarose e borrifagem de sacarose. No presente estudo se observou aumento significativo do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda no grupo LDLr^{-/-} administrado com salina em comparação ao grupo WT + Salina. O tratamento com metformina mostrou uma tendência de redução do tempo de imobilidade nos animais LDLr^{-/-}, indicando uma melhora do fenótipo tipo depressivo. Nesse sentido, o tratamento de animais geneticamente modificados para superexpressão de mTOR no giro denteado com rapamicina, inibidor específico de mTOR, melhorou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (ZHOU *et al.*, 2013). De maneira semelhante, o tratamento com rapamicina apresentou potenciais efeitos anti-depressivos em animais saudáveis, evidenciados por diminuição do tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda (CLEARY *et al.*, 2008). O emprego do tratamento com metformina em animais submetidos à protocolos de estresse se mostrou capaz de melhorar comportamentos depressivos em testes comportamentais (DU; BU, 2020; WANG *et al.*, 2019). Além disso, em modelos murinos de alterações metabólicas, como resistência à insulina ou distúrbios no metabolismo do colesterol, a administração de metformina também promoveu efeitos antidepressivos nos animais (LIN *et al.*, 2022; ZEMDEGS *et al.*, 2019). Em adição, em um estudo clínico com pacientes diabéticos com depressão, o tratamento com metformina reduziu sintomas de depressão (GUO *et al.*, 2014).

Foi investigado também o efeito da metformina sobre a atividade exploratória e locomotora. Uma característica importante dos camundongos LDLr^{-/-} é a hiperlocomoção. O aumento da atividade locomotora e exploratória no teste de campo aberto já foi descrita em estudos prévios com camundongos LDLr^{-/-} (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; ELDER *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2012). Nossos resultados indicam um comportamento de hiperlocomoção dos camundongos LDLr^{-/-} independente do tratamento administrado em comparação com os animais WT. Em conformidade com nossos achados, o tratamento de modelos de obesidade e diabetes, bem como de animais saudáveis, com metformina não exerceu quaisquer alterações sobre esses mesmos fatores (CHEN *et al.*, 2016a; LENNOX *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2019; PINTANA *et al.*, 2012).

A metformina demonstra um importante potencial terapêutico em vista de suas propriedades, que implicam em uma série de efeitos positivos além daqueles relacionados ao controle glicêmico. Trabalhos com humanos mostraram que a metformina reduz o risco de

doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos por provocar diminuição dos níveis de LDL circulante e a espessura de placas de ateroma (PETRIE *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). Existem ainda dois grandes testes clínicos em andamento: “*Investigation of Metformin in Pre-Diabetes on Atherosclerotic Cardiovascular Outcomes*” (#NCT02915198), e “*Targeting Aging with Metformin*” (BARZILAI *et al.*, 2016); que têm como objetivo verificar as propriedades da metformina em pacientes não-diabéticos, particularmente seus impactos no processo de envelhecimento, visto que este fármaco já manifestou efeitos antienvhecimento como a inibição da via de sinalização de NF- κ B e a minimização da produção de espécies reativas de oxigênio (AMIN; LUX; O’CALLAGHAN, 2019; BATANDIER *et al.*, 2006; MOISEEVA *et al.*, 2013).

Nesse sentido, a neuroinflamação é um evento característico da fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas (GUZMAN-MARTINEZ *et al.*, 2019; ROTERMUND; MACHETANZ; FITZGERALD, 2018). No contexto da DA, por exemplo, a neuroinflamação se relaciona com declínio cognitivo, uma vez que pesquisas clínicas já encontraram associação positiva entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e prejuízo cognitivo em pacientes com DA ou idosos com algum grau de declínio cognitivo (HARRIES *et al.*, 2012; SOLFRIZZI *et al.*, 2006; WESTIN *et al.*, 2012). Ainda, também foi demonstrado que o tratamento anti-inflamatório de modelos animais de DA resulta em melhora de parâmetros de memória (GARCEZ *et al.*, 2017; GARCEZ *et al.*, 2019). Nesta mesma linha de raciocínio, a hipercolesterolemia já foi associada com inflamação sistêmica e cerebral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; SPARKS *et al.*, 2000; STREIT; SPARKS, 1997; THIRUMANGALAKUDI *et al.*, 2008).

