

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

Gabriela Joras Baumart

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO DO COLESTEROL-LDL NOS ASTRÓCITOS:
ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Porto Alegre, RS
2023

Gabriela Joras Baumart

IMPACTO DA EXPOSIÇÃO DO COLESTEROL-LDL NOS ASTRÓCITOS: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*

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 mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jade de Oliveira

Porto Alegre, RS
2023

CIP - Catalogação na Publicação

Baumart, Gabriela Joras
Impacto da exposição do colesterol-LDL nos
astrócitos: Estudo in vitro e in vivo / Gabriela Joras
Baumart. -- 2023.
94 f.
Orientadora: Jade de Oliveira.

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, 2023.

1. Astrócitos. 2. Hipercolesterolemia. 3.
Metabolismo. 4. Gotículas lipídicas. I. de Oliveira,
Jade, orient. II. Título.

A atenção se assemelha ao amor.

Louis Lavelle.

*“(...) Aquelas que sabem que a aproximação,
do que quer que seja, se faz gradualmente
e penosamente - atravessando inclusive o
oposto daquilo que se vai aproximar.”*

A paixão segundo G.H. Clarice Lispector.

Para I. M. B

*que me ensinou, mesmo sem querer, que
o mundo está cheio de coisas para se ler.*

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão especial vai para aqueles que conseguiram tempo para ler, oferecer comentários e observações construtivas: A orientadora Jade de Oliveira, obrigada pelo acolhimento e todo suporte; a prof^a Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma pelas inúmeras conversas e ao professor Fabrício Figueiró pela parceria. Muito obrigada ainda aos professores componentes da banca examinadora: Andreza Fabro de Bem, Eduardo Rigon Zimmer e Marina Concli Leite.

Agradeço a prof^a Cristina Wayne Nogueira, importante para que a vontade de saber sobre bioquímica tivesse desabrochado.

Por fim, um super obrigada aos colegas dos lab's 21 e 22, *peças centrais* no tabuleiro!

PREÂMBULO

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em três partes, parte I, II e III, em concordância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica (PPGBIOQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

PARTE I - Sumário, Resumo, Abstract, Lista de abreviações e siglas, Introdução e Objetivos;

PARTE II - Materiais e métodos e Resultados, organizados na forma de artigo em construção para futura publicação;

PARTE III - Discussão, Conclusão, Perspectivas e Referências bibliográficas.

SUMÁRIO

Parte I	8
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 METABOLISMO DO COLESTEROL NOS TECIDOS PERIFÉRICOS E NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	15
1.2 HIPERCOLESTEROLEMIA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	20
1.3 ASTRÓCITOS EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS.....	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
Parte II	29
Artigo em preparação	30
Parte III	69
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÃO	76
7 PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMO

Os astrócitos são as principais células de defesa antioxidante no encéfalo, protegem o sistema nervoso central por meio de resposta inflamatória controlada e atuam como fornecedores metabólicos para os neurônios. Em condições patológicas, como em doenças neurodegenerativas, essas células podem sofrer alterações morfológicas, funcionais e moleculares. Estudos têm demonstrado a relação entre hipercolesterolemia, principalmente, os níveis aumentados de colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade (LDL) e alterações cerebrais como astrogliose hipocampal. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a investigação dos efeitos do colesterol-LDL nos astrócitos com enfoque na análise de possíveis mudanças metabólicas, morfológicas e funcionais. Inicialmente, no estudo *in vitro*, as células da linhagem de glioma C6 de rato em alta passagem foram incubadas com colesterol-LDL humano (50 e 300 µg/mL) por 24h e 48h. Após a incubação, foram analisados parâmetros metabólicos, proliferativos, formação de gotículas lipídicas (LDs), produção de espécies reativas e defesas antioxidantes. Além disso, no modelo *in vivo* foi realizada a análise morfológica dos astrócitos no hipocampo de camundongos machos C57BL/6 selvagens e nocautes para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) com 3 e 14 meses de idade. Na cultura de astrócitos, a exposição ao colesterol-LDL aumentou as LDs e diminuiu a expressão do receptor de LDL (LDLr) e da 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase em ambos períodos de incubação. Além disso, o colesterol-LDL causou nos astrócitos diminuição da captação de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), produção de espécies reativas e atividade da superóxido dismutase em 24h e aumentou os níveis de CD36 em 48h. Ainda, a modulação da atividade metabólica nas células expostas ao LDL parece ser dependente da concentração e do tempo de incubação. Na região CA3 hipocampal, os camundongos LDLr^{-/-} de 14 meses apresentaram um aumento no número de processos em comparação com os C57BL/6 selvagens de 3 meses. Propomos que modificações metabólicas e morfológicas nos astrócitos induzidas pelo colesterol-LDL podem contribuir para o desenvolvimento de neuropatologias.

Palavras-chave. Astrócitos. Hipercolesterolemia. Metabolismo. Gotículas lipídicas.

ABSTRACT

Astrocytes are the primary antioxidant defense cells of the brain, protecting the central nervous system through a controlled inflammatory response and acting as metabolic suppliers to neurons. These cells exhibit morphological, functional and molecular changes in pathological conditions such as neurodegenerative diseases. Studies have shown a relationship between hypercholesterolemia, mainly increased low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, and brain disorders such as hippocampal astrogliosis. In this sense, the present work aimed to investigate the effects of LDL cholesterol on astrocytes, focusing on the analysis of possible metabolic, morphological and functional changes. First, in the *in vitro* study, high-passage rat C6 glioma cells were incubated with human LDL cholesterol (50 and 300 µg/mL) for 24 and 48 hours. After incubation, metabolic and proliferative parameters, lipid droplet (LD) formation, production of reactive species and antioxidant defense were analyzed. Morphological analysis of hippocampal astrocytes from male C57BL/6 wild-type and LDL receptor (LDLr^{-/-}) knockout mice at 3 and 14 months of age was also performed *in vivo*. In astrocyte culture, exposure to LDL cholesterol increased LDs and down regulated the expression of LDL receptor (LDLr) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase in both incubation periods. In addition, LDL cholesterol decreased long-chain fatty acid uptake, reactive species, and superoxide dismutase activity at 24 hours and increased CD36 levels at 48 hours. Furthermore, the modulation of metabolic activity in cells exposed to LDL appeared to be dependent on concentration and incubation time. In the hippocampal CA3 region, 14-month-old LDLr^{-/-} mice showed an increase in the number of processes compared to 3-month-old wild-type C57BL/6 mice. We propose that metabolic and morphological changes in astrocytes induced by LDL cholesterol may contribute to the development of neuropathologies.

Keywords: Astrocytes. Hypercholesterolemia. Metabolism. Lipid droplets.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

A β - β -amiloide

ACAT1 - Acetil-CoA colesterol acetiltransferase

AGCL - Ácidos graxos de cadeia longa

AGs - Ácidos graxos

ALDH1L1 - Aldeído desidrogenase

AMP - Adenosina monofosfato

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato

ANLS - Hipótese do transporte de lactato astrócitos-neurônios

ApoB-100 - Apolipoproteína B-100

ApoE - Apolipoproteína E

Apos - Apolipoproteínas

AQP4 - Aquaporina

ATP - Adenosina trifosfato

AVC - Acidente vascular cerebral

BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo

BHE - Barreira hematoencefálica

CAT - Catalase

CT - Colesterol total

CYP46A1 - Citocromo P450

Cx43 - Conexina 43

Cx30 - Conexina 30

C1q - Componente 1q do complemento

DA - Doença de Alzheimer

DAC - Doença arterial coronariana

DN - Doenças neurodegenerativas

EAAT1 - Transportador de aminoácido excitatório-1

EAAT2 - Transportador de aminoácido excitatório-2

EOAD - Doença de Alzheimer do tipo familiar e de início precoce

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial
GLAST - Transportador de glutamato aspartato glutamina sintetase
GLT-1 - Transportador de glutamato-1
GLUT1 - Transportador de glicose 1
GPx - Glutaciona peroxidase
GS - Glutamina sintetase
GSH - Glutaciona
HDL - Lipoproteínas de alta densidade
HF - Hipercolesterolemia familiar
HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
HMGCR - HMG-CoA redutase
HMGCS - HMG-CoA sintase
ICV - Intracerebroventricular
IDL - Lipoproteínas de densidade intermediária
IL-1 α - Interleucina-1 α
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-6 - Interleucina-6
IL-10 - Interleucina-10
Insig - Proteína induzida pelo gene da insulina
JAM-A - Molécula de adesão juncional A
KO - Nocaute
KR - Via de Kandutsch-Russell
LCAT - Lecitina-colesterol-aciltransferase
LDH - Lactato desidrogenase
LDL - Lipoproteínas de baixa densidade
LDLr - Receptores de LDL
LDs - Gotículas lipídicas
LOAD - Doença de Alzheimer do tipo esporádica e de início tardio
LRP1 - Proteína relacionada ao receptor de LDL 1
LXR- Fator de transcrição nuclear receptor hepático X
MCI - Comprometimento cognitivo leve

MCT - Transportadores de monocarboxilato
mGluR - Receptores metabotrópicos de glutamato
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NCLX - Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial astrocitário
NMDA - N-metil-D-aspartato
NPC1 - Proteína Niemann-Pick tipo C1
NPC2 - Proteína Niemann-Pick tipo C2
24-OHC - 24-hidroxicolesterol
oxLDL - Lipoproteínas de baixa densidade na forma oxidada
PET - Tomografia por emissão de pósitrons
RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
ROS - Espécies reativas de oxigênio
S100B - Proteína B de ligação ao cálcio S100
SCAP - Proteína de ativação de clivagem da SREBP
SN - Sistema nervoso
SNC - Sistema nervoso central
SOD - Superóxido dismutase
SREBPs - Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol
TAGs - Triglicerídeos
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α - Fator tumoral de necrose alfa
VLDL- Lipoproteínas de muito baixa densidade

1 INTRODUÇÃO

Em 1907, o psiquiatra e neuroanatomista, Alois Alzheimer, por meio de um exame histológico *post mortem*, descreveu como uma das características da patologia que depois ficou conhecida como doença de Alzheimer (DA), o acúmulo de “*adipose saccules*” em células gliais e em neurônios da paciente Auguste Deter que foi a óbito com 51 anos após manifestar uma série de síndromes demenciais (ALZHEIMER *et al.*, 1907; KRAEPELIM, 1910). No entanto, ao contrário dos emaranhados neurofibrilares intracelulares, originados pelo agrupamento de proteínas tau hiperfosforiladas, bem como o acúmulo de placas amiloides extracelulares, formadas pelo peptídeo beta-amiloide (A β), a identificação dos conteúdos lipídicos não recebeu a devida atenção por muito tempo (FOLEY *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2017; KNOPMAN *et al.*, 2021). Esses achados provavelmente consistiam em gotículas lipídicas, do inglês “*lipid droplets (LDs)*”, os quais são depósitos lipídicos, constituídas por diferentes proporções de ácidos graxos (AGs), glicolipídios, glicerofosfolípidos, esfingolipídios, colesterol e outros esteróis (FOLEY, 2010; RUDGE, 2022).

De particular importância, nas últimas décadas, um dos componentes das LDs, o colesterol - e sua via metabólica - vem sendo relacionado ao desenvolvimento de demência, particularmente a DA (SPARKS *et al.*, 1994, 2000; KIVIPERTO 2001; SPARKS, 2008; THIRUMANGALAKUDI *et al.*, 2008; SOLOMON *et al.*, 2009; HUI *et al.*, 2012; ELAHI; MILLER, 2017; RUTKOWSKY *et al.*, 2018). É importante mencionar que em condições fisiológicas a barreira hematoencefálica (BHE) não permite que os carreadores de colesterol periféricos, as lipoproteínas (principalmente, as lipoproteínas de baixa densidade - LDL), transpassem para o parênquima cerebral, ou seja, quase todo o colesterol do SNC é de origem local, isto é, as células realizam sua própria síntese. Portanto, o metabolismo do colesterol no SNC é independente daquele nos tecidos periféricos. Aproximadamente 23% de todo o colesterol do corpo humano encontra-se no encéfalo e entre as células que mais realizam a biossíntese *de novo* de colesterol, destacam-se os astrócitos (DIETSCHY; TURLEY, 2004; MAHLEY, 2016).

Além dos variados tipos de neurônios e suas complexas redes neurais, as células da glia distinguem-se como um outro grupo celular que compõem a massa encefálica

total. Quanto ao número e distribuição de neurônios e células gliais, ambos variam de acordo com a espécie de mamífero estudada e a estrutura analisada. No “total” a proporção glia/neurônio é aproximadamente a mesma no encéfalo humano. No entanto, normalmente, maior quantidade de células gliais são verificadas no córtex e no hipocampo, enquanto que no cerebelo há muito mais neurônios (HERCULANO-HOUZEL; LENT, 2005; AZEVEDO, 2009; HERCULANO-HOUZEL, 2015, 2018; VON BARTHELD *et al.*, 2016). Ademais, de acordo com a origem embriológica, as células da glia dividem-se em macroglia e microglia. Os astrócitos fazem parte do grupo das macroglias e são células especializadas de origem neuroepitelial, assim como os oligodendrócitos, as células de Schwann e as células endimárias. Junto com os oligodendrócitos, os astrócitos são as células mais numerosas da macroglia, fato que pode ser relacionado à diversidade de funções que essas células desempenham (KRIEGSTEIN, 2009; GINHOUX, 2013).

1.1 METABOLISMO DO COLESTEROL NOS TECIDOS PERIFÉRICOS E NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O colesterol é essencial para o funcionamento das células, uma vez que é um importante componente estrutural responsável por regular a fluidez e permeabilidade das membranas celulares. Além disso, o colesterol é precursor biossintético de ácidos biliares, hormônios esteroides e vitamina D (KORINEK *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2020; DUAN *et al.*, 2022). Já no SNC, suas funções dividem-se em ser constituinte da bainha de mielina, estrutura biológica responsável pela rápida condução dos potenciais de ação dos neurônios, e modular a plasticidade, contribuindo para a diferenciação neural, sinaptogênese e neurogênese (GORITZ *et al.*, 2005; BERGHOFF *et al.*, 2022). No entanto, quando o colesterol está em excesso, e as condições homeostáticas normais perturbadas, este lipídio pode estar envolvido no desenvolvimento de patologias.

Em condições fisiológicas, o suprimento de colesterol para os tecidos periféricos é realizado pela biossíntese *de novo* hepática (via endógena, maior proporção) e ingestão alimentar (via exógena) (CERQUEIRA *et al.*, 2016). A via biossintética inicia-se com a condensação de moléculas de acetil-CoA e formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-

Coenzima A (HMG-CoA) via catálise da HMG-CoA sintase (HMGCS) citosólica (SHI *et al.*, 2022). Após a produção de HMG-CoA, a HMG-CoA redutase (HMGCR) reduz a HMG-CoA em mevalonato, reação dependente de moléculas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) doadoras de elétrons. A reação catalisada pela enzima HMGCR é considerada a etapa limitante e irreversível da síntese do colesterol. Logo após a conversão em mevalonato, uma série de reações de fosforilação, condensação e ciclização são desencadeadas até a produção de colesterol (CERQUEIRA *et al.*, 2016). Todo esse processo de síntese ocorre na maioria das células, mas preferencialmente nas células constituintes do fígado. Apesar do colesterol livre sintetizado ser anfipático, o colesterol é mais comumente transportado na forma de éster de colesterol, que é apolar. Portanto, para se deslocar no plasma sanguíneo para outros tecidos, os ésteres de colesterol necessitam de carreadores, as lipoproteínas (GOLDSTEIN; BROWN, 1977; BROWN; GOLDSTEIN, 1986; NELSON; COX, 2017).

As lipoproteínas são partículas constituídas de colesterol, ésteres de colesterol, triglicerídeos (TAGs) e fosfolípidos rodeadas por proteínas específicas, as apolipoproteínas (Apos). As Apos, por serem mais polares, facilitam o transporte dos lipídios no plasma, além de direcionarem as lipoproteínas para receptores específicos. As principais classes de lipoproteínas plasmáticas humanas são os quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), LDL e lipoproteínas de alta densidade (HDL). Estas partículas são divididas com base no seu tamanho e na sua densidade, o que está diretamente relacionado à composição lipídica. Ademais, todas as lipoproteínas apresentam uma função específica determinada por sua síntese e conteúdo de Apos (NOELS *et al.*, 2021; BORÉN *et al.*, 2022).

A via endógena das lipoproteínas inicia-se no fígado com a produção de VLDL. Os TAGs transportados em VLDL são metabolizados em tecidos periféricos pela lipase lipoproteica, liberando AGs livres e formando as IDL. As IDL são rapidamente metabolizadas em LDL ricas em colesterol, partículas formadas também por ApoB-100, que são reconhecidas pela família de receptores LDL (LDLr) em vários tecidos, incluindo o fígado. O colesterol deslocado novamente para o fígado pode ser incorporado nas

membranas dos hepatócitos, ser precursor biossintético ou ainda, esterificado para armazenamento intracelular em LDs (CERQUEIRA *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2022).

Nos tecidos periféricos, a família de LDLr são os principais responsáveis pelo reconhecimento e endocitose mediada por receptor do colesterol-LDL. A endocitose é essencial para regular a concentração de colesterol-LDL no sangue, pois quando em concentrações exacerbadas e em um ambiente suscetível ao desequilíbrio redox, as LDL podem sofrer oxidação. As formas oxidadas da LDL (oxLDL) são reconhecidas via receptores “scavengers” amplamente expressos em macrófagos. Em um primeiro momento, os macrófagos fagocitam as oxLDL para serem degradadas, porém, quando as altas concentrações das formas oxidadas estabelecem um ambiente inflamatório exacerbado - com prejuízos nas vias de degradação - a aterosclerose instala-se nas íntimas das artérias (GOLDSTEIN; BROWN, 2015; CERQUEIRA *et al.*, 2016; KHATANA *et al.*, 2020). Assim, enquanto que as LDL são pró-aterogênicas, as HDL são anti-aterogênicas devido ao transporte reverso do colesterol dos tecidos periféricos, que incluem as íntimas das artérias, para o fígado (FEINGOLD, 2021). Por fim, a via exógena das lipoproteínas nada mais é do que a incorporação dos lipídios da dieta aos quilomícrons e seu metabolismo.

O nível intracelular de colesterol e o estado energético das células regulam a síntese endógena do colesterol, pois afetam a atividade, a degradação e a expressão da enzima HMGCR, assim como outras enzimas do metabolismo. Uma vez que a via de síntese é dependente de adenosina trifosfato (ATP) para as reações de fosforilação, as baixas concentrações de ATP e as altas concentrações de adenosina monofosfato (AMP) inativam a HMGCR por fosforilação pela proteína-cinase dependente de AMP (AMPK), afetando sua atividade e diminuindo a produção de colesterol. Essa inativação também ocorre via fosforilação por meio da cascata de sinalização induzida pelo glucagon e por proteólise da enzima na presença de oxisteróis, tais como o 24-hidroxicolesterol (24-OHC). Por outro lado, o hormônio insulina promove a sua desfosforilação, ativando-a e favorecendo a síntese de colesterol (TRAPANI; SEGATTO; PALLOTTINI, 2012; CERQUEIRA *et al.*, 2016). Quanto à expressão da HMGCR, essa, bem como outras enzimas e receptores envolvidos no metabolismo do colesterol são reguladas no retículo endoplasmático pelas proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol, do

inglês “*sterol regulatory element-binding proteins*” (SREBPs), que agrupadas com outras proteínas de reconhecimento de esterol, Insig e SCAP, auxiliam na liberação ou não de fragmentos do domínio regulatório das SREBPs capazes de agirem no núcleo e ativar a transcrição gênica (TRAPANI; SEGATTO; PALLOTTINI, 2012). A baixa concentração de colesterol faz com que as SREBPs sejam processadas proteoliticamente para produzirem fragmentos ativos que entram no núcleo celular e induzem a expressão de seus genes-alvo, p. ex., LDLR, HMGCR; enquanto que a alta concentração bloqueia a transcrição dos genes colesterogênicos (BROWN; GOLDSTEIN, 1999). Ademais, altas concentrações de oxisteróis ativam o fator de transcrição nuclear receptor hepático X (LXR) que atua na expressão de genes do metabolismo dos lipídios e da glicose que acoplam o metabolismo de lipídios e esteróis a respostas inflamatórias (BERGHOFF *et al.*, 2022). Em vista disso, infere-se que o nível de colesterol celular reflete o equilíbrio dinâmico entre biossíntese, captação, exportação e esterificação (LUO, 2020).

Por sua vez, a produção de colesterol no SNC apresenta diferenças quanto ao período de desenvolvimento do encéfalo. Até a primeira infância, etapa do pico de mielinização, sua síntese é regulada positivamente na maioria das células: neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia, e, estima-se que a meia-vida desse esterol seja entre seis meses a cinco anos (SAHER *et al.*, 2005). Já no encéfalo humano adulto, essa produção é mais tênue, principalmente realizada pelos oligodendrócitos e astrócitos (SIMONS; IKONEN, 2000; TRAPANI; SEGATTO; PALLOTTINI, 2012; ZHANG; LIU, 2015; JIN *et al.*, 2019). O colesterol sintetizado no SNC possui rotas de síntese semelhantes ao colesterol sintetizado no fígado e nos tecidos periféricos, entretanto não há formação de lipoproteínas. Após a produção de colesterol, esse se desloca até a membrana plasmática para se ligar as Apos, como a ApoE que é altamente expressa nos astrócitos (ZHANG; LIU, 2015). Nos astrócitos, o colesterol é sintetizado pela via de Bloch, enquanto que nos neurônios a via de síntese é a de Kandutsch-Russell (KR). As diferentes vias explicam em parte porque o colesterol sintetizado nos astrócitos é normalmente deslocado para os neurônios, uma vez que as células excitáveis não produzem colesterol de maneira eficiente dada a dificuldade em converter o lanosterol em desmosterol pela via de KR, ou seja, os neurônios e os astrócitos possuem diferentes perfis de enzimas biossintéticas, precursores pós-esqualeno e metabólitos do colesterol

(NIEWEG *et al.*, 2009). No entanto, salienta-se que durante o desenvolvimento do encéfalo, os neurônios possuem síntese ativa de colesterol *de novo* por meio da via de Bloch, via que possivelmente é substituída pela KR com o passar do tempo (GENAROMATTOS *et al.*, 2019).

A ApoE transfere o colesterol astrocitário por meio dos transportadores de membrana ABC do inglês “*ATP-binding cassette*” e nos neurônios, os receptores LDLr, VLDLR, ApoER2, proteína relacionada ao receptor de LDL 1 (LRP1) e outros receptores relacionados à endocitose de lipoproteínas medeiam a entrada de colesterol-ApoE (HUI *et al.*, 2012). Fisiologicamente, o LDLr é mais expresso na glia, enquanto que o LRP1 é mais expresso nos neurônios. No encéfalo, LDLr e LRP1 são os receptores mais importantes na captação mediada por receptor do colesterol ligado à ApoE (ZHANG; LIU, 2015). Além disso, o colesterol-ApoE é convertido em colesterol livre no endolisossomo, organela híbrida originada da fusão do endossoma tardio e do lisossoma, por meio de processos que envolvem a proteína Niemann-Pick tipo C1 (NPC1), uma proteína transmembrana com um domínio sensível a esteróis, e a C2 (NPC2), componente intraluminal que se liga ao colesterol (KIM *et al.*, 2009; ZHANG; LIU, 2015; WONG *et al.*, 2020).

Nas células do SNC, especialmente nos astrócitos, várias maneiras são conhecidas para estabilizar a concentração de colesterol quando a taxa de síntese é excedida. As células detectam os níveis de colesterol por meio do complexo Insig-SCAP-SREBP, predominantemente expresso em astrócitos hipocâmpais. Quando a concentração deste lipídio está exacerbada, o mesmo pode sofrer uma reação de esterificação para o armazenamento intracelular em LDs, mecanismo que parece ser dependente da idade. Logo, o envelhecimento parece contribuir para a formação dessas gotículas. Quando essa forma de depósito não é utilizada ou parte transportada para as mitocôndrias como fonte alternativa de energia, processos de peroxidação podem produzir metabólitos lipotóxicos para as células (YANG *et al.*, 2022).