A reatividade de astrócitos e micróglia, células residentes do SNC, são circunstâncias inerentes ao processo de propagação da neuroinflamação (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015). Os astrócitos, geralmente envolvidos na regulação metabólica, sustentação neuronal e sinaptogênese, podem ser ativados por vias inflamatórias mediadas por NF- κ B (LIAN *et al.*, 2015; MORALES *et al.*, 2014). No ambiente inflamatório, os astrócitos contribuem para a produção de espécies reativas de nitrogênio e de mediadores inflamatórios (CHEN *et al.*, 2016b; PHILLIPS *et al.*, 2014). Ademais, ocorre um aumento da expressão de GFAP, uma proteína constituinte do citoesqueleto de astrócitos que está relacionada com a sua reatividade (HOL; PEKONY, 2015). Neste trabalho, o modelo de hipercolesterolemia apresentou astrogliose em duas regiões do hipocampo, mas não no córtex pré-frontal, e a administração de metformina foi capaz de reduzir a astrogliose observada no

hipocampo. Estes dados condizem com estudos previamente publicados, que demonstraram aumento da marcação de GFAP no hipocampo de camundongos hipercolesterolêmicos LDLr^{-/-} ou induzidos por dieta (CHEN, *et al.*, 2016b; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Em camundongos diabéticos, o tratamento com metformina apresentou efeitos similares de diminuição da reatividade astrocitária no hipocampo (OLIVEIRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2021). A metformina também se mostrou capaz de reduzir a reatividade de astrócitos do hipocampo de modelos animais de Parkinson (MENDONÇA *et al.*, 2022) e de síndrome alcoólica fetal (SABZALI *et al.*, 2022).

Por sua vez, as micróglia tem um papel fundamental na resposta imune inata contra danos ao SNC (BACHILLER *et al.*, 2018). Estas células estão envolvidas em múltiplos processos, como a neurogênese, manutenção de sinapses e produção de citocinas pró-inflamatórias, com o intuito de manter a homeostase cerebral (PAOLICELLI; BISHT; TREMBLAY, 2014). A reatividade dessas células é funcionalmente diversa e depende do tipo, intensidade e contexto do estímulo desencadeador (GUZMAN-MARTINEZ *et al.*, 2019). Apesar de a reatividade microglial ter sido descrita em modelos animais de taupatas, obesidade, diabetes e hipercolesterolemia (BELLUCCI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2018; STREIT; SPARKS, 1997), os nossos resultados não apontaram diferenças entre os grupos com relação a densidade de micróglia, avaliada por meio do marcador IBA-1, no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais. Em correspondência, Xue, Sparks e Streit (2007) observaram o aumento da densidade de micróglia no hipocampo, mas não no córtex de coelhos hipercolesterolêmicos induzidos por dieta. Já Chen *et al.* (2018), observou um efeito significativo da idade sobre a densidade microglial no hipocampo de camundongos expostos a uma dieta hipercolesterolêmica; apenas os animais envelhecidos (16 meses) apresentaram aumento da marcação de IBA-1. Em estudos com modelos animais de DA e Parkinson, o tratamento com metformina diminuiu a imunorreatividade de IBA-1 no córtex pré-frontal, no hipocampo e na substância negra (LU *et al.*, 2016; OU *et al.*, 2018).