Outro mecanismo importante para a homeostase do colesterol celular é a reação de hidroxilação do colesterol pela 24-hidroxilase, que é um citocromo P450 (CYP46A1) altamente expresso nos neurônios capaz de converter o colesterol a 24-OHC, espécie que pode ser excretada (RUSSEL *et al.*, 2009). O oxisterol 24-OHC pode atingir os

astrócitos e inibir a síntese de colesterol pela ativação dos LXR, além de regular positivamente os transportadores ABC e ApoE, ou atravessar a BHE, deslocando-se para o fígado, porém há pouca expressão da 24-hidroxilase em astrócitos (RAMIREZ *et al.*, 2008). Os mecanismos de esterificação e conversão do colesterol para uma forma mais polar auxiliam para o retorno à homeostase celular quando a biossíntese é excedida. Entretanto, ainda não se sabe quais são os mecanismos celulares quando as células cerebrais são expostas a uma quantidade de colesterol aumentada devido a disfunção da BHE induzida pela hipercolesterolemia, isto é, níveis aumentados de colesterol no sangue.

1.2 HIPERCOLESTEROLEMIA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Segundo a Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, o valor referencial de colesterol total no sangue (CT) é abaixo de 190 mg/dL, enquanto que os valores de colesterol-LDL dependem do histórico do paciente (FALUDI *et al.*, 2017). A diretriz sugere que valores de CT \geq 310 mg/dL (para adultos) e CT \geq 230 mg/dL (para crianças e adolescentes) pode ser indicativo de hipercolesterolemia familiar (HF). Já a *American Heart Association* sugere que o nível ideal de CT é cerca de 150 mg/dL, enquanto que o *National Institutes of Health* classifica como desejável as concentrações $<$ 200 mg/dL (GRUNDY *et al.*, 2019; NIH, 2022). Como mencionado anteriormente, quando a concentração de colesterol é excedida, isto é, valores referenciais extrapolados ao longo do tempo, o acúmulo desse lipídio no sangue pode estar associada a formação de placas ateroscleróticas e conseqüentemente doenças cardiovasculares (TABAS *et al.*, 2015).

A hipercolesterolemia tem como base de origem alterações genéticas fisiopatológicas e (ou) alimentação não saudável. A HF é um distúrbio de origem genética, que se caracteriza pela deficiente depuração do colesterol-LDL da circulação sanguínea. Brown e Goldstein, pioneiros nos estudos desta condição, revelaram que as mutações geralmente são nos LDLR (SOUTAR; NAOUMOVA, 2007). A HF é herdada de forma autossômica dominante e os indivíduos das famílias afetadas podem ser heterozigotos ou homozigotos. Na primeira, verifica-se metade dos LDLr funcionantes, enquanto na

homozigótica há a perda total de função dos receptores. De acordo com um estudo de meta-análise com 11 milhões de indivíduos sobre estimativas de prevalência mundial, a frequência da HF heterozigótica na população é de cerca de 1/300, enquanto a taxa homozigótica é de 1/400.000 (BEHESHTI *et al.*, 2020; IZAR *et al.*, 2021). Ainda, de acordo com a Diretriz Brasileira de HF (2021), em todo o mundo, estima-se que existam mais de 34.000.000 indivíduos com HF (NORDESTGAARD *et al.*, 2013; HARADA *et al.*, 2018; VALLEJO-VAZ; KAUSIK, 2018; IZAR *et al.*, 2021). Este é um dado alarmante, pois além das altas concentrações de colesterol-LDL propiciarem o surgimento de aterosclerose e conseqüentemente, de doença arterial coronariana, também favorecem o desenvolvimento de prejuízos cognitivos, alterações neuroquímicas e demência (REFOLO *et al.*, 2000; KIVIPELTO *et al.*, 2001; KIVIPELTO; SOLOMON, 2006; SOLOMON *et al.*, 2009; ZAMBÓN *et al.*, 2010). Mas como o excesso de colesterol-LDL na periferia pode afetar o cérebro?

Estudos utilizando modelos experimentais de hipercolesterolemia apontaram que a neuroinflamação, particularmente caracterizada pela astrogliose e a coexistente disfunção da BHE parecem preceder as disfunções cerebrais características de doenças neurodegenerativas, tais como a DA (STREIT; SPARKS, 1997; SPARKS *et al.*, 2000; ULLRICH *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; PAUL; BORAH, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021). É importante mencionar que a definição de astrogliose abrange um espectro de alterações moleculares, morfológicas e funcionais nos astrócitos em resposta a estímulos, ambiente, danos e doenças (SOFRONIEW, 2014). De fato, a neuroinflamação é uma característica comum às doenças neurodegenerativas (GUZMAN-MARTINEZ *et al.*, 2019). Em coelhos alimentados com dieta hipercolesterolêmica, o aumento da permeabilidade da BHE no bulbo olfatório, hipocampo e córtex foi verificado através da avaliação do extravasamento do corante *Evan's blue*, diminuição dos níveis proteicos de ocludina e ZO-1 e reatividade astrocitária (CHEN *et al.*, 2008). Além disso, de Oliveira e colaboradores (2020), evidenciaram a disfunção da BHE no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos modelos de HF, os camundongos nocautes para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), por meio da verificação do aumento da permeabilidade à fluoresceína de sódio, diminuição da expressão gênica de ocludina e claudina-5 no hipocampo, bem como aumento de

microvasos. Nos camundongos LDLr^{-/-} a perda da integridade da BHE nas estruturas cerebrais também foi associada à astrogliose, principalmente no hipocampo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014, 2020).

Quando ocorre disfunção da BHE, células inflamatórias periféricas e moléculas podem se deslocar para o encéfalo, o que pode comprometer ainda mais a estrutura da barreira (PRINZ; PRILLER, 2014; HONG *et al.*, 2022). Nesse sentido, uma importante evidência experimental apontou que em camundongos hipercolesterolêmicos apoB-APP, ocorre um acúmulo de ApoB100 em vasos cerebrais, indicando a presença da LDL no SNC (LÖFFLER *et al.*, 2013). Ademais, foi observado em coelhos expostos à dieta hipercolesterolêmica que o dano na BHE induzido pelos níveis aumentados de colesterol no sangue causa o extravasamento de partículas contendo ApoB100, ou seja LDL, para os cérebros desses animais. Ademais, os autores observaram que a presença de colesterol-LDL nos cérebros dos animais está associada com o acúmulo de colesterol intraneuronal, disfunção endossomal, aumento da produção de A β e prejuízo da integridade sináptica (CHEN *et al.*, 2010).

Na sequência, estudos *in vitro* investigaram os efeitos do LDL nas células cerebrais (SHIE *et al.*, 2004; HUI *et al.*, 2012; ENGEL *et al.*, 2016, 2019; IOANNOU *et al.*, 2019). Foi observado que a exposição ao LDL em neurônios primários corticais altera as funções do endolisossoma, favorecendo a produção de A β e causando a diminuição da proteína pré-sináptica sinaptofisina, utilizada como marcador de terminais sinápticos por ser constituinte das vesículas sinápticas, importante para a montagem e armazenamento de neurotransmissores (HUI *et al.*, 2012). Por fim, a incubação com LDL parece afetar a morfologia dos astrócitos (PITAS *et al.*, 1987; DEHOUCK *et al.*, 1994; ENGEL *et al.*, 2019; KAKAVA *et al.*, 2020). No entanto, são necessários mais estudos para o entendimento dos efeitos do colesterol-LDL nos astrócitos, células que também constituem a unidade neurovascular. Além disso, os astrócitos quando reativos também produzem moléculas neurotóxicas, tais como os mediadores inflamatórios, as quais dentre outros efeitos causam alterações na permeabilidade da BHE (GUZMAN-MARTINEZ *et al.*, 2019).

1.3 ASTRÓCITOS EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS

Nas neurociências, durante muito tempo, os neurônios foram os protagonistas de estudo devido à diversidade morfológica e funcional. Por sua vez, a glia, que se acreditava apresentar função passiva de sustentação para os neurônios, passou a receber atenção devido às descobertas dos inúmeros processos nos quais está envolvida (SOMJEN, 1988; YU *et al.*, 2020; AGNEW-SVOBODA *et al.*, 2022; BURDA *et al.*, 2022; LENG *et al.*, 2022; PATANI *et al.*, 2023). Santiago Ramón y Cajal, Camillo Golgi, Rudolf Virchow e Pío Del Río Hortega foram os pesquisadores que mais contribuíram para a descrição inicial e compreensão dessas células, em especial os astrócitos (SOMJEN, 1988; GOMES *et al.*, 2013; JÄKEL; DIMOU, 2017).

Dentre a diversidade funcional dos astrócitos, destacam-se o fornecimento de nutrientes como o lactato aos neurônios - hipótese lançadeira de lactato astrócito-neurônio (ANLS, na sigla em inglês) -, liberação de fatores tróficos para a diferenciação dos neurônios, e.g., fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), promoção de sinaptogênese via trombospondina, hevína, colesterol e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e contribuem para a produção de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos tais como a glutathiona (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994; GOMES *et al.*, 2001; BÉLANGER, 2011; DINIZ *et al.*, 2019; BONVENTO; BOLAÑOS, 2021). Além disso, os astrócitos possuem funções estruturais associadas a diferentes conformações da microarquitetura da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), funções de controle eletrolítico, isto é, regulação dos íons potássio (K⁺) e regulação dos níveis de água e pH extracelular. Dentre as funções vasculares, essas células controlam a vasodilatação arterial e os pés astrocitários captam nutrientes como a glicose dos vasos sanguíneos, como parte da unidade neurovascular. Com relação a defesa do SNC, essas células podem adquirir um fenótipo inflamatório liberando citocinas pró- ou anti-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6), -1 beta (IL-1 β), -10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Ainda, podem atuar como células-tronco e por fim, expressam diversos receptores na membrana plasmática, os quais são utilizados para captação de neurotransmissores (sinapse tripartite): captação de glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e ATP. Junto a captação, os astrócitos podem liberar gliotransmissores e esse processo contribui para a

modulação dos circuitos neurais e da plasticidade sináptica (PFRIEGER; BARRES, 1997; ARAQUE, 1999; BARRES, 2008, 2010; BARKER; ULLIAN, 2010; EROGLU; BARRES, 2010; VERKHRATSKY, NEDERGAARD, 2018).

Como discutido acima, uma das funções mais importantes dos astrócitos é o fornecimento de nutrientes. A hipótese ANLS é baseada na preferência dos neurônios por lactato. O lactato pode ser sintetizado nos astrócitos, uma vez que essas células possuem uma característica metabólica de regulação positiva da glicólise, isto é, captação da glicose via GLUT1 e metabolismo até piruvato e depois, formação de lactato pela reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH). O lactato então formado, é deslocado para o meio extracelular via transportadores de monocarboxilato (MCT) e assim chegam até os neurônios (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994; BÉLANGER *et al.*, 2011; CABRAL-COSTA, 2022). Essa característica glicolítica possui de certa forma relação com outra função desempenhada pelos astrócitos que é a captação de glutamato da fenda sináptica (MASON, 2017). Os astrócitos removem o neurotransmissor por meio dos transportadores de glutamato dependentes de Na^+ e portanto, da ação da bomba Na^+/K^+ ATPase dependente de ATP. Inicialmente, o glutamato é reconhecido através dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) acoplados à proteína G e transportado pelos transportadores de glutamato GLAST/EAAT1 [transportador de glutamato aspartato (GLAST) (EAAT1 homólogo em humanos)] e GLT-1/EAAT2 [transportador de glutamato-1 (GLT-1) (EAAT2 homólogo em humanos)]. Além disso, a depuração do glutamato extracelular é dependente da glutamina sintetase (GS), enzima responsável pela conversão do glutamato intracelular em glutamina (MAHMOUD, 2019; PETERSON; BINDER, 2020). A depuração disfuncional de glutamato pode contribuir para o desenvolvimento de neuropatologias, situação conhecida como excitotoxicidade glutamatérgica (PETERSON; BINDER, 2020; SATARKER *et al.*, 2022).

Os astrócitos são as principais células de defesa antioxidante do SNC. Pelo alto consumo de oxigênio e pelas grandes quantidades de lipídios, o encéfalo é suscetível aos efeitos de distúrbios nas concentrações de espécies reativas (SALIM, 2017). Basicamente, o estresse oxidativo é desencadeado quando um excesso de radicais livres ou espécies reativas (ROS, RNS) são geradas e os sistemas antioxidantes não são capazes de retornarem aos níveis fisiológicos. Em baixas concentrações, as espécies

reativas desempenham funções importantes, porém quando presentes em excesso causam oxidação de proteínas, fosfolípidios e peroxidação lipídica (HAWKINS *et al.*, 1998). A produção de glutathiona (GSH) e a atividade e expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) - expressão regulada pelo fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) - fazem parte das proteções antioxidantes dos astrócitos (DRINGEN *et al.*, 2000).