Outro ponto importante é que pesquisas clínicas com indivíduos diabéticos ou obesos são em sua maioria consonantes sobre os efeitos do tratamento com metformina sobre o perfil lipídico dos pacientes. A intervenção crônica ou aguda parece causar diminuição dos níveis de colesterol total e LDL, porém não influencia os níveis de triglicédeos e de HDL plasmáticos (GLUECK *et al.*, 2001; SEIFARTH; SCHEHLER; SCHNEIDER, 2013; WULFFELÉ *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2015). Em estudos com modelos animais de hipercolesterolemia, os resultados de tratamentos com o intuito de inibir mTOR são mais divergentes. Jahrling *et al.* (2018) não

observaram alterações no peso corporal e colesterol plasmático de camundongos LDLr^{-/-} submetidos ao tratamento com rapamicina para inibição direta de mTOR. O tratamento com metformina também não apresentou efeito significativo sobre os níveis de colesterol total, LDL e HDL de coelhos hipercolesterolêmicos induzidos por dieta (LUO *et al.*, 2017). Em nosso trabalho, a metformina não foi capaz de modular os níveis de colesterol total, e causou aumento dos triglicérides plasmáticos nos camundongos modelos de HF. Com relação ao peso corporal dos animais, os camundongos LDLr^{-/-} que foram administrados com metformina apresentaram perda de peso quando comparados com os camundongos WT tratados com metformina.

Desta forma, o presente estudo demonstrou experimentalmente efeitos benéficos da administração de metformina em camundongos LDLr^{-/-}. Nossos achados contribuem com a literatura atual acerca dos impactos de terapias emergentes sobre as alterações que relacionam a HF com distúrbios cerebrais e cognitivos associados à fisiopatologia de doenças neurodegenerativas.

7 CONCLUSÃO

Nesta dissertação, observamos que a exposição à metformina nos camundongos LDLr^{-/-} foi capaz de atenuar, pelo menos em parte, as alterações comportamentais causadas pela HF. Os camundongos LDLr^{-/-} tratados com metformina tiveram um melhor desempenho nos testes de avaliação de memória e uma diminuição do fenótipo depressivo, mas não apresentaram modificação na hiperlocomoção. A melhora comportamental causada pelo tratamento com a metformina foi associada a uma diminuição da densidade de astrócitos na região CA3 e giro denteado do hipocampo dos camundongos hipercolesterolêmicos. Por fim, a metformina reduziu o peso e aumentou os níveis de triglicerídeos, mas não modificou os níveis de colesterol, dos animais LDLr^{-/-}. Nossos dados apontam a metformina como potencial agente terapêutico para modular as alterações cerebrais induzidas por disfunções do metabolismo do colesterol, particularmente aquelas características da HF.

8 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos até o momento com esta pesquisa, é possível delinear algumas perspectivas futuras para o aperfeiçoamento das evidências levantadas. Logo, nós pretendemos realizar o ensaio de permeabilidade à fluoresceína de sódio para avaliação da permeabilidade da BHE, determinar por *Western blot* o padrão de expressão das proteínas AMPK e mTOR totais e fosforiladas em amostras cerebrais e também realizar ensaios de imunofluorescência utilizando o marcador CD68, para investigação de atividade fagocítica microglial.

REFERÊNCIAS

ABDO QAID, EY *et al.* The role of mTOR signalling pathway in hypoxia-induced cognitive impairment. **International Journal of Neuroscience**, v.131, n 5, p.482-488, 2021.

AKIOYAMEN, LE. *et al.* Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, v. 7, n. 9, 2017.

ALLARD, JS. *et al.* Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 1–9, 2016.

AMIN, S; LUX, A; O'CALLAGHAN, F. The journey of metformin from glycaemic control to mTOR inhibition and the suppression of tumour growth. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.85, n.1, p.37-46, 2019.

AN, WL *et al.* Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 2, p. 591–607, 2003.

ARIZA, M *et al.* Neuropsychological performance of Young familial hypercholesterolemia patients. **Eur J Intern Med**, v.34, p.29-31, 2019.

ASAI, A *et al.* Metformin Attenuates Early-Stage Atherosclerosis in Mildly Hyperglycemic Oikawa-Nagao Mice. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 26, n. 12, p. 1075–1083, 2019.

ASSINI, FL; DUZZIONI, M; TAKAHASHI, RN. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural brain research**, v. 204, n. 1, p. 206–211, 2009.

BACHILLER, S *et al.* Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 12, 2018.

BAIGENT, C *et al.* The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): A randomised placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9784, p. 2181–2192, 2011.

BARZILAI, N *et al.* Metformin as a Tool to Target Aging. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p.

1060–1065, 2016.

BATANDIER, C *et al.* The ROS Production Induced by a Reverse-Electron Flux at Respiratory-Chain Complex 1 is Hampered by Metformin. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** **2006** **38:1**, v. 38, n. 1, p. 33–42, 2006.

BELLUCCI, A *et al.* Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 5, p. 1643–1652, 2004.

BENITO-VICENTE, A *et al.* Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, 2018.

BJÖRKHEM, I; MEANEY, S; FOGELMAN, AM. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 5, p. 806–815, 2004.

BROWN, MS; GOLDSTEIN, JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34–47, 1986.

CACCAMO, A *et al.* Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- β , and Tau: Effects on cognitive impairments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 13107–13120, 2010.

CACCAMO, A *et al.* Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 23, p. 7988–7998, 2014.

CAMPBELL, JM *et al.* Metformin and Alzheimer's disease, dementia and cognitive impairment: a systematic review protocol. **JBI database of systematic reviews and implementation reports**, v.15, n.8, p. 2055-2059, 2017.

CHEN, F *et al.* Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid- β across the blood–brain barrier and memory impairment in db/db mice. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 123–136, 2016a.

CHEN, YL *et al.* Changes in astrocyte functional markers and β -amyloid metabolism-related proteins in the early stages of hypercholesterolemia. **Neuroscience**, v. 316, p. 178–191, 2016b.

Chen, Y *et al.* Pro- and Anti-inflammatory Effects of High Cholesterol Diet on Aged Brain. **Aging and disease**, v.9, n.3, p.374–390, 2018.

CLEARY, C *et al.* Antidepressive-like effects of rapamycin in animal models: Implications for mTOR inhibition as a new target for treatment of affective disorders. **Brain Research Bulletin**, v. 76, n. 5, p. 469–473, 2008.

CORTES, VA *et al.* Physiological and pathological implications of cholesterolFrontiers in Bioscience. **Frontiers in Bioscience**, 2014.

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

DE OLIVEIRA, J *et al.* Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 41, n. 1, p. 43–60, 2014.

DE OLIVEIRA, J *et al.* High Cholesterol Diet Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption in LDLr^{-/-} Mice: Impact on Cognitive Function. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 78, n. 1, p. 97–115, 2020.

DE OLIVEIRA, J *et al.* Inflammatory Cascade in Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Review of Experimental Findings. **Cells** **2021**, Vol. 10, Page 2581, v. 10, n. 10, p. 2581, 2021.

DIETSCHY, JM; TURLEY, SD. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. **Journal of lipid research**, v. 45, n. 8, p. 1375–1397, 2004.

DU, RW; BU, WG. Metformin improves depressive-like symptoms in mice via inhibition of peripheral and central NF- κ B-NLRP3 inflammation activation. **Experimental Brain Research**, v. 238, p. 2549–2556, 2020.

EHNINGER, D. From genes to cognition in tuberous sclerosis: Implications for mTOR inhibitor-based treatment approaches. **Neuropharmacology**, v. 68, p. 97–105, 2013.

ELDER, GA *et al.* Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Behavioural brain research**, v. 191, n. 2, p. 256, 2008.

ENGEL, DF *et al.* Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr(-/-) mouse experimental model. **Behavioural brain research**, v. 311, p. 31–38, 2016.

ENGEL, DF *et al.* Impaired adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of familial hypercholesterolemia: A role for the LDL receptor and cholesterol metabolism in adult neural precursor cells. **Molecular Metabolism**, v. 30, p. 1–15, 2019.

ETTCHETO, M *et al.* Hypercholesterolemia and neurodegeneration. Comparison of hippocampal phenotypes in LDLr knockout and APPswe/PS1dE9 mice. **Experimental Gerontology**, v. 65, p. 69–78, 2015.