Outra característica importante dessas células gliais é que elas são heterogêneas e dividem-se em astrócitos protoplasmáticos (localizados na substância cinzenta, mais próximos aos vasos cerebrais), astrócitos fibrosos (presentes na substância branca), astrócitos especializados como a glia de Müller, glia de Bergmann e astrócitos velados localizados no cerebelo (BARRES, 2008; HAIM; ROWITCH, 2016; VERKHRATSKY, NEDERGAARD, 2018; KHAKH, DENEEN, 2019; LEE *et al.*, 2022a). Cada subtipo expressa marcadores citoplasmáticos e nucleares de maneira diferente. Entre esses marcadores, os mais conhecidos são: GFAP, S100B (proteína B de ligação ao cálcio S100), vimentina, GLT-1/EAAT2, GLAST/EAAT1, GS, canal retificador de potássio Kir4.1, aquaporina (AQP4), múltiplos domínios semelhantes a EGF 10 (MEGF10), conexinas (Cx43, Cx30), família de enzimas aldeído desidrogenase (ALDH1L1), receptores AMPA e outros menos comuns como a sulforrodamina B que é capaz de revelar detalhes da estrutura celular (HAIM; ROWITCH, 2016; ZIMMER *et al.*, 2017; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Em relação às diferenças morfológicas observadas nos astrócitos, sabe-se que em diferentes insultos e doenças neurodegenerativas essas células sofrem alterações significativas, adquirindo fenótipos “reativos” (ACAZ-FONSECA, 2016).

O microambiente extracelular pode regular a expressão gênica dos astrócitos. Os astrócitos respondem a diversos estímulos tais como neurotransmissores, metabólitos, citocinas, insultos e íons extracelulares. Nesse contexto, os astrócitos com fenótipo associado a doenças são um exemplo de modificações na expressão gênica que podem se tornar prejudiciais para o funcionamento do SNC e que ocorrem em resposta ao ambiente (LEE, 2022). Em resposta a danos e doenças do SNC, os astrócitos sofrem alterações funcionais com mecanismos subjacentes a essas alterações ainda não totalmente elucidados (GUTTENPLAN *et al.*, 2021; LIDDELOW; BARRES, 2017). As

modificações morfológicas, metabólicas, bioquímicas, fisiológicas e de marcadores astrocitários são formas que em conjunto podem caracterizar uma alteração de estado ou fenótipo (ESCARTIN *et al.*, 2021). Em uma situação aguda, com lesões iniciais, os astrócitos reativos e também a microglia reativa são importantes, pois realizam a limpeza de detritos, garantindo a comunicação sináptica. No entanto, quando essa reatividade está exacerbada, o estabelecimento crônico provoca um quadro de neuroinflamação com uma série de eventos prejudiciais. Vale ressaltar que os fenótipos não se limitam em reativo ou estado basal homeostático, pelo contrário, apresentam um espectro de fenótipos reativos, existindo concomitantemente com estado basal e realizando transições multidirecionais ou não (ESCARTIN *et al.*, 2021; FERRARI-SOUZA *et al.*, 2022).

O processo de envelhecimento é uma mudança fisiológica gradual no microambiente celular em questão, induzido pelo acúmulo ao longo do tempo de danos devido a uma variedade de estressores. Entre essas mudanças, o declínio funcional das células propicia o risco para o desenvolvimento de patologias, incluindo doenças neurodegenerativas (GUO *et al.*, 2022). Os astrócitos envelhecidos exibem alterações heterogêneas com especificidade regional (RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). A investigação dos estados e fenótipos de astrócitos envelhecidos é uma área de pesquisa emergente, (BHAT *et al.*, 2012; COHEN & TORRES, 2019). Além do envelhecimento, acredita-se que o colesterol-LDL, quando presente no parênquima, pode agir como um insulto aos astrócitos, alterando o microambiente e alterando sua morfologia (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Por muito tempo a investigação da alteração morfológica dos astrócitos foi relacionada à reatividade. Todavia, somente a alteração morfológica com aumento no número de arborizações (hipertrofia) e processos astrocitários é insuficiente para definir “astrogliose reativa” (ESCARTIN *et al.*, 2021). Nesse sentido, nos astrócitos, as LDs agem como indicadores indiretos de dano via estresse oxidativo nos neurônios, uma vez que através do acoplamento metabólico neurônio-astrócito, os neurônios deslocam lipídios oxidados aos astrócitos (LIU *et al.*, 2015, 2017; IOANNOU *et al.*, 2019; SMOLIC *et al.*, 2021). A deposição de LDs na zona subventricular já foi observada em camundongos modelos de DA e em camundongos idosos (BOUAB *et al.*, 2011;

HAMILTON *et al.*, 2015). Ademais, Marschallinger e colaboradores (2020) evidenciaram que na microglia, camundongos idosos apresentam maior quantidade de LDs em comparação com os camundongos jovens, o que foi também observado em tecido humano *post mortem* de um indivíduo idoso versus jovem. Assim, o envelhecimento parece ser um fator para o acúmulo de LDs. De fato, as LDs são encontradas principalmente no fígado e no tecido adiposo e suas funções estão relacionadas à proteção - preservação contra o excesso de AGs livres no citoplasma - e ao armazenamento/depósito; porém, cada vez mais as LDs estão sendo aceitas como marcadores estruturais de inflamação em diversas células, inclusive do SNC (BOZZA; VIOLA, 2010; FARMER *et al.*, 2020). Além da formação das LDs, a disfunção endolisossomal pode contribuir para a reprogramação do metabolismo celular. O envolvimento endolisossomal na patologia semelhante à DA induzida pelo colesterol-LDL em neurônios já foi relatado, situação que também pode estar ligada a modificação de fenótipo astrocitário (HUI *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2020).

Hipotetiza-se que em condições inflamatórias periféricas, como é o caso da hipercolesterolemia e outras doenças metabólicas, a disfunção da BHE permite a passagem de LDL para o SNC. No SNC o colesterol-LDL pode afetar os neurônios, causando efeitos neurotóxicos, mas também as células da glia. Este estudo investigou *in vitro* e *in vivo* o impacto do LDL nos astrócitos, células que apresentam inúmeras funções no encéfalo e que quando disfuncionais e reativas podem estar envolvidas na gênese e progressão de neuropatologias, tais como a DA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar, por meio de estratégias *in vitro* e *in vivo*, os efeitos do colesterol-LDL nos astrócitos, com enfoque em possíveis mudanças metabólicas e morfológicas nessas células.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Investigar se à exposição ao colesterol-LDL promove a produção de gotículas lipídicas, captação de AGCL e alterações nos lisossomas na linhagem de astrócitos;

2.2.2 Avaliar a expressão gênica de moléculas envolvidas no metabolismo do colesterol, tais como o LDLr, em células astrogliais expostas ao LDL;

2.2.3 Examinar os níveis de CD36 em células astrogliais expostas ao LDL-colesterol;

2.2.4 Avaliar parâmetros metabólicos, de estresse oxidativo e sistema antioxidante no modelo de astrócito expostos ao colesterol;

2.2.5 Investigar o perfil proliferativo, o tamanho e a morte celular de astrócitos expostos ao colesterol-LDL;

2.2.6 Investigar a morfologia de astrócitos hipocampais (CA1, CA3 e DG) em camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-} jovens e de meia-idade.

IMPACT OF LDL CHOLESTEROL EXPOSURE ON ASTROCYTES: AN *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDY

Artigo em preparação

Title: Impact of LDL cholesterol exposure on astrocytes: an *in vitro* and *in vivo* study

Authors: Gabriela J. Baumart¹, Matheus S. Rodrigues¹, Juliete N. Sholl¹, Arieli C. Sousa¹, Hémelin R. Farias¹, Lílian C. C. Beber¹, Ariadni M. Peres¹, Pedro R. Camargo¹, Fabrício Figueiró¹, Rachel K. S. S. Bast¹, Fátima T. C. R. Guma¹, Jade de Oliveira¹

Author information:

¹ Postgraduate Research Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

E-mail addresses:

Gabriela Joras Baumart - gabrielajbaumart@gmail.com
Jade de Oliveira - deoliveirajade10@gmail.com

Corresponding author: Jade de Oliveira
Departamento de Bioquímica, ICBS,
UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Prédio
Anexo. Santa Cecília, Porto Alegre - RS,
90035-003, laboratório 21, e-mail:
deoliveirajade10@gmail.com

5 DISCUSSÃO

Fatores genéticos e de estilo de vida predisõem à hipercolesterolemia. A definição de hipercolesterolemia depende do quadro clínico do paciente, i.e., além dos níveis sanguíneos de colesterol acima dos recomendados, a predisposição à doença cardiovascular aterosclerótica também é considerada (BERBERICH; HEGELE, 2022). Essa classificação individual, bem como a variação de recomendações entre diretrizes impossibilitam a avaliação real de prevalência, ao contrário da prevalência de HF que é melhor documentada (BEHESHTI *et al.*, 2020; IZAR *et al.*, 2021). Uma dessas avaliações estimou que 95 milhões de indivíduos norte-americanos acima dos 20 anos apresentam nível de colesterol elevado, com apenas metade em tratamento hipolipemiante (SAADATAGAH *et al.*, 2021). Alterações na homeostase do colesterol periférico com prejuízos na BHE e modificações no metabolismo do colesterol no SNC parecem gerar disfunção cerebral.

Sparks e colaboradores (1994) demonstraram que ao alimentar coelhos com dieta hipercolesterolêmica, placas amiloides eram formadas. Após esse estudo, várias hipóteses acerca da relação entre os níveis elevados de colesterol e o surgimento de uma patologia semelhante a DA foram verificadas experimentalmente, desde alterações vasculares - tais como a perda da integridade da BHE - a processos inflamatórios desencadeados pelas células gliais (STREIT; SPARKS, 1997; SPARKS *et al.*, 2000; DE LA TORRE *et al.*, 2004; ULLRICH *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014, 2020). Outrossim, estudos *in vitro* vêm investigando o impacto do excesso de colesterol em células do SNC (PITAS *et al.*, 1987; SHIE *et al.*, 2004; HUI *et al.*, 2012; ENGEL *et al.*, 2016, 2019; IOANNOU *et al.*, 2019). Nesse sentido, acredita-se que o comprometimento da BHE, o qual pode ocorrer em decorrência da hipercolesterolemia, é capaz de desencadear o extravasamento de colesterol-LDL para o parênquima cerebral. Neste trabalho, investigamos os efeitos do colesterol-LDL nos astrócitos, células que são componentes da BHE e que também participam dos eventos inflamatórios cerebrais.

Inicialmente, a endocitose e a captação de lipídeos presentes no colesterol-LDL foram investigadas nas células. Os astrócitos expressam amplamente os LDLr, capazes de reconhecerem domínios na ApoE e ApoB-100 (ZHANG; LIU, 2015). Observou-se que

à medida que a concentração de incubação com colesterol-LDL aumentou, mais espécies lipídicas na forma de LDs foram geradas na região intracelular. Diversas condições predis põem a formação de LDs, tais como processos inflamatórios, defeitos mitocondriais, envelhecimento e lipídios extracelulares, coincidentemente, condições já descritas na DA (HU *et al.*, 2017). Um trabalho publicado em 2017 induziu lesões na BHE de camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr-/- por meio de infusão de produtos da lipólise de TAGs. Essa disfunção na barreira comprometeu diretamente os astrócitos, gerando LDs, estresse celular e aumento de citocinas pró-inflamatórias (LEE *et al.*, 2017). O mesmo foi observado *in vitro* em cultura de astrócitos humanos expostos aos AGs liberados dos TAGs durante 3h (LEE *et al.*, 2017). De particular importância, as LDs já foram observadas em neurônios do hipocampo e córtex de pacientes com DA (GÓMEZ-RAMOS; MÓRAN, 2007).

Ademais, à medida que a concentração de colesterol-LDL aumentou, menor foi a expressão gênica de LDLr, sugerindo que quando as células preenchem totalmente essas LDs, não havendo mais compartimentos subcelulares para destinar esses lipídios e em um primeiro momento, sem a utilização dos mesmos, possivelmente, o mecanismo celular para barrar a entrada de mais lipídios seja a inibição da expressão de LDLr e seu deslocamento até a membrana. Isto significa que o nível de colesterol-LDL intracelular modula a expressão de LDLr. Na sequência, a diminuição da captura de lipídios foi visualizada por meio do ensaio de captação de AGCL, no qual mostrou que à medida que a concentração de colesterol-LDL aumenta, a captação é menor em 24 horas. Já em 48 horas a captação se manteve mais baixa, porém sem variações. Outro ponto importante foi a diminuição da expressão da enzima HMGCR, o que sugere que os níveis intracelulares de colesterol-LDL estão modulando a SREBP por meio de proteólise diminuída via SCAP, impedindo que fragmentos da SREBP se desloquem até o núcleo para ativar a transcrição de genes relacionados à síntese e captação de colesterol (SHIMANO; SATO, 2017).