FARR, SA *et al.* Metformin improves learning and memory in the samp8 mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 68, n. 4, p. 1699–1710, 2019.

FREITAS, EV (Ed.); PY, L. **Tratado de geriatria e gerontologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 1651 p.

GARCEZ, ML *et al.* Minocycline reduces inflammatory parameters in the brain structures and serum and reverses memory impairment caused by the administration of amyloid β (1-42) in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 77, p. 23–31, 2017.

GARCEZ, ML *et al.* The Involvement of NLRP3 on the Effects of Minocycline in an AD-Like Pathology Induced by β -Amyloid Oligomers Administered to Mice. **Molecular neurobiology**, v.56, n.4, p.2606–2617, 2019.

GIOVANNINI, MG; LANA, D. mTOR Involvement in the Mechanisms of Memory. In: Maiese K, editor. **Molecules to Medicine with mTOR**: translating critical pathways into novel therapeutic strategies. Newark: Cellular and molecular signaling, 2016.

GIRICZ, Z *et al.* Hypercholesterolemia downregulates autophagy in the rat heart. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, 2017.

GLAZER, HP *et al.* Hypercholesterolemia is associated with hyperactive cardiac mTORC1 and mTORC2 signaling. **Cell Cycle**, v.8, n.11, p.1738-1746, 2009.

GLUECK, CJ *et al.* Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 50, n. 7, p. 856–861, 2001.

GOLDSTEIN, JL; BROWN, MS. History of Discovery: The LDL Receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2009.

GOODARZI, MO; BRYER-ASH, M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 7, n. 6, p. 654–665, 2005.

GRECO, SJ *et al.* Leptin Reduces Pathology and Improves Memory in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, v. 19, n. 4, p. 1155–1167, 2010.

GUNTON, JE *et al.* Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1323–1332, 2003.

GUO, M *et al.* Metformin may produce antidepressant effects through improvement of cognitive function among depressed patients with diabetes mellitus. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 41, n. 9, p. 650–656, 2014.

GUZMAN-MARTINEZ, L *et al.* Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. SEP, p. 1008, 2019.

GWINN, DM. *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Molecular cell**, v. 30, n. 2, p. 214–226, 2008.

HARRIES, LW *et al.* Leukocyte CCR2 Expression Is Associated with Mini-Mental State Examination Score in Older Adults. **Rejuvenation research**, v. 15, n. 4, p. 395–404, 2012.

HEGELE, RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 2, p. 109–121, 2009.

HEPPNER, FL; RANSOHOFF, RM; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience** 2015 16:6, v. 16, n. 6, p. 358–372, 2015.

HOL, EM; PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Current opinion in cell biology**, v. 32, p. 121–130, 2015.

HOWARD, MW; EICHENBAUM, H. Time and space in the hippocampus. **Brain research**, v. 1621, p. 345–354, 2015.

HSU, CC *et al.* Incidence of dementia is increased in type 2 diabetes and reduced by the use of sulfonylureas and metformin. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 24, n. 3, p. 485–493, 2011.

JAHRLING, JB. *et al.* mTOR drives cerebral blood flow and memory deficits in LDLR^{-/-} mice modeling atherosclerosis and vascular cognitive impairment. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 38, n. 1, p. 58–74, 2018.

JUNG, C *et al.* mTOR regulation of autophagy. **FEBS Lett**, v. 584, n. 7, p. 1287–1295, 2010.

KARUMAN, P *et al.* The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. **Molecular Cell**, v. 7, n. 6, p. 1307–1319, 2001.

KIVIPELTO, M *et al.* Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 322, n. 7300, p. 1447–1451, 2001.

LAMANNA, C. *et al.* Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 13, n. 3, p. 221–228, 2011.

LAMOIA, TE; SHULMAN, GI. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 1, p. 77, 2021.

LANA, D *et al.* Hippocampal long term memory: effect of the cholinergic system on local protein synthesis. **Neurobiology of learning and memory**, v. 106, p. 246–257, 2013.