Em 2020, Marschallinger e colaboradores demonstraram que um novo fenótipo da microglia (LDAM, do inglês "*LD accumulating microglia*") associado ao envelhecimento e rico em LDs possui acúmulo de depósitos lisossômicos disfuncionais e fagocitose prejudicada, além de liberar mediadores pró-inflamatórios. Ademais, em neurônios

corticais incubados com colesterol-ApoB a disfunção endolisossomal esteve relacionada com maior deposição de A β e tau hiperfosforilada (HUI *et al.*, 2012). Nos astrócitos, após endocitose nas regiões de membrana revestidas por clatrina, o conteúdo lipídico é encaminhado para o endossomo inicial, este, após maturação (endossomo tardio), fundiona-se com o lisossoma, formando o endolisossoma. A via endolisossomal é uma das principais responsáveis pela degradação celular, podendo degradar LDs, por meio de um processo chamado de lipofagia. Quando em situação de disfunção endolisossomal, essas organelas podem alterar seus tamanhos, números, aumentar o acúmulo de depósitos lisossômicos disfuncionais e o pH. Este, deve estar na faixa ácida (pH = 4,5-5,0) para que a atividade das enzimas hidrolíticas endossômicas e lisossômicas não seja prejudicada (TRUSCHEL *et al.*, 2018; MARSCHALLINGER *et al.*, 2020). Neste estudo, nós analisamos a quantidade de lisossomos positivos (LYRS+), através da coloração LysoTracker Red que marca compartimentos acidificados, nas culturas de astrócitos submetidas às diferentes concentrações de colesterol-LDL e tempo de incubação. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre as condições experimentais, indicando que o número de compartimentos acidificados não foi alterado. É importante mencionar que para avaliar o estado funcional da via e se o acúmulo de lipídios em LDs é uma consequência de processos de degradação defeituosos, mais experimentos são necessários: um marcador ratiométrico deverá ser utilizado para investigar o pH dessas organelas com maior especificidade, o tamanho e a localização dos endolisossomas deverá ser analisado, como também a atividade enzimática ou expressão das hidrolases e marcadores clássicos de lisossomo e endossomo.

No processo aterogênico, o receptor CD36 medeia o reconhecimento e internalização das oxLDL nas células do sistema imune (e.g. macrófagos), bem como desencadeia cascatas de sinalização para respostas pró-inflamatórias (PARK, 2014). Nossa próxima pergunta foi se o receptor scavenger também poderia estar sendo modulado nos astrócitos expostos ao colesterol-LDL. Em 48 horas de incubação, a maior concentração de colesterol-LDL promoveu aumento dos níveis de CD36. Isso pode ser explicado devido ao fato de o colesterol-LDL nativo isolado poder conter frações de oxLDL ou o LDL tenha sofrido processos de oxidação, e no maior tempo de incubação essa fração pode estar sendo internalizada.

Os astrócitos são células do SNC essenciais para a captação de glicose (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994; PELLERIN, 2018). A alta expressão de GLUT1 nos pés astrocitários garante o deslocamento da glicose para o parênquima cerebral (PELLERIN, 2018). Nos astrócitos, após sua internalização, a glicose pode ser armazenada na forma de glicogênio ou metabolizada via glicólise (STARICHA *et al.*, 2020). Como mencionado anteriormente, o processo de formação de ATP via glicólise nos astrócitos, promove a formação de lactato, metabólito deslocado para os neurônios e ainda, garante ATP para seus processos fisiológicos tais como o consumo de ATP pela bomba Na^+/K^+ ATPase, importante para a captação de glutamato (EROGLU; BARRES, 2010; BÉLANGER *et al.*, 2011). Portanto, além de investigar a homeostase lipídica, nós também medimos parâmetros relacionados ao metabolismo da glicose e energético. Nossos resultados demonstraram que frente a incubação com colesterol-LDL, a captação do análogo da glicose, 2-NBDG, não foi alterada significativamente. No entanto, parece haver uma tendência a diminuição de captação no maior período e na maior concentração de colesterol-LDL. Essa tendência deve ser melhor investigada porque a captação diminuída de glicose pode estar relacionada ao estado metabólico das células. Essa tendência de diminuição pode resultar em uma redução da produção de lactato, nutriente essencial para os neurônios. Podemos especular que as maiores concentrações de colesterol-LDL podem interferir no transporte de glicose via transportador GLUT-1 presente na membrana. Outro ponto que pode ser destacado é que as células incubadas com LDL por apresentarem maior conteúdo lipídico intracelular, poderia estar favorecendo a β -oxidação de ácidos graxos, garantindo a razão ATP/AMP. Em contraste, um estudo *in vivo* apontou que camundongos LDLr^{-/-} apresentam um aumento na captação de glicose, visto por meio do uso do radiofármaco 2-desoxi-2-[¹⁸F]-fluorodeoxiglicose ([¹⁸F]FDG) em tomografia por emissão de pósitrons (PET) (RUTKOWSKY *et al.*, 2018).

Diante do exposto, com o intuito de investigarmos o metabolismo celular, o ensaio de redução do MTT foi realizado. O reagente MTT pode atravessar as membranas celulares e a membrana mitocondrial, e a sua redução intracelular é mediada principalmente por enzimas oxidoredutase, desidrogenase e doadores de elétrons (GHASEMI *et al.*, 2021). Em ambos tempos de exposição, a menor concentração de

colesterol-LDL diminuiu a redução de MTT nas células, enquanto que a maior concentração de colesterol-LDL aumentou a redução do reagente. Isso pode indicar que maiores concentrações de colesterol-LDL promovem aumento da atividade metabólica nos astrócitos. No entanto, é importante destacar que a reação de formação do formazan possui muitas limitações porque outras espécies podem reduzir o MTT (p. ex., glutathione), além de ser um reagente de pouca especificidade que se desloca para vários compartimentos celulares (GHASEMI *et al.*, 2021).

Em comparação com os neurônios, os astrócitos são mais resistentes ao estresse oxidativo, pois a maior expressão e ativação do Nrf2 orquestra melhor a resposta antioxidante por meio de maior produção de GSH, GPx, SOD e catalase (WILSON, 1997; BÉLANGER *et al.*, 2011). Neste trabalho, foi observado um aumento na produção de espécies reativas quando as células foram incubadas com 50 µg/mL de LDL. Já após 24 horas de exposição dos astrócitos com LDL os níveis de espécies reativas diminuíram. Em adição, uma diminuição na atividade da SOD foi observada na linhagem de astrócitos exposta ao colesterol. As modulações nos níveis de espécies reativas induzidas pelo LDL-colesterol nos astrócitos estão associadas à disfunções nos mecanismos antioxidantes, no entanto mais parâmetros antioxidantes e de dano oxidativo precisam ser avaliados. Neste contexto, anteriormente foi demonstrado o desequilíbrio do sistema antioxidante da GSH - menor atividade da GPx e diminuição dos níveis de GSH - no hipocampo de animais LDLr^{-/-}, o que foi associado a astrogliose e prejuízos cognitivos (MOREIRA *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). Já quando os animais LDLr^{-/-} receberam administração intracerebroventricular com Aβ₁₋₄₀, os mesmos apresentaram aumento da atividade da SOD e diminuição de espécies reativas no hipocampo, enquanto que os C57BL/6 selvagens apresentaram diminuição da atividade da SOD e aumento de espécies reativas (MOREIRA *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). Ademais, células neuronais da linhagem SH-SH5Y incubadas com 300 µg/mL de colesterol-LDL durante 1 e 24 horas exibiram estresse oxidativo (ENGEL *et al.*, 2016).

Em algumas situações como no traumatismo craniano, onde ocorre disfunção da BHE e o deslocamento de plasma para o encéfalo, alguns astrócitos adquirem fenótipo reativo proliferativo (ALLURI *et al.*, 2015; LIDDELOW; BARRES, 2017). No nosso modelo experimental, a exposição ao colesterol-LDL não alterou os níveis de proliferação da

cultura de astrócitos, o que corrobora com outros estudos que evidenciam que nem sempre o fenótipo reativo astrocitário promove proliferação (LIDDELOW; BARRES, 2017). Primeiramente, a densidade celular foi mensurada via método de coloração com SRB. No menor tempo de incubação, ambas exposições diminuíram a ligação do corante nos resíduos de aminoácidos básicos. Dessa forma, as células poderiam estar diminuindo de tamanho, sofrendo alterações nos processos de proliferação ou morte celular. Para verificar se as células estavam sofrendo redução no tamanho, por meio da citometria de fluxo, os dados de tamanho (*Forward Scatter*, FSC) e complexidade (*Side Scatter*, SSC) foram coletados e analisados estatisticamente. Na maior concentração, o colesterol-LDL promoveu redução no tamanho das células. Em 24 horas ambas incubações favoreceram a diminuição da porcentagem de células dentro do gate FSC, desenhado à direita do *dot plot*. Então, os níveis de Ki-67 foram mensurados, comprovando que nessas condições o colesterol-LDL não altera o perfil proliferativo da cultura de astrócitos. Por fim, o colesterol-LDL não alterou parâmetros de morte celular (apoptose e necrose). Por sua vez, em camundongos LDLr^{-/-} hipercolesterolêmicos foi observado um aumento de apoptose neuronal na região CA3 do hipocampo por meio de co-localização de caspase 3 (mediador de morte neuronal) e NeuN (marcador neuronal), porém a co-localização caspase 3 e GFAP não foi verificada (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020b).

Tendo em vista que *i*) em camundongos hipercolesterolêmicos já foi observado um aumento da densidade astrocitária (BOCHELEN *et al.*, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014, 2020; LOERA-VALENCIA *et al.*, 2021; STAURENGHI *et al.*, 2021); e *ii*) o envolvimento do envelhecimento nos diferentes perfis de reatividade astrocitária (CLARKE *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2022b) nós avaliamos, utilizando os camundongos LDLr^{-/-} de três e quatorze meses de idade, os efeitos da hipercolesterolemia e do envelhecimento na morfologia astrocitária. Nossos resultados demonstraram maior mudança na morfologia dos astrócitos, caracterizada por maior número de processos, na região CA3 hipocampal dos camundongos LDLr^{-/-} de meia-idade. Mais estudos ainda são necessários, uma vez que somente um marcador astrocitário foi considerado. Além disso, a expressão de marcadores de reatividade de astrócitos será avaliada.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho de mestrado foi possível identificar alterações bioquímicas, metabólicas, morfológicas e, possivelmente, funcionais em cultura de astrócitos expostas ao colesterol-LDL e astrócitos hipocampais de animais modelo de HF. Este estudo demonstrou que em cultura de astrócitos incubadas com LDL, o acúmulo de gotículas lipídicas foi associado à diminuição da expressão gênica de receptores LDLr e da enzima HMGCR. Além disso, LDL causou aumento dos níveis de receptores scavengers, diminuição da captação de AGCL, tendência a diminuição da captação de glicose, geração de espécies reativas, desequilíbrio antioxidante e alteração no tamanho celular. Estas alterações induzidas pelo excesso de colesterol não foram associadas à morte celular dos astrócitos e nem aumento do perfil proliferativo. Nos animais LDLr^{-/-} foi observado na meia-idade um aumento no número de processos dos astrócitos na região CA3 hipocampal. Portanto, o colesterol-LDL parece ter efeito direto nos astrócitos, o que pode contribuir para a neuroinflamação e disfunção da BHE, e conseqüentemente desenvolvimento de demência.

7 PERSPECTIVAS

No estudo *in vitro*, nós ainda pretendemos investigar os níveis de GSH, a atividade da GPx, expressão gênica de Nrf2, SREBP, ApoE, ABC, transportadores de glutamato, o perfil de expressão e de níveis proteicos de citocinas. Por fim, pretendemos realizar o cultivo primário de astrócitos dos camundongos LDLr^{-/-}, para avaliação de parâmetros metabólicos (e.g., captação de glicose e glutamato), de morfologia e expressão gênica de proteínas relacionadas principalmente ao metabolismo do colesterol, transportadores de glutamato e de reatividade astrocitária, bem como avaliar conteúdo de A β , tau hiperfosforilada e LDs. E, *in vivo*, aumentar o n amostral e realizar a marcação dupla: GFAP e vimentina. Ainda, neste sentido, ter como base de direção as perguntas: 1) “Qual é a relação causal entre fatores inflamatórios e produção de gotículas lipídicas?” e 2) “LDs e colesterol-LDL geram um fenótipo reativo específico nos astrócitos?”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 10.1002/alz.13016. 14 Mar. 2023, doi:10.1002/alz.13016

Alluri, Himakarnika et al. "Blood-brain barrier dysfunction following traumatic brain injury." *Metabolic brain disease* vol. 30,5 (2015): 1093-104. doi:10.1007/s11011-015-9651-7

Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatr.* 64, 146–148 (1907).

Acaz-Fonseca, Estefanía et al. "Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions." *Progress in neurobiology* vol. 144 (2016): 5-26. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.06.002

Agnew-Svoboda, William et al. "A genetic tool for the longitudinal study of a subset of post-inflammatory reactive astrocytes." *Cell reports methods* vol. 2,8 100276. 22 Aug. 2022, doi:10.1016/j.crmeth.2022.100276

Araque, A et al. "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." *Trends in neurosciences* vol. 22,5 (1999): 208-15. doi:10.1016/s0166-2236(98)01349-6

Azizidoost, Shirin et al. "Amyloid beta increases ABCA1 and HMGCR protein expression, and cholesterol synthesis and accumulation in mice neurons and astrocytes." *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* vol. 1867,1 (2022): 159069. doi:10.1016/j.bbalip.2021.159069

Azevedo, Frederico A C et al. "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain." *The Journal of comparative neurology* vol. 513,5 (2009): 532-41. doi:10.1002/cne.21974

Barres, Ben A. "The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease." *Neuron* vol. 60,3 (2008): 430-40. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.013

Barker, Alison J, and Erik M Ullian. "Astrocytes and synaptic plasticity." *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* vol. 16,1 (2010): 40-50. doi:10.1177/1073858409339215

Basak, Jacob M et al. "Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of A β uptake and degradation by astrocytes." *The Journal of biological chemistry* vol. 287,17 (2012): 13959-71. doi:10.1074/jbc.M111.288746

Bhat, Rekha et al. "Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease." *PloS one* vol. 7,9 (2012): e45069. doi:10.1371/journal.pone.0045069

Bao, Yi et al. "CD36 is involved in astrocyte activation and astroglial scar formation." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 32,8 (2012): 1567-77. doi:10.1038/jcbfm.2012.52

BEHESHTI, S. O. et al. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *Journal of the American College of Cardiology* v. 75, n . 20, p. 2553-2566. may. 2020.

Björkhem, I. "Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain." *Journal of internal medicine* vol. 260,6 (2006): 493-508. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01725.x

Bélangier, Mireille et al. "Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation." *Cell metabolism* vol. 14,6 (2011): 724-38. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016

Ben Haim, Lucile et al. "Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases." *Frontiers in cellular neuroscience* vol. 9 278. 3 Aug. 2015, doi:10.3389/fncel.2015.00278

Berberich, Amanda J, and Robert A Hegele. "A Modern Approach to Dyslipidemia." *Endocrine reviews* vol. 43,4 (2022): 611-653. doi:10.1210/endrev/bnab037

Berghoff, Stefan & Spieth, Lena & Saher, Gesine. (2022). Local cholesterol metabolism orchestrates remyelination. *Trends in Neurosciences*. 45. 10.1016/j.tins.2022.01.001.

Blennow, K et al. "Blood-brain barrier disturbance in patients with Alzheimer's disease is related to vascular factors." *Acta neurologica Scandinavica* vol. 81,4 (1990): 323-6. doi:10.1111/j.1600-0404.1990.tb01563.x

Brown, M S, and J L Goldstein. "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science (New York, N.Y.)* vol. 232,4746 (1986): 34-47. doi:10.1126/science.3513311

Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:11041–11048.

Bochelen, D et al. "7beta-hydroxysterol is cytotoxic to neonatal rat astrocytes in primary culture when cAMP levels are increased." *Journal of neuroscience research* vol. 62,1 (2000): 99-111. doi:10.1002/1097-4547(20001001)62:1<99::AID-JNR11>3.0.CO;2-2

Boffa, Michael B, and Marlys L Koschinsky. "Oxidized phospholipids as a unifying theory for lipoprotein(a) and cardiovascular disease." *Nature reviews. Cardiology* vol. 16,5 (2019): 305-318. doi:10.1038/s41569-018-0153-2

- Bonvento, Gilles, and Juan P Bolaños. "Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity." *Cell metabolism* vol. 33,8 (2021): 1546-1564.
doi:10.1016/j.cmet.2021.07.006
- Boisvert, Matthew M et al. "The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain." *Cell reports* vol. 22,1 (2018): 269-285.
doi:10.1016/j.celrep.2017.12.039
- Borén, Jan et al. "Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in health and dyslipidaemia." *Nature reviews. Cardiology* vol. 19,9 (2022): 577-592.
doi:10.1038/s41569-022-00676-y
- Bozza, Patricia T, and João P B Viola. "Lipid droplets in inflammation and cancer." *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* vol. 82,4-6 (2010): 243-50.
doi:10.1016/j.plefa.2010.02.005
- Burda, Joshua E et al. "Divergent transcriptional regulation of astrocyte reactivity across disorders." *Nature* vol. 606,7914 (2022): 557-564. doi:10.1038/s41586-022-04739-5
- Cabral-Costa, João Victor et al. "Mitochondrial sodium/calcium exchanger NCLX regulates glycolysis in astrocytes, impacting on cognitive performance." *Journal of neurochemistry*, 10.1111/jnc.15745. 23 Dec. 2022, doi:10.1111/jnc.15745
- Canton, Johnathan et al. "Scavenger receptors in homeostasis and immunity." *Nature reviews. Immunology* vol. 13,9 (2013): 621-34. doi:10.1038/nri3515
- Cerqueira, Nuno M F S A et al. "Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview." *Biochemistry* vol. 55,39 (2016): 5483-5506. doi:10.1021/acs.biochem.6b00342
- Chen, Xuesong et al. "Endolysosome mechanisms associated with Alzheimer's disease-like pathology in rabbits ingesting cholesterol-enriched diet." *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 22,4 (2010): 1289-303. doi:10.3233/JAD-2010-101323
- Chen, Xuesong et al. "Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease." *Journal of neuroinflammation* vol. 5 12. 3 Apr. 2008, doi:10.1186/1742-2094-5-12
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid, beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/APS.2017.28>
- Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, et al. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018 Feb;115(8):E1896-E1905. DOI: 10.1073/pnas.1800165115. PMID: 29437957; PMCID: PMC5828643

Colle, Dirleise et al. "Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity." *Molecular neurobiology* vol. 53,2 (2016): 1280-1295. doi:10.1007/s12035-014-9086-x

Cohen, Justin, and Claudio Torres. "Astrocyte senescence: Evidence and significance." *Aging cell* vol. 18,3 (2019): e12937. doi:10.1111/accel.12937

de Bem, Andreza Fabro et al. "Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro." *Atherosclerosis* vol. 201,1 (2008): 92-100. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.030

Dehouck, B et al. "Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes." *The Journal of cell biology* vol. 126,2 (1994): 465-73. doi:10.1083/jcb.126.2.465

de Oliveira, Jade et al. "Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor." *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 41,1 (2014): 43-60. doi:10.3233/JAD-132228

de Oliveira, Jade et al. "High Cholesterol Diet Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption in LDLr-/- Mice: Impact on Cognitive Function." *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 78,1 (2020a): 97-115. doi:10.3233/JAD-200541

de Oliveira, Jade et al. "LDL Receptor Deficiency Does not Alter Brain Amyloid- β Levels but Causes an Exacerbation of Apoptosis." *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 73,2 (2020b): 585-596. doi:10.3233/JAD-190742

Delmas-Beauvieux, M C et al. "Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria." *Clinical biochemistry* vol. 28,2 (1995): 163-9. doi:10.1016/0009-9120(94)00071-3

Dietschy, John M, and Stephen D Turley. "Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal." *Journal of lipid research* vol. 45,8 (2004): 1375-97. doi:10.1194/jlr.R400004-JLR200

Diniz, Luan Pereira et al. "Astrocytes and the TGF- β 1 Pathway in the Healthy and Diseased Brain: a Double-Edged Sword." *Molecular neurobiology* vol. 56,7 (2019): 4653-4679. doi:10.1007/s12035-018-1396-y

Dringen, R et al. "Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species." *European journal of biochemistry* vol. 267,16 (2000): 4912-6. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01597.x

- Duan, Y., Gong, K., Xu, S. et al. Regulation of cholesterol homeostasis in health and diseases: from mechanisms to targeted therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* 7, 265 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01125-5>
- Elahi, F., Miller, B. A clinicopathological approach to the diagnosis of dementia. *Nat Rev Neurol* 13, 457–476 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.96>
- Engel, Daiane F et al. “Impaired adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of familial hypercholesterolemia: A role for the LDL receptor and cholesterol metabolism in adult neural precursor cells.” *Molecular metabolism* vol. 30 (2019): 1-15. doi:10.1016/j.molmet.2019.09.002
- Engel, Daiane Fátima et al. “Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr(-/-) mouse experimental model.” *Behavioural brain research* vol. 311 (2016): 31-38. doi:10.1016/j.bbr.2016.05.029
- Eraso-Pichot, Abel et al. “GSEA of mouse and human mitochondriomes reveals fatty acid oxidation in astrocytes.” *Glia* vol. 66,8 (2018): 1724-1735. doi:10.1002/glia.23330
- Eroglu, C., Barres, B. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223–231 (2010). <https://doi.org/10.1038/nature09612>
- Escartin, Carole et al. “Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions.” *Nature neuroscience* vol. 24,3 (2021): 312-325. doi:10.1038/s41593-020-00783-4
- Faludi, André Arpad et al. “Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017.” *Arquivos brasileiros de cardiologia* vol. 109,2 Supl 1 (2017): 1-76. doi:10.5935/abc.20170121
- Farmer, Brandon C et al. “Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders.” *Frontiers in neuroscience* vol. 14 742. 29 Jul. 2020, doi:10.3389/fnins.2020.00742
- Feingold KR. Introduction to Lipids and Lipoproteins. [Updated 2021 Jan 19]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000-.
- Ferrari-Souza, João Pedro et al. “Astrocyte biomarker signatures of amyloid- β and tau pathologies in Alzheimer's disease.” *Molecular psychiatry* vol. 27,11 (2022): 4781-4789. doi:10.1038/s41380-022-01716-2
- Feringa, Femke M, and Rik van der Kant. “Cholesterol and Alzheimer's Disease; From Risk Genes to Pathological Effects.” *Frontiers in aging neuroscience* vol. 13 690372. 24 Jun. 2021, doi:10.3389/fnagi.2021.690372

Fernandez, Celia G et al. "The Role of APOE4 in Disrupting the Homeostatic Functions of Astrocytes and Microglia in Aging and Alzheimer's Disease." *Frontiers in aging neuroscience* vol. 11 14. 11 Feb. 2019, doi:10.3389/fnagi.2019.00014

Fryer, John D et al. "The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice." *The Journal of biological chemistry* vol. 280,27 (2005): 25754-9. doi:10.1074/jbc.M502143200

Frostegård, J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med* 11, 117 (2013). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-117>.

Foley, Paul. "Lipids in Alzheimer's disease: A century-old story." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1801,8 (2010): 750-3. doi:10.1016/j.bbalip.2010.05.004

Foo, Lynette C et al. "Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes." *Neuron* vol. 71,5 (2011): 799-811. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.022

Galea, Elena et al. "Multi-transcriptomic analysis points to early organelle dysfunction in human astrocytes in Alzheimer's disease." *Neurobiology of disease* vol. 166 (2022): 105655. doi:10.1016/j.nbd.2022.105655

Genaro-Mattos, Thiago C et al. "Cholesterol Biosynthesis and Uptake in Developing Neurons." *ACS chemical neuroscience* vol. 10,8 (2019): 3671-3681. doi:10.1021/acchemneuro.9b00248

Ginhoux, Florent et al. "Origin and differentiation of microglia." *Frontiers in cellular neuroscience* vol. 7 45. 17 Apr. 2013, doi:10.3389/fncel.2013.00045

Gomes, F. C. A., Tortelli, V. P., & Diniz, L.. (2013). Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estudos Avançados*, 27(Estud. av., 2013 27(77)), 61–84. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100006>

Gomes, F C et al. "Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors." *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* vol. 34,5 (2001): 611-20. doi:10.1590/s0100-879x2001000500008

Gómez-Ramos, Pilar, and M Asunción Morán. "Ultrastructural localization of intraneuronal Abeta-peptide in Alzheimer disease brains." *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 11,1 (2007): 53-9. doi:10.3233/jad-2007-11109

Goldstein, J L, and M S Brown. "The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis." *Annual review of biochemistry* vol. 46 (1977): 897-930. doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.004341

Goldstein, Joseph L, and Michael S Brown. "A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins." *Cell* vol. 161,1 (2015): 161-172. doi:10.1016/j.cell.2015.01.036

Goritz, Christian et al. "Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron." *Molecular and cellular neurosciences* vol. 29,2 (2005): 190-201. doi:10.1016/j.mcn.2005.02.006

Guo, Jun et al. "Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments." *Signal transduction and targeted therapy* vol. 7,1 391. 16 Dec. 2022, doi:10.1038/s41392-022-01251-0

Guzman-Martinez, Leonardo et al. "Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders." *Frontiers in pharmacology* vol. 10 1008. 12 Sep. 2019, doi:10.3389/fphar.2019.01008

Guttenplan, K.A., Weigel, M.K., Prakash, P. et al. Neurotoxic reactive astrocytes induce cell death via saturated lipids. *Nature* 599, 102–107 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03960-y>

Haim, L., Rowitch, D. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 18, 31–41 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>

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

Hamilton, Laura K et al. "Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease." *Cell stem cell* vol. 17,4 (2015): 397-411. doi:10.1016/j.stem.2015.08.001

Hempel, Harald, and Simone Lista. "Alzheimer disease: from inherited to sporadic AD-crossing the biomarker bridge." *Nature reviews. Neurology* vol. 8,11 (2012): 598-600. doi:10.1038/nrneurol.2012.202

Hawkins, R D et al. "Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus." *Progress in brain research* vol. 118 (1998): 155-72. doi:10.1016/s0079-6123(08)63206-9

Hempel, S L et al. "Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123." *Free radical biology & medicine* vol. 27,1-2 (1999): 146-59. doi:10.1016/s0891-5849(99)00061-1

Herculano-Houzel, S., Catania, K., Manger, P. R., & Kaas, J. H. (2015). Mammalian Brains Are Made of These: A Dataset of the Numbers and Densities of Neuronal and Nonneuronal Cells in the Brain of Glires, Primates, Scandentia, Eulipotyphlans, Afrotherians and Artiodactyls, and Their Relationship with Body Mass. In *Brain, Behavior and Evolution* (Vol. 86, Issues 3–4, pp. 145–163). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000437413>

Herculano-Houzel, S., & dos Santos, S. (2018). You Do Not Mess with the Glia. *Neuroglia*, 1(1), 193–219. <https://doi.org/10.3390/neuroglia1010014>

Herculano-Houzel, S., & Lent, R. (2005). Isotropic fractionator: A simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2518–2521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4526-04.2005>

Holtzman, David M et al. “Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease.” *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* vol. 2,3 (2012): a006312. doi:10.1101/cshperspect.a006312

Hong, Dong-Yong et al. “Relationship between Brain Metabolic Disorders and Cognitive Impairment: LDL Receptor Defect.” *International journal of molecular sciences* vol. 23,15 8384. 29 Jul. 2022, doi:10.3390/ijms23158384

Hu, Xirong et al. “The Role of Lipid Bodies in the Microglial Aging Process and Related Diseases.” *Neurochemical research* vol. 42,11 (2017): 3140-3148. doi:10.1007/s11064-017-2351-4

Hui, Liang et al. “Endolysosome involvement in LDL cholesterol-induced Alzheimer's disease-like pathology in primary cultured neurons.” *Life sciences* vol. 91,23-24 (2012): 1159-68. doi:10.1016/j.lfs.2012.04.039

Ilha, Mariana et al. “Exogenous expression of caveolin-1 is sufficient for hepatic stellate cell activation.” *Journal of cellular biochemistry* vol. 120,11 (2019): 19031-19043. doi:10.1002/jcb.29226

Ioannou, Maria S et al. “Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity.” *Cell* vol. 177,6 (2019): 1522-1535.e14. doi:10.1016/j.cell.2019.04.001

IZAR M. C. O. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar – 2021. *Arq Bras Cardiol*. 2021.

Kakava, Sofia et al. “Brain Endothelial Cells in Contrary to the Aortic Do Not Transport but Degrade Low-Density Lipoproteins via Both LDLR and ALK1.” *Cells* vol. 11,19 3044. 28 Sep. 2022, doi:10.3390/cells11193044

Karagiannis, Fotios et al. “Lipid-Droplet Formation Drives Pathogenic Group 2 Innate Lymphoid Cells in Airway Inflammation.” *Immunity* vol. 52,4 (2020): 620-634.e6. doi:10.1016/j.immuni.2020.03.003

Khakh, Baljit S, and Benjamin Deneen. “The Emerging Nature of Astrocyte Diversity.” *Annual review of neuroscience* vol. 42 (2019): 187-207. doi:10.1146/annurev-neuro-070918-050443

Kim, Eunhee et al. "CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 28,18 (2008): 4661-70. doi:10.1523/JNEUROSCI.0982-08.2008

Kim, Jungsu et al. "Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance." *Neuron* vol. 64,5 (2009): 632-44. doi:10.1016/j.neuron.2009.11.013

Kivipelto, M et al. "Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study." *BMJ (Clinical research ed.)* vol. 322,7300 (2001): 1447-51. doi:10.1136/bmj.322.7300.1447

Kivipelto, M, and A Solomon. "Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence." *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* vol. 185 (2006): 50-7. doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00685.x

Knopman, David S et al. "Alzheimer disease." *Nature reviews. Disease primers* vol. 7,1 33. 13 May. 2021, doi:10.1038/s41572-021-00269-y

Kraepelin, E. (1910). *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Klinische Psychiatrie.*

Kriegstein, Arnold, and Arturo Alvarez-Buylla. "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells." *Annual review of neuroscience* vol. 32 (2009): 149-84. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.

Korinek, Miloslav et al. "Cholesterol modulates presynaptic and postsynaptic properties of excitatory synaptic transmission." *Scientific reports* vol. 10,1 12651. 28 Jul. 2020, doi:10.1038/s41598-020-69454-5

Lee, HG., Wheeler, M.A. & Quintana, F.J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nat Rev Drug Discov* 21, 339–358 (2022a). <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x>

Lee, Jae et al. "Region-Specific Characteristics of Astrocytes and Microglia: A Possible Involvement in Aging and Diseases." *Cells* vol. 11,12 1902. 12 Jun. 2022b, doi:10.3390/cells11121902

Lee, Linda L et al. "Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis products increase blood-brain barrier transfer coefficient and induce astrocyte lipid droplets and cell stress." *American journal of physiology. Cell physiology* vol. 312,4 (2017): C500-C516. doi:10.1152/ajpcell.00120.2016

Lin, Yuan-Ta et al. "APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types." *Neuron* vol. 98,6 (2018): 1141-1154.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.05.008

Loera-Valencia, Raúl et al. "Hypercholesterolemia and 27-Hydroxycholesterol Increase S100A8 and RAGE Expression in the Brain: a Link Between Cholesterol, Alarmins, and Neurodegeneration." *Molecular neurobiology* vol. 58,12 (2021): 6063-6076. doi:10.1007/s12035-021-02521-8

Luc Pellerin, *Neuroenergetics: Astrocytes Have a Sweet Spot for Glucose*, *Current Biology*, Volume 28, Issue 21, 2018, Pages R1258-R1260, ISSN 0960-9822, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.042>.

Ogrodnik, M., Zhu, Y., Langhi, L. G. P., Tchkonja, T., Krüger, P., Fielder, E., et al. (2019). Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell Metab.* 29 (5), 1061–1077. e8. doi:10.1016/j.cmet.2018.12.008

Ramirez, Denise M O et al. "Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain." *The Journal of comparative neurology* vol. 507,5 (2008): 1676-93. doi:10.1002/cne.21605

Refolo, L M et al. "Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model." *Neurobiology of disease* vol. 7,4 (2000): 321-31. doi:10.1006/nbdi.2000.0304

Reiniers, Megan J et al. "2',7'-Dichlorofluorescein is not a probe for the detection of reactive oxygen and nitrogen species." *Journal of hepatology* vol. 56,5 (2012): 1214-1216. doi:10.1016/j.jhep.2011.10.012

Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (50), 2597. <https://doi.org/10.3791/2597>

Rodrigues MS, de Paula GC, Duarte MB, de Rezende VL, Possato JC, Farias HR, et al. Nanotechnology as a therapeutic strategy to prevent neuropsychomotor alterations associated with hypercholesterolemia. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021;201:111608.

Rodríguez, José J et al. "Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain." *Neurobiology of aging* vol. 35,1 (2014): 15-23. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.002

Rudge, Jonathan D'Arcy. "A New Hypothesis for Alzheimer's Disease: The Lipid Invasion Model." *Journal of Alzheimer's disease reports* vol. 6,1 129-161. 25 Mar. 2022, doi:10.3233/ADR-210299

Saadatagah, Seyedmohammad et al. "Genetic basis of hypercholesterolemia in adults." *NPJ genomic medicine* vol. 6,1 28. 14 Apr. 2021, doi:10.1038/s41525-021-00190-z

Saher, Gesine et al. "High cholesterol level is essential for myelin membrane growth." *Nature neuroscience* vol. 8,4 (2005): 468-75. doi:10.1038/nn1426

Salim, Samina. "Oxidative Stress and the Central Nervous System." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* vol. 360,1 (2017): 201-205. doi:10.1124/jpet.116.237503

Satarker, Sairaj et al. "Astrocytic Glutamatergic Transmission and Its Implications in Neurodegenerative Disorders." *Cells* vol. 11,7 1139. 28 Mar. 2022, doi:10.3390/cells11071139

Shie, Feng-Shiun et al. "Oxidized low-density lipoprotein is present in astrocytes surrounding cerebral infarcts and stimulates astrocyte interleukin-6 secretion." *The American journal of pathology* vol. 164,4 (2004): 1173-81. doi:10.1016/S0002-9440(10)63205-1

Shi, Qingyang et al. "Intracellular Cholesterol Synthesis and Transport." *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 10 819281. 21 Mar. 2022, doi:10.3389/fcell.2022.819281

Shi, Yang et al. "Overexpressing low-density lipoprotein receptor reduces tau-associated neurodegeneration in relation to apoE-linked mechanisms." *Neuron* vol. 109,15 (2021): 2413-2426.e7. doi:10.1016/j.neuron.2021.05.034

Shimabukuro, Marilia Kimie et al. "Lipid-laden cells differentially distributed in the aging brain are functionally active and correspond to distinct phenotypes." *Scientific reports* vol. 6 23795. 31 Mar. 2016, doi:10.1038/srep23795

Shimano, Hitoshi, and Ryuichiro Sato. "SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology." *Nature reviews. Endocrinology* vol. 13,12 (2017): 710-730. doi:10.1038/nrendo.2017.91

Skehan, P et al. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." *Journal of the National Cancer Institute* vol. 82,13 (1990): 1107-12. doi:10.1093/jnci/82.13.1107

Silva, E et al. "Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides." *Archives of biochemistry and biophysics* vol. 349,2 (1998): 313-20. doi:10.1006/abbi.1997.0455

Silverstein, Roy L, and Maria Febbraio. "CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior." *Science signaling* vol. 2,72 re3. 26 May. 2009, doi:10.1126/scisignal.272re3

Simons, K, and E Ikonen. "How cells handle cholesterol." *Science (New York, N.Y.)* vol. 290,5497 (2000): 1721-6. doi:10.1126/science.290.5497.1721

Scholzen, T, and J Gerdes. "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *Journal of cellular physiology* vol. 182,3 (2000): 311-22. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9

Sofroniew, Michael V. "Astrogliosis." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 7,2 a020420. 7 Nov. 2014, doi:10.1101/cshperspect.a020420

Solomon, Alina et al. "Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later." *Dementia and geriatric cognitive disorders* vol. 28,1 (2009): 75-80. doi:10.1159/000231980

Sparks, D L et al. "Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol." *Experimental neurology* vol. 126,1 (1994): 88-94. doi:10.1006/exnr.1994.1044

Sparks, D L et al. "Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review." *Microscopy research and technique* vol. 50,4 (2000): 287-90. doi:10.1002/1097-0029(20000815)50:4<287::AID-JEMT7>3.0.CO;2-L

Sparks, D Larry. "The early and ongoing experience with the cholesterol-fed rabbit as a model of Alzheimer's disease: the old, the new and the pilot." *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 15,4 (2008): 641-56. doi:10.3233/jad-2008-15410

Smolič, Tina et al. "Astrocytes in stress accumulate lipid droplets." *Glia* vol. 69,6 (2021): 1540-1562. doi:10.1002/glia.23978

Somjen, G G. "Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia." *Glia* vol. 1,1 (1988): 2-9. doi:10.1002/glia.440010103

Staricha, Kelly et al. "Effect of high glucose condition on glucose metabolism in primary astrocytes." *Brain research* vol. 1732 (2020): 146702. doi:10.1016/j.brainres.2020.146702

Staurenghi, Erica et al. "Oxysterols present in Alzheimer's disease brain induce synaptotoxicity by activating astrocytes: A major role for lipocalin-2." *Redox biology* vol. 39 (2021): 101837. doi:10.1016/j.redox.2020.101837

Streit WJ, Sparks DL. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Molecular Medicine*. 1997;75(2):130–8.

Soutar, A., Naoumova, R. Mechanisms of Disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Rev Cardiol* 4, 214–225 (2007). <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0836>

Sun, Xiaoming, and Paul D Kaufman. "Ki-67: more than a proliferation marker." *Chromosoma* vol. 127,2 (2018): 175-186. doi:10.1007/s00412-018-0659-8

Sweeney, Melanie D et al. "Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders." *Nature reviews. Neurology* vol. 14,3 (2018): 133-150. doi:10.1038/nrneurol.2017.188

Tabas, Ira et al. "Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis." *The Journal of cell biology* vol. 209,1 (2015): 13-22. doi:10.1083/jcb.201412052

Tcw, Julia et al. "Cholesterol and matrisome pathways dysregulated in astrocytes and microglia." *Cell* vol. 185,13 (2022): 2213-2233.e25. doi:10.1016/j.cell.2022.05.017

Trapani L, Segatto M, Pallottini V. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic "power station". *World J Hepatol.* 2012 Jun 27;4(6):184-90. doi: 10.4254/wjh.v4.i6.184. PMID: 22761969; PMCID: PMC3388116.

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

Mason, Shayne. "Lactate Shuttles in Neuroenergetics-Homeostasis, Allostasis and Beyond." *Frontiers in neuroscience* vol. 11 43. 2 Feb. 2017, doi:10.3389/fnins.2017.00043

Matos, Marco et al. "Astrocytic adenosine A2A receptors control the amyloid- β peptide-induced decrease of glutamate uptake." *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 31,3 (2012): 555-67. doi:10.3233/JAD-2012-120469

Mahley, Robert W. "Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* vol. 36,7 (2016): 1305-15. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307023

Mahmoud, Shaimaa et al. "Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release." *Cells* vol. 8,2 184. 20 Feb. 2019, doi:10.3390/cells8020184

Marschallinger, J., Iram, T., Zardeneta, M., Lee, S. E., Lehallier, B., Haney, M. S., et al. (2020). Lipid-droplet-accumulating Microglia Represent a Dysfunctional and Proinflammatory State in the Aging Brain. *Nat. Neurosci.* 23 (2), 194–208. doi:10.1038/s41593-019-0566-1

Mauch, D H et al. "CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol." *Science (New York, N.Y.)* vol. 294,5545 (2001): 1354-7. doi:10.1126/science.294.5545.1354

Morant-Ferrando, Brenda et al. "Fatty acid oxidation organizes mitochondrial supercomplexes to sustain astrocytic ROS and cognition." *Nature metabolism*, 10.1038/s42255-023-00835-6. 17 Jul. 2023, doi:10.1038/s42255-023-00835-6

- Moreira, Eduardo Luiz Gasnhar 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 : JAD* vol. 32,2 (2012): 495-511. doi:10.3233/JAD-2012-120541
- Morquette, Philippe et al. "An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythogenesis." *Nature neuroscience* vol. 18,6 (2015): 844-54. doi:10.1038/nn.4013
- Mosmann, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of immunological methods* vol. 65,1-2 (1983): 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Montagne, Axel et al. "APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline." *Nature* vol. 581,7806 (2020): 71-76. doi:10.1038/s41586-020-2247-3
- Nagele, Robert G et al. "Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains." *Brain research* vol. 971,2 (2003): 197-209. doi:10.1016/s0006-8993(03)02361-8
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman.
- Nieweg, Katja et al. "Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats." *Journal of neurochemistry* vol. 109,1 (2009): 125-34. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x
- NIH. National Heart, Lung, and Blood Institute. *Cholesterol & Your Heart: What You Need to Know*. NIH Publication No. 22-HL-8191 September 2022.
- Noels, Heidi et al. "Lipoproteins and fatty acids in chronic kidney disease: molecular and metabolic alterations." *Nature reviews. Nephrology* vol. 17,8 (2021): 528-542. doi:10.1038/s41581-021-00423-5
- NORDESTGAARD, B. G. et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *European heart journal* v. 34, n. 45, 2013.
- Lee, Jae et al. "Region-Specific Characteristics of Astrocytes and Microglia: A Possible Involvement in Aging and Diseases." *Cells* vol. 11,12 1902. 12 Jun. 2022, doi:10.3390/cells11121902
- Leng, Kun et al. "CRISPRi screens in human iPSC-derived astrocytes elucidate regulators of distinct inflammatory reactive states." *Nature neuroscience* vol. 25,11 (2022): 1528-1542. doi:10.1038/s41593-022-01180-9

- Liddelw, Shane A, and Ben A Barres. "Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential." *Immunity* vol. 46,6 (2017): 957-967.
doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006
- Liddelw, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487 (2017).
- Liu, Lucy et al. "Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration." *Cell* vol. 160,1-2 (2015): 177-90. doi:10.1016/j.cell.2014.12.019
- Liu, Lucy et al. "The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D." *Cell metabolism* vol. 26,5 (2017): 719-737.e6. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.024
- Löffler, Tina et al. "Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice." *Neurobiology of aging* vol. 34,10 (2013): 2379-88.
doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.008
- Lowry, O H et al. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *The Journal of biological chemistry* vol. 193,1 (1951): 265-75.
- Luo, Jie et al. "Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis." *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 21,4 (2020): 225-245. doi:10.1038/s41580-019-0190-7
- Park, Young Mi. "CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis." *Experimental & molecular medicine* vol. 46,6 e99. 6 Jun. 2014,
doi:10.1038/emm.2014.38
- Patani, Rickie et al. "Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration." *Nature reviews. Neurology* vol. 19,7 (2023): 395-409.
doi:10.1038/s41582-023-00822-1
- Paul, Rajib, and Anupom Borah. "Global loss of acetylcholinesterase activity with mitochondrial complexes inhibition and inflammation in brain of hypercholesterolemic mice." *Scientific reports* vol. 7,1 17922. 20 Dec. 2017, doi:10.1038/s41598-017-17911-z
- Pellerin, L, and P J Magistretti. "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 91,22 (1994): 10625-9. doi:10.1073/pnas.91.22.10625
- Peterson AR and Binder DK (2020) Astrocyte Glutamate Uptake and Signaling as Novel Targets for Antiepileptogenic Therapy. *Front. Neurol.* 11:1006. doi: 10.3389/fneur.2020.01006

Pfrieger, F W, and B A Barres. "Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro." *Science (New York, N.Y.)* vol. 277,5332 (1997): 1684-7. doi:10.1126/science.277.5332.1684

Pitas, R E et al. "Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins." *Biochimica et biophysica acta* vol. 917,1 (1987): 148-61. doi:10.1016/0005-2760(87)90295-5

Prinz, Marco, and Josef Priller. "Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease." *Nature reviews. Neuroscience* vol. 15,5 (2014): 300-12. doi:10.1038/nrn3722

Russell DW, Halford RW, Ramirez DM, Shah R, Kotti T. Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:1017-40. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.072407.103859. PMID: 19489738; PMCID: PMC2837268.

Rutkowsky, Jennifer M et al. "Reduced cognitive function, increased blood-brain-barrier transport and inflammatory responses, and altered brain metabolites in LDLr -/-and C57BL/6 mice fed a western diet." *PloS one* vol. 13,2 e0191909. 14 Feb. 2018, doi:10.1371/journal.pone.0191909

Truschel, Steven T et al. "Age-related endolysosome dysfunction in the rat urothelium." *PloS one* vol. 13,6 e0198817. 8 Jun. 2018, doi:10.1371/journal.pone.0198817

Ullrich, Pirchl, Humpel. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Molecular and cellular neurosciences* [Internet]. 2010 Dec [cited 2021 Aug 28];45(4):408–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20696249/>

Jäkel S and Dimou L (2017) Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front. Cell. Neurosci.* 11:24. doi: 10.3389/fncel.2017.00024

Jin, Uram et al. "Cholesterol Metabolism in the Brain and Its Association with Parkinson's Disease." *Experimental neurobiology* vol. 28,5 (2019): 554-567. doi:10.5607/en.2019.28.5.554

Wyss-Coray, Tony et al. "Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ." *Nature medicine* vol. 9,4 (2003): 453-7. doi:10.1038/nm838

Wong, Ching-On. "Endosomal-Lysosomal Processing of Neurodegeneration-Associated Proteins in Astrocytes." *International journal of molecular sciences* vol. 21,14 5149. 21 Jul. 2020, doi:10.3390/ijms21145149

VALLEJO-VAZ, A. J.; KAUSIK, K. R. Epidemiology of familial hypercholesterolaemia: Community and clinical. *Atherosclerosis*, v. 277, p. 289-297, oct. 2018.

Verkhatsky, Alexei, and Maiken Nedergaard. "Physiology of Astroglia." *Physiological reviews* vol. 98,1 (2018): 239-389. doi:10.1152/physrev.00042.2016

Vermes, I et al. "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *Journal of immunological methods* vol. 184,1 (1995): 39-51. doi:10.1016/0022-1759(95)00072-i

Vichai, Vanicha, and Kanyawim Kirtikara. "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening." *Nature protocols* vol. 1,3 (2006): 1112-6. doi:10.1038/nprot.2006.179

Von Bartheld, C.S.; Bahney, J.; Herculano-Houzel, S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* 2016, 524, 3865–3895.

Wang, Sh., Huang, Y., Yuan, Y. et al. LDL receptor knock-out mice show impaired spatial cognition with hippocampal vulnerability to apoptosis and deficits in synapses. *Lipids Health Dis* 13, 175 (2014). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-175>

Wilson, J X. "Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes." *Canadian journal of physiology and pharmacology* vol. 75,10-11 (1997): 1149-63.

Wong, Ching-On. "Endosomal-Lysosomal Processing of Neurodegeneration-Associated Proteins in Astrocytes." *International journal of molecular sciences* vol. 21,14 5149. 21 Jul. 2020, doi:10.3390/ijms21145149

Xiong, Xiao-Yi et al. "Metabolic changes favor the activity and heterogeneity of reactive astrocytes." *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* vol. 33,6 (2022): 390-400. doi:10.1016/j.tem.2022.03.001

Yang, Danying et al. "Lipid metabolism and storage in neuroglia: role in brain development and neurodegenerative diseases." *Cell & bioscience* vol. 12,1 106. 12 Jul. 2022, doi:10.1186/s13578-022-00828-0

Yu, Xinzhu et al. "Improved tools to study astrocytes." *Nature reviews. Neuroscience* vol. 21,3 (2020): 121-138. doi:10.1038/s41583-020-0264-8

Zambón, Daniel et al. "Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia." *The American journal of medicine* vol. 123,3 (2010): 267-74. doi:10.1016/j.amjmed.2009.08.015

Zhang, Juan, and Qiang Liu. "Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain." *Protein & cell* vol. 6,4 (2015): 254-64. doi:10.1007/s13238-014-0131-3

Zimmer, Eduardo R et al. "[18F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport." *Nature neuroscience* vol. 20,3 (2017): 393-395. doi:10.1038/nn.4492

Zlokovic, Berislav V. "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." *Neuron* vol. 57,2 (2008): 178-201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003

Zou, Chenhui et al. "2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement." *Journal of biochemical and biophysical methods* vol. 64,3 (2005): 207-15. doi:10.1016/j.jbbm.2005.08.001