LANA, D *et al.* Rapamycin inhibits mTOR/p70S6K activation in CA3 region of the hippocampus of the rat and impairs long term memory. **Neurobiology of learning and memory**, v.137, p.15–26, 2017.

LAPLANTE, M; SABATINI, DM. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012.

LENNOX, R *et al.* Comparison of the independent and combined effects of sub-chronic

therapy with metformin and a stable GLP-1 receptor agonist on cognitive function, hippocampal synaptic plasticity and metabolic control in high-fat fed mice. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 22–30, 2014.

LEONI, V; CACCIA, C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: A marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. **Biochimie**, 2013.

LEWIS, GF; RADER, DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circulation research**, v. 96, n. 12, p. 1221–1232, 2005.

LI, W *et al.* Metformin alters locomotor and cognitive function and brain metabolism in normoglycemic mice. **Aging and Disease**, v. 10, n. 5, p. 949–963, 2019.

LIAN, H *et al.* NFκB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 85, n. 1, p. 101–115, 2015.

LIN, Y *et al.* Metformin alleviates the depression-like behaviors of elderly apoE4 mice via improving glucose metabolism and mitochondrial biogenesis. *Behavioural Brain Research*, [s. l.], v. 423, p. 113772, 2022.

LU, M *et al.* Metformin Prevents Dopaminergic Neuron Death in MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease via Autophagy and Mitochondrial ROS Clearance. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 9, p. 1–11, 2016.

LUO, F *et al.* Combined use of metformin and atorvastatin attenuates atherosclerosis in rabbits fed a high-cholesterol diet. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

LUO, J; YANG, H; SONG, BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. **Nature Research**, 2020.

MAHLEY, RW *et al.* Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. **Journal Lipid Research**, v. 25, p. 1277–1294, 1984.

MARIANI, E; MONASTERO, R; MECOCCHI, P. Mild cognitive impairment: a systematic review. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 12, n. 1, p. 23–35, 2007.

MENDONÇA, IP *et al.* Metformin and fluoxetine improve depressive-like behavior in a murine model of Parkinson's disease through the modulation of neuroinflammation,

neurogenesis and neuroplasticity. **International Immunopharmacology**, v. 102, p. 108415, 2022.

MOISEEVA, O *et al.* Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. **Aging cell**, v. 12, n. 3, p. 489–498, 2013.

MORALES, I *et al.* Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, n. 1 APR, 2014.

MOREIRA, ELG *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. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 32, n. 2, p. 495–511, 2012.

MOREIRA, EL *et al.* Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? **J Neural Transm**, v.121, n.4, p.415-426, 2014.

MOZAFFARIAN, D *et al.* Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. 29–39, 2015.

MULDER, M *et al.* LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. **Neuroscience Research**, v. 59, n. 3, p. 251–256, 2007.

MULDER, M *et al.* Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. **Neurobiology of Disease**, v. 16, n. 1, p. 212–219, 2004.

NARWAL, V *et al.* Cholesterol biosensors: A review. **Steroids**, v. 143, p. 6-17, 2019.

NG, TP *et al.* (2014). Long-term metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 41, n. 1, p. 61–68, 2014.

NING, J; CLEMMONS, DR. AMP-Activated Protein Kinase Inhibits IGF-I Signaling and Protein Synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells via Stimulation of Insulin Receptor Substrate 1 S794 and Tuberous Sclerosis 2 S1345 Phosphorylation. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 6, p. 1218, 2010.

NELSON, DL; COX, MM. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, WH *et al.* Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. **Brain Research**, v. 1644, p. 149–160, 2016.

OLIVEIRA, WH *et al.* Metformin prevents p-tau and amyloid plaque deposition and memory impairment in diabetic mice. **Experimental Brain Research**, v. 239, n. 9, p. 2821–2839, 2021.

OLSON, RE. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 2 Suppl, 1998.

OU, Z *et al.* Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 69, p. 351–363, 2018.

PALOMBO, DJ.; KEANE, MM; VERFAELLIE, M. Does the hippocampus keep track of time?. **Hippocampus**, v. 26, n. 3, p. 372–379, 2016.

PAOLICELLI, RC; BISHT, K; TREMBLAY, ME. Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, n. MAY, 2014.

PERNICOVA, I; KORBONITS, M. Metformin-Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, v.10, n.3, p.143-156, 2014.

PETERSEN, RC. *et al.* Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Archives of neurology**, v. 56, n. 3, p. 303–308, 1999.

PETRIE, JR *et al.* Metformin in adults with type 1 diabetes: Design and methods of REducing with MetfOrmin Vascular Adverse Lesions (REMOVAL): An international multicentre trial. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 19, n. 4, p. 509–516, 2017.

PFRIEGER, FW; UNGERER, N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 4, p. 357–371, 2011.

PHILLIPS, EC. *et al.* Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Biochemical Society transactions**, v. 42, n. 5, p. 1321–1325, 2014.

PINTANA, H *et al.* Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 11–12, p. 409–414, 2012.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

PUIGHERMANAL, E *et al.* Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 1152–1158, 2009.

REFOLO, LM *et al.* Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. **Neurobiol Dis**, v.7, p.321-331, 2000.

REITZ, C; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p.640-651, 2014.

RÉUS, GZ; QUEVEDO, J; RODRIGUES, ALS. mTOR signaling in the neuropathophysiology of depression: Current evidence. **Journal of Receptor, Ligand and Channel Research**, v. 8, n. November, p. 65–74, 2015.

RODRIGUES, MS *et al.* Nanotechnology as a therapeutic strategy to prevent neuropsychomotor alterations associated with hypercholesterolemia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 201, 2021.

ROJAS, LBA; GOMES, MB. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome 2013 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2013.

ROTERMUND, C; MACHETANZ, G; FITZGERALD, JC. The therapeutic potential of metformin in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v.9, 2018.

SABZALI, M *et al.* Anti-inflammatory, Antioxidant, and Antiapoptotic Action of Metformin Attenuates Ethanol Neurotoxicity in the Animal Model of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **Neurotoxicity Research**, v. 40, n. 2, p. 605–613, 2022.

SARBASSOV, DD. *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. **Mol Cell**, v. 22, n. 2, p. 159–168, 2006.

SCHADE, S; SHEY, L; EATON, RP. Cholesterol review: A metabolically important molecule. **American Association of Clinical Endocrinologists**, 2020.

SEIFARTH, C; SCHEHLER, B; SCHNEIDER, HJ. Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v.121, n.1, p.27–31, 2013.

SHAW, RJ *et al.* Medicine: The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. **Science**, v. 310, n. 5754, p. 1642–1646, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, 2017.

SOLFRIZZI, V *et al.* Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. **Clinica Chimica Acta**, v. 364, n. 1–2, p. 91–112, 2006.

SOLOMON, A *et al.* Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. **Dementia and geriatric cognitive disorders**, v. 28, n. 1, p. 75–80, 2009.

SONG, M *et al.* Chronic high-fat diet-induced obesity in gerbils increases pro-inflammatory cytokines and mTOR activation, and elicits neuronal death in the striatum following brief transient ischemia. **Neurochemistry International**, v. 121, p. 75–85, 2018.

SPARKS, DL *et al.* Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v.11, n.6, p.601-607, 1990.

SPARKS, DL *et al.* Alterations of Alzheimer's Disease in the Cholesterol-fed Rabbit, Including Vascular Inflammation Preliminary Observations. **Ann N Y Acad Sci**, 2000.

SPILMAN, P *et al.* Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid- β levels in a mouse model of alzheimer's disease. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

STERU, L *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

STREIT, WJ; SPARKS, DL. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. **Journal of molecular medicine**, v. 75, n. 2, p. 130–138, 1997.

STREKALOVA, T *et al.* Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. **Brain, behavior, and immunity**, v. 48, p. 42–47, 2015.

SUGIYAMA, D *et al.* Risk of Hypercholesterolemia for Cardiovascular Disease and the Population Attributable Fraction in a 24-year Japanese Cohort Study. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.22, n.1, p. 95-107, 2015.

TABAS, I. Cholesterol in health and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 5, p. 583–590, 2002.

THANGTHAENG, N *et al.* Metformin Impairs Spatial Memory and Visual Acuity in Old Male Mice. **Aging and disease**, v. 8, n. 1, p. 17–30, 2017.

THIRUMANGALAKUDI, L *et al.* High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **Journal of neurochemistry**, v. 106, n. 1, p. 475–485, 2008.

VAN SKIKE, CE. *et al.* Inhibition of mTOR protects the blood-brain barrier in models of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 314, n. 4, p.693–703, 2018.

VIOLLET, B *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**, v. 122, n. 6, p. 253–270, 2012.

VOET, D; VOET, JG; PRATT, CW. **Fundamentos de bioquímica: A vida em nível molecular**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

WANG, C *et al.* Differential effects of metformin on age related comorbidities in older men with type 2 diabetes. **Journal of diabetes and its complications**, v. 31, n. 4, p. 679–686, 2017.

WANG, T *et al.* High cholesterol and 27-hydroxycholesterol contribute to phosphorylation of tau protein by impairing autophagy causing learning and memory impairment in C57BL/6J mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 106, p. 109016, 2022.

WANG, Y *et al.* Metformin exerts antidepressant effects by regulated DNA hydroxymethylation. **Epigenomics**, v. 11, n. 6, p. 655–667, 2019.

WESTIN, K *et al.* CCL2 Is Associated with a Faster Rate of Cognitive Decline during Early Stages of Alzheimer's Disease. **PLOS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

WULFFELÉ, MG *et al.* The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: A systematic review. **Journal of Internal Medicine**, v. 256, n. 1, p. 1–14, 2004.

XIONG, R *et al.* Lychee seed polyphenol protects the blood-brain barrier through inhibiting A β (25-35)-induced NLRP3 inflammasome activation via the AMPK/mTOR/ULK1-mediated autophagy in bEnd.3 cells and APP/PS1 mice. **Phytotherapy research : PTR**, v. 35, n. 2, p. 954–973, 2021.

XU, T *et al.* Effects of metformin on metabolite profiles and LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 10, p. 1858–1867, 2015.

XUE, QS; Sparks, DL; Streit, WJ. Microglial activation in the hippocampus of hypercholesterolemic rabbits occurs independent of increased amyloid production. **Journal of neuroinflammation**, 2007.

YANG, F *et al.* Metformin Inhibits the NLRP3 Inflammasome via AMPK/mTOR-dependent Effects in Diabetic Cardiomyopathy. **Int J Biol Sci**, v.15, n.5, p.1010-1019, 2019.

YING, M *et al.* Metformin: repurposing opportunities for cognitive and mood dysfunction. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 13, n. 10, p. 1836–1845, 2014.

ZAMBÓN, D *et al.* Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **Am J Med**, v.123, n.3, p.267-274, 2010.

ZEMDEGS, J *et al.* Metformin Promotes Anxiolytic and Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 30, p. 5935–5948, 2019.

ZHAO, M *et al.* Neuro-Protective role of metformin in patients with acute stroke and type 2 diabetes mellitus via ampk/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway and oxidative stress. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 2186–2194, 2019.

ZHOU, G *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167–1174, 2001.

ZHOU, M *et al.* mTOR Inhibition ameliorates cognitive and affective deficits caused by Disc1 knockdown in adult-born dentate granule neurons. **Neuron**, v. 77, n. 4, p. 647–654, 2013.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 41034

Título: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA METFORMINA NAS ALTERAÇÕES COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Vigência: 01/09/2021 à 01/09/2025

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

Jade De Oliveira - coordenador desde 01/09/2021
Natália Baltazar do Nascimento - desde 01/09/2021
Matheus Scarpatto Rodrigues - desde 01/09/2021
Hémelin Resende Farias - desde 01/09/2021

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 276 camundongos machos adultos (90 dias de idade), 138 da linhagem C57BL/6 selvagens e 138 animais LDLr-/-, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 23 de Agosto de 2021

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética