

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

Hémelin Resende Farias

**MECANISMOS SUBJACENTES À DISFUNÇÃO CEREBRAL INDUZIDA PELA
HIPERCOLESTEROLEMIA: UM ESTUDO *IN VITRO***

PORTO ALEGRE

2024

Hémelin Resende Farias

**MECANISMOS SUBJACENTES À DISFUNÇÃO CEREBRAL INDUZIDA PELA
HIPERCOLESTEROLEMIA: UM ESTUDO *IN VITRO***

Tese 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 doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jade de Oliveira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Theresinha da Costa Rodrigues Guma

PORTO ALEGRE

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Resende Farias, Hémelin
MECANISMOS SUBJACENTES À DISFUNÇÃO CEREBRAL
INDUZIDA PELA HIPERCOLESTEROLEMIA: UM ESTUDO IN VITRO
/ Hémelin Resende Farias. -- 2024.
157 f.
Orientadora: Jade de Oliveira.

Coorientadora: Fátima Theresinha da Costa Rodrigues
Guma.

Tese (Doutorado) -- 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, 2024.

1. Hipercolesterolemia. 2. Neurônios. 3. Micróglia.
4. Mitochondria. 5. LDL colesterol. I. de Oliveira,
Jade, orient. II. Theresinha da Costa Rodrigues Guma,
Fátima, coorient. III. Título.

*Dedico este trabalho a todas as meninas e
mulheres curiosas, que sonham, que
acreditam e que fazem acontecer.*

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar essa sessão, agradecendo a minha família, Heitor, Hélen, Sanjiro, Larissa, Thulio, Eduardo, Isadora e Geiza e em especial aos meus pais, seu Caetano e dona Vergínia, me sinto honrada de ser filha de vocês. Meus pais, que sempre valorizaram a educação, nos incentivaram muito a estudar. Eles nunca mediram esforços para que eu seguisse meu sonho de ser Doutora em Bioquímica. A minha mãe, que é a melhor mãe e melhor avó do mundo, faz de tudo por nós, espero um dia conseguir retornar metade de tudo que você já fez por mim.

Agradeço imensamente à minha orientadora Jade, e minha co-orientadora Fátima. Agradeço a prof. Jade por ter acreditado em mim e ter me chamado pra entrar no LABIMN, antes mesmo dele ter um nome. Agradeço a prof. Fátima por ter nos recebido de braços abertos. Ter a oportunidade de trabalhar com vocês me ensinou muito sobre o tipo de pessoa e professora que eu quero ser.

Quero agradecer aos meus amigos, que muito além de colaboradores do trabalho, foram quem me deram forças para continuar, porque muito além de mãos que trabalham e mentes que pensam, nesse doutorado eu precisei de braços que abraçam e corações que compreendem. Vir estudar em outro estado, longe da família e me adaptar a um laboratório novo foi umas das situações mais desafiadoras que já passei. Sem dúvida nenhuma, foram os meus amigos que me mantiveram em pé nesses momentos e sem eles eu não sei se teria tido forças para chegar até aqui.

Vou começar agradecendo as minhas meninas do Lab21, que são excepcionais e são mulheres que me inspiram. Tenho muito a agradecer a minha amiga Jéssica, que é uma das pessoas mais incríveis que eu conheço, que me ensinou coisas imensuráveis e me ajudou a ressignificar muitas coisas na minha vida, a Jéssica é meu colete salva vidas em meio ao caos. A “minha IC” e amiga Carol, que é o *baby* do lab, uma das pessoas mais inteligentes, gentis, doces e fortes que eu já trabalhei. Carol foi o meu braço direito desde que chegou no lab e eu sempre soube que com ela, eu tinha com quem contar. A Natália, minha *ex-rommie*, me ensinou muito e é uma pessoa que eu admiro muito. Renata, Renatão para os próximos, que é sensacional, única, minha cia para turistar no Rio. A Samili que foi fundamental para a realização desse trabalho, que é uma amiga leal, paciente e que tem um jeito único de levar a vida. Tenho certeza Samili, que você vai ter muito sucesso na sua vida. A Arieli, que foi a primeira pessoa que se aproximou de mim quando cheguei no lab, tem

um jeito único e gentil de lidar com as pessoas. Sou muito agradecida e orgulhosa das minhas garotas.

Aos “agregados” do lab 21, meus amigos Lucas e Junior. O Lucas foi chegando e conquistou um lugar muito especial em meu coração, Luquinhas é um amigo fantástico que está sempre disposto a me ouvir e ajudar, obrigada por sonhar comigo e por tanto amigo. Ao “Juninho” que tem um coração enorme e por muitas e muitas vezes me falou que iria dar certo.

No filme *Minha vida em Marte*, a atriz Mônica fala “com o tempo a gente vai entendendo o significado de um amigo [...], tem pessoas na vida que a gente esbarra, e tem pessoas que a gente encontra.” E eu encontrei vocês, Jéssica, Lucas, Carol e Junior, o maior presente que Porto Alegre me deu.

Aos colegas do Lab21, Aninha, João, Alex, Letícia, Matheus e Lilian.

Finalmente, gostaria de agradecer às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPERGS, ao departamento de Bioquímica e aos colaboradores deste trabalho, a Dra. Debora G Souza, Fernanda S Ferreira, Dra. Sabrina Somacal, Dr. Leo AM. Martins, Dr. Diogo OG de Souza, Dr. José Cláudio F. Moreira, Dra. Angela TS Wyse e a Dra. Manuella P. Kaster.

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em três partes, cada uma constituída dos seguintes itens:

Parte I: Resumo, Resumo em inglês (Abstract), Lista de abreviações, Introdução e Objetivos;

Parte II: Resultados escritos na forma de artigo, divididos em capítulos;

Parte III: Conclusão e Referências bibliográficas citadas na Introdução da Parte I.

SUMÁRIO

PARTE I 9

1.INTRODUÇÃO	13
1.1.COLESTEROL E METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS.....	14
1.2.METABOLISMO DO COLESTEROL NO SNC.....	18
1.3.PAPEL OXI-INFLAMATÓRIO DA HIPERCOLESTEROLEMIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	20
1.4.MICROGLIAS E NEURÔNIOS NO CONTEXTO DA HIPERCOLESTEROLEMIA.....	23
1.5.FUNÇÃO MITOCONDRIAL ASSOCIADA A DISFUNÇÃO COGNITIVA	26
2.OBJETIVOS	31
2.1.OBJETIVO GERAL	31
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
PARTE II	32
2.CAPÍTULO I	33
3.CAPÍTULO II	64
4.CAPÍTULO III	87
PARTE III	129
3.CONCLUSÕES	130
4.PERSPECTIVAS FUTURAS	133
REFERÊNCIAS	134
7.ANEXOS	145
Anexo I: Aceite pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS) .	145
Anexo II: Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa.	146
Anexo III: Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa.	153

PARTE I

Resumo

A hipercolesterolemia, além de ser um fator de risco para doenças cardiovasculares, vem sendo também associada ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Além disso, recentemente, altas concentrações plasmáticas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) passou a ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento de demência. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi elucidar os mecanismos subjacentes pelos quais a hipercolesterolemia induz a danos cerebrais. Para isso, foram utilizadas linhagens de neurônio de hipocampo de camundongos (HT-22) expostas à LDL ou ao meio condicionado (MC) de micróglia; e uma linhagem celular de micróglia de camundongos (BV-2) expostas à LDL ou ao plasma de camundongos hipercolesterolêmicos. Parâmetros de viabilidade, função mitocondrial e lisossomal, autofagia e fatores inflamatórios foram avaliados. A exposição à LDL em células de hipocampo de camundongo HT-22 induziu disfunção mitocondrial, aumento da expressão de genes associados com a fusão mitocondrial, aumento da geração de superóxido mitocondrial e alterou atividade antioxidante, além de levar ao aumento de gotas lipídicas. Em células microgliais a LDL induziu a um estado disfuncional, com o aumento de gotas lipídicas, alterações em genes associados com a fagocitose e diminuição da autofagia. Quando as micróglia foram expostas ao plasma hipercolesterolêmico de camundongos, foi observado o aumento de gotas lipídicas, alterações morfológicas, além de alterações na viabilidade celular. Ainda, quando as células neuronais HT-22 foram expostas ao MC de micróglia expostas previamente à LDL e ao plasma hipercolesterolêmico de camundongos, observamos alterações em marcadores mitocondriais. Esse resultado sugere um efeito neurotóxico induzido pelos mediadores liberados pelas micróglia expostas ao plasma rico em colesterol. Sendo assim, podemos concluir que a LDL induz à disfunção mitocondrial de uma linhagem de neurônios hipocámpais, principal área cerebral associada com a formação da memória. Além disso, fatores hipercolesterolêmicos como LDL e plasma de camundongos hipercolesterolêmicos causam a um estado disfuncional da micróglia. Por fim, os mediadores liberados pelas micróglia parecem ter um efeito neurotóxico.

Palavras-chave: hipercolesterolemia; LDL-colesterol; gota lipídica; micróglia; neurônios; mitocôndria

Abstract

Hypercholesterolemia, beyond a risk factor for cardiovascular diseases, has also been associated with the development of neurodegenerative diseases. Furthermore, recently, high plasmatic low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels have been considered a risk factor for the development of dementia. Therefore, this study aimed to elucidate the underlying mechanisms by which hypercholesterolemia induces brain damage. For this, we used mouse hippocampal neuron cell lines (HT-22) exposed to LDL or conditioned medium (CM) from microglia; mouse microglial cells line (BV-2) were exposed to LDL or plasma from hypercholesterolemic mice. Viability, mitochondrial, lysosomal function and autophagy parameters, and inflammatory factors were evaluated. LDL exposure in hippocampal neuron HT-22 cells induced mitochondrial dysfunction, increased the expression of genes associated with mitochondrial fusion, increased mitochondrial superoxide production, altered antioxidant activity, and enhanced the lipid droplet. In microglial cells, LDL induced a dysfunctional state, with increased lipid droplets, alterations in genes associated with phagocytosis, and decreased autophagy. When microglia were exposed to the hypercholesterolemic plasma from mice, we observed an increase in lipid droplets, morphological alterations, besides cell viability changes. Furthermore, when HT-22 neuronal cells were exposed to the CM of microglia previously exposed to LDL or hypercholesterolemic plasma from mice, alterations in mitochondrial markers were observed. This result suggests a neurotoxic effect induced by mediators released by microglia exposed to cholesterol-rich plasma. Therefore, we can conclude that LDL induces mitochondrial dysfunction in a hippocampal neuron cell line, the main brain area associated with memory formation. In addition, hypercholesterolemic factors such as LDL and plasma from hypercholesterolemic mice induce a dysfunctional state of microglia. Finally, the mediators released by microglia appear to have a neurotoxic effect.

Keywords: hypercholesterolemia, LDL-cholesterol, lipid droplet, microglia, neurons, mitochondria.

Lista de abreviações

24-OH - 24-hidroxicolesterol
27-OH - 27-hidroxicolesterol
Apo - Apolipoproteínas
BHE - Barreira hematoencefálica
CAT - Catalase
CYP27A1 - Citocromo P450 27A1
CYP46A1 - Citocromo P450 46A1
DA - Doença de Alzheimer
Drp1 - Proteína relacionada à dinamina 1
ER - Espécies reativas
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
Fis1 - Fissão mitocondrial 1
GR - Glutathione redutase
GSH - Glutathione
HDL - Lipoproteína de alta densidade
HF- Hipercolesterolemia Familiar
LDAM - Micróglia acumuladora de gotículas lipídicas
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LDLr - Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LRP1 - Proteína-1 relacionada ao receptor de LDL
MME - Membrana mitocondrial externa
MMI - Membrana mitocondrial interna
OPA 1 - Proteína de atrofia óptica 1
QM - Quilomícrons
SNC - Sistema Nervoso Central
SOD - Superóxido dismutase
VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

1. INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia é uma condição metabólica caracterizada por elevadas concentrações plasmáticas de colesterol (superiores a 190 mg/dL) (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017), sendo o colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade (LDL) o mais associado aos danos induzidos pela hipercolesterolemia (Faludi AA *et al.*, 2017). A hipercolesterolemia é considerada um problema de saúde pública devido à sua alta prevalência e estreita relação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ateroscleróticas e acidente vascular cerebral (Mozaffarian *et al.*, 2015), as quais são a principal causa de morte a nível mundial (Di Cesare *et al.*, 2024). Somado a isso, nas últimas décadas, diversos estudos têm evidenciado uma forte associação entre doenças metabólicas, como a hipercolesterolemia ao comprometimento cognitivo leve (Ariza *et al.*, 2016; Zambón *et al.*, 2010) e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA) (Kivipelto *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2009). Recentemente, altas concentrações plasmáticas de LDL, na meia idade, passaram a ser consideradas um fator de risco para o desenvolvimento de demência (Livingston *et al.*, 2024).

Um dos primeiros trabalhos publicados que sugeriu a associação entre hipercolesterolemia e a DA foi realizado por Sparks e colaboradores (1990), que identificaram placas senis em amostras de cérebro *post mortem* de indivíduos com doenças cardiovasculares. Desde então, diversos estudos clínicos, epidemiológicos e pré-clínicos confirmaram essa associação (Kivipelto *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2021; Sparks *et al.*, 1994; Ullrich; Pirchl; Humpel, 2010). De particular importância, um estudo realizado por Ariza e colaboradores (2016) relatou que indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), forma genética da hipercolesterolemia, apresentam alterações cognitivas desde muito jovens.

Nos modelos experimentais de hipercolesterolemia também são observados prejuízos de memória e aprendizado (de Oliveira *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2014; Mulder *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2021, 2023). Além disso, em estudos experimentais, inúmeros mecanismos vêm sendo implicados na relação entre hipercolesterolemia e disfunção cerebral, tais como disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) (de Oliveira *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021), neuroinflamação (Rodrigues *et al.*, 2023; Thirumangalakudi *et al.*, 2008), estresse oxidativo (Montilla *et al.*, 2006; Paul; Borah, 2017), e alterações mitocondriais (de

Oliveira *et al.*, 2011; Mancini *et al.*, 2021) no córtex cerebral e hipocampo. De fato, a hipercolesterolemia parece ter grande impacto no hipocampo (Mancini *et al.*, 2021; Paul; Borah, 2017; Prasanthi *et al.*, 2010; Thirumangalakudi *et al.*, 2008), região cerebral associada à formação de memória e cognição (Bird; Burgess, 2008).

A disfunção da BHE induzida pela hipercolesterolemia permite que componentes presentes na periferia, como a LDL e fatores inflamatórios, adentrem o sistema nervoso central (SNC) (Chen *et al.*, 2010; Löffler *et al.*, 2013). Logo, a LDL poderia levar a alterações na homeostase das células cerebrais. Nesse sentido, um recente estudo experimental demonstrou que o extravasamento da LDL para o parênquima cerebral leva a importantes alterações microgliais, inclusive ao comprometimento das propriedades regenerativas das micróglia perivasculares (Zhou *et al.*, 2024).

Até o momento, pouco se sabe sobre o efeito da LDL sob neurônios e micróglia. Vale ressaltar que os neurônios necessitam de alto suprimento energético, portanto, a adequada função mitocondrial destas células é imprescindível (Chen; Chan, 2006). Paralelamente, as micróglia são as células imunes do SNC e têm um importante papel na manutenção da homeostase cerebral (Nimmerjahn; Kirchhoff; Helmchen, 2005). Deste modo, a compreensão do efeito que a LDL tem sobre a função mitocondrial de neurônios, a função das micróglia, bem como o efeito que mediadores liberados por essas micróglia tem em neurônios é de suma importância para melhor compreender o impacto da hipercolesterolemia nas células cerebrais.

1.1. COLESTEROL E METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS

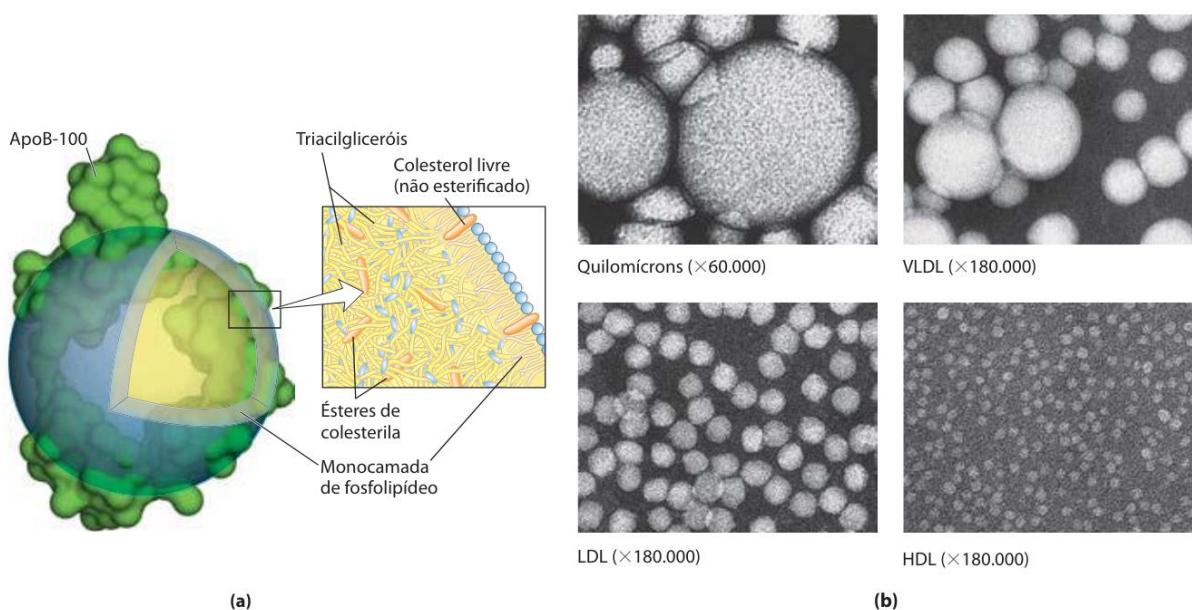
Apesar da hipercolesterolemia ter impactos significativos na saúde do indivíduo, é importante destacar que o colesterol é essencial para o funcionamento normal do organismo. Ele é um dos componentes constitutivos da membrana plasmática e da bainha de mielina dos neurônios, participa da transdução de sinais intracelulares, além de ser fundamental para a síntese de hormônios esteroides, ácidos biliares e vitamina D (Goedeke; Fernández-Hernando, 2012; Simons; Ikonen, 2000).

O colesterol é um álcool não saturado da família dos compostos lipídicos e compostos esteroides (Nelson; Cox, 2017). É um composto tricíclico que contém 27 átomos de carbono e é sintetizado a partir da Acetilcoenzima-A (Craig; Yarrarapu;

Dimri, 2023). A homeostase do colesterol é um processo crucial e precisamente regulado, sendo o fígado, o principal órgão responsável por isso. Em condições fisiológicas aproximadamente 80% do colesterol nos seres humanos é provindo de síntese endógena (síntese *de novo*) enquanto os outros 20% são obtidos de forma exógena, a partir da dieta (Nelson; Cox, 2017).

Devido ao seu caráter hidrofóbico, principalmente quando esterificado, o colesterol necessita de moléculas carreadoras, chamadas de lipoproteínas, para poder ser transportado na corrente sanguínea. As lipoproteínas são compostas por uma parte externa hidrofílica (fosfolipídios, colesterol livre e proteínas denominadas apolipoproteínas) e uma parte interna hidrofóbica (colesterol esterificado e triglicerídeos) (Hegele, 2009). As lipoproteínas são classificadas de acordo com seu tamanho e composição como lipoproteína de alta densidade (HDL), LDL, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e quilomícrons (QM) (Figura 1). As Apolipoproteínas (Apo), além de servirem como componentes estruturais, funcionam como sinalizadores que direcionam as lipoproteínas aos tecidos-alvo, e ativam enzimas que agem sobre essas lipoproteínas (Nelson; Cox, 2017; Vance; Vance, 2008).

Figura 1 - Lipoproteínas

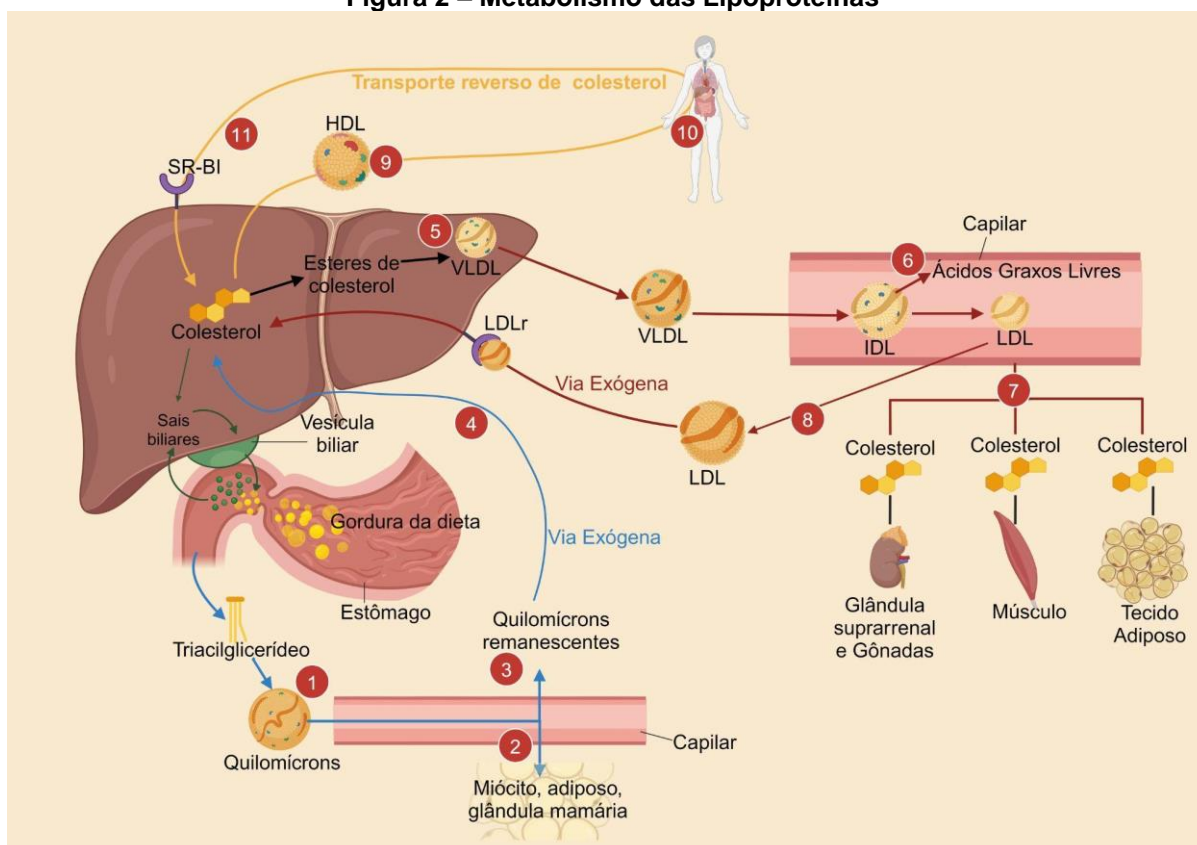


Legenda: (a) Representação gráfica da lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína com alto teor de colesterol e que contém Apolipoproteína B-100. (b) Diferença de tamanho das quatro lipoproteínas. Imagens capturadas por um microscópio eletrônico após coloração negativa. Na parte superior esquerda, quilomícron, 50 a 200 nm de diâmetro; superior direita, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), 28 a 70 nm; inferior esquerda, LDL 20 a 25 nm e inferior direita, lipoproteína de alta densidade (HDL) 8 a 11 nm. (Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2014).

Após a alimentação, o colesterol e os demais lipídeos da dieta são absorvidos pelo intestino e empacotados em QM, a lipoproteína maior e menos densa. Ao longo da corrente sanguínea, a maior parte dos triglicerídeos presentes nos QM são liberados nos tecidos que utilizam os ácidos graxos como fonte ou armazenamento de energia. Os QM, após perderem grande parte do conteúdo de triglicerídeos, são transformados em remanescentes de QM e direcionados ao fígado. No fígado, o colesterol não utilizado, proveniente tanto da dieta quanto da síntese endógena, é esterificado e empacotado juntamente com triglicerídeos e Apo específicas, formando as VLDL. As VLDL são secretadas pelo fígado e transportam triglicerídeos até os músculos e tecido adiposo. À medida que os triglicerídeos das VLDL são removidos, elas se transformam em LDL, as lipoproteínas mais ricas em colesterol livre e ésteres de colesterol, contendo a ApoB-100 como sua principal Apo (Nelson; Cox, 2017; Vance; Vance, 2008).

A LDL transporta o colesterol para os tecidos extra-hepáticos, e o que não é captado pelos tecidos retorna ao fígado. Finalmente, a HDL é principalmente sintetizada no fígado e no intestino delgado, contendo baixo teor de colesterol e alto conteúdo de proteínas. A principal função da HDL é o “transporte reverso do colesterol”, onde irá captar o colesterol dos tecidos extra-hepáticos e transportá-lo até o fígado (Faludi AA *et al.*, 2017), como ilustrado na figura 2.

Figura 2 – Metabolismo das Lipoproteínas



Legenda: Os lipídeos são transportados na corrente sanguínea por moléculas chamadas de lipoproteínas. Na via exógena (setas azuis), os lipídeos da dieta são empacotados em quilomícrons (1); a maior parte do seu conteúdo em triglicérides é liberada nos tecidos adiposo e muscular (2), durante o transporte ao longo dos capilares. Os quilomícrons remanescentes (3) (contendo na maior parte proteínas e colesterol) são captados pelo fígado (4). Na via endógena (setas vermelhas), os lipídeos sintetizados ou empacotados no fígado são distribuídos aos tecidos periféricos pela VLDL (5). A extração dos lipídeos da VLDL (acompanhada pela perda de parte das apolipoproteínas) converte, gradualmente, parte da VLDL em LDL (6), que transporta o colesterol para os tecidos extra-hepáticos (7) ou de volta para o fígado (8). O fígado capta LDL, remanescentes de VLDL (chamadas de lipoproteínas de densidade intermediária, ou IDLs) e os remanescentes de quilomícrons por endocitose mediada por receptor. O excesso de colesterol nos tecidos extra-hepáticos é transportado de volta ao fígado pela HDL (9-11) pelo transporte reverso do colesterol (setas amarelas). Legenda: LDL: Lipoproteínas de baixa densidade, LDLr: Receptor de lipoproteína de baixa densidade, HDL: Lipoproteínas de alta densidade, IDL: lipoproteínas de densidade intermediária, VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade (Fonte: elaborada pelo autor.) - Imagem criada pelo Biorender.

A LDL é a principal carreadora de colesterol no sangue, e está intimamente associada aos danos induzidos pela hipercolesterolemia (Faludi AA *et al.*, 2017; Lewis; Rader, 2005). Nos tecidos, a LDL é captada por meio do receptor de LDL (LDLr), e é este receptor o principal regulador da homeostase do colesterol plasmático. A ApoB100 presente na LDL se liga ao LDLr e ambos são internalizados via endocitose. Nos endossomos, o ambiente ácido promove a dissociação da LDL do LDLr, permitindo que o receptor seja reciclado, retorne à membrana plasmática e inicie um novo ciclo de endocitose. Enquanto isso, a LDL é degradada pelos lisossomos que

se fundem ao endossomo. Neste processo, os componentes proteicos da LDL são hidrolisados em aminoácidos, e os ésteres de colesterol a colesterol livre pela ação da lipase ácida lisossomal (Nelson; Cox, 2017).

Além disso, o colesterol pode ser convertido em 27-hidroxicolesterol (27-OH) pelo citocromo P450 27A1 (CYP27A1), um processo que ocorre predominantemente na periferia (Russell, 2000). O 27-OH tem a capacidade de atravessar livremente a BHE e entrar no SNC (Björkhem *et al.*, 2009). Já a LDL e demais lipoproteínas não transpassam a BHE. De fato, em condições fisiológicas e de saúde, no SNC o metabolismo do colesterol é independente da periferia (Björkhem; Meaney; Fogelman, 2004).

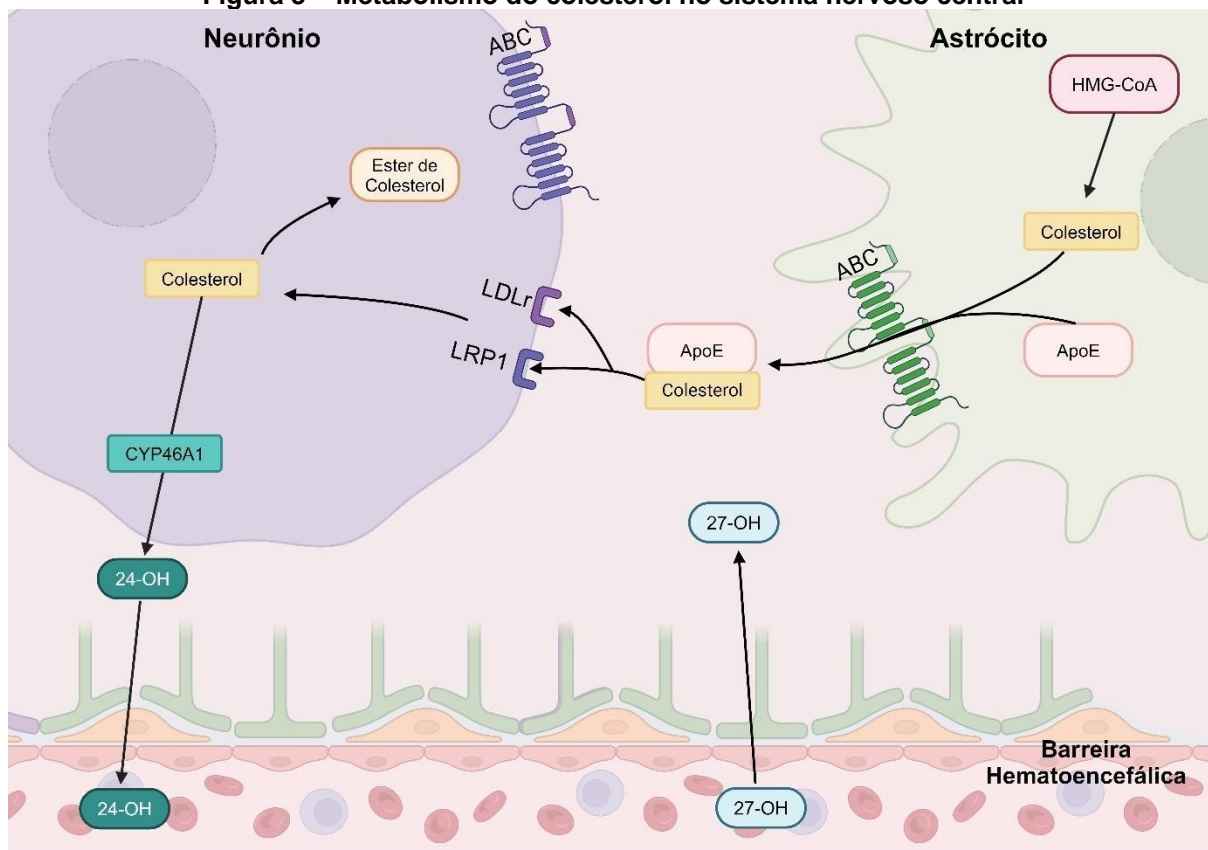
1.2.METABOLISMO DO COLESTEROL NO SNC

Em seres humanos adultos, aproximadamente 25% do colesterol corporal está localizado no cérebro, predominantemente na forma não esterificada (Dietschy; Turley, 2004). O colesterol desempenha um papel crucial na manutenção da integridade estrutural e na fluidez da membrana plasmática das células cerebrais (Dietschy; Turley, 2004). Além disso, o colesterol é essencial para a formação da bainha de mielina pelos oligodendrócitos (Saher; Quintes; Nave, 2011) e para a formação de sinapses e dendritos (Goritz; Mauch; Pfrieger, 2005).

Como já mencionado, o metabolismo do colesterol do SNC é independente do metabolismo periférico, uma vez que as lipoproteínas sanguíneas, como a LDL, não conseguem transpassar a BHE (Björkhem; Meaney; Fogelman, 2004). Portanto, no cérebro adulto, o aporte de colesterol se dá principalmente através da síntese realizada pelos astrócitos, e sua distribuição para as outras células (Dietschy; Turley, 2004; Nieweg; Schaller; Pfrieger, 2009).

Nos astrócitos, o colesterol sintetizado associa-se a ApoE e fosfolípidos, formando uma lipoproteína semelhante a HDL periférica (Boyles *et al.*, 1985). Esta lipoproteína é secretada pelos astrócitos via transportadores ABC, principalmente ABCA1, e é então incorporada pelo neurônio através de endocitose mediada por receptores, como LDLr ou proteína-1 relacionada ao receptor de LDL (LRP1) (Pfrieger; Ungerer, 2011), como ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Metabolismo do colesterol no sistema nervoso central



Legenda: No cérebro adulto, o colesterol é produzido pelos astrócitos e distribuído para as outras células do Sistema Nervoso Central (SNC). Após ser sintetizado o colesterol associa-se a ApoE e é secretado via transportadores ABC. ApoE é reconhecida pelos receptores LDLr e LRP1 dos neurônios. O colesterol é então incorporado pelo neurônio via endocitose mediada por receptores. O excesso de colesterol nos neurônios pode ser convertido em 24 hidroxicolesterol pela CYP46A1 e liberados para a corrente sanguínea, já que atravessam livremente a barreira hematoencefálica. Da mesma forma, o colesterol periférico pode ser convertido em 27 hidroxicolesterol e entrar livremente no SNC. Legenda: 24-OH, 24-hidroxicolesterol; 27-OH, 27 hidroxicolesterol; ApoE, Apolipoproteína E; LDLr, Receptor de LDL; e LRP1, Proteína 1 relacionada ao receptor de LDL. Figura criada no Biorender.

Nos neurônios, após internalizada, a ApoE contendo colesterol é transportada para o endolisossomo, onde os ésteres de colesterol são hidrolisados em colesterol livre. Esse colesterol livre é transportado para fora dos endolisossomos através de proteínas Niemann-Pick tipo C (Jerome, 2010; Vance; Karten; Hayashi, 2006). Para manter as concentrações adequadas de colesterol no SNC, o colesterol pode ser convertido em 24-hidroxicolesterol (24-OH) pelo Citocromo P450 46A1 (CYP46A1) nos neurônios (Lund; Guileyardo; Russell, 1999). O 24-OH, por sua vez, consegue atravessar a BHE livremente e ser metabolizado no fígado (Björkhem *et al.*, 2001; Moutinho; Nunes; Rodrigues, 2016).

Na partícula rica em ApoE, além de colesterol, contém ácidos graxos na forma de triglicerídeos, no entanto, os neurônios não os utilizam como fonte de energia preferencial. Este fato se deve principalmente porque a beta-oxidação dos ácidos

graxos gera uma quantidade maior de espécies reativas de oxigênio (ERO). Os neurônios são particularmente vulneráveis aos danos induzidos pelas ERO devido à sua defesa antioxidante limitada (Schönfeld; Reiser, 2021). Assim, os ácidos graxos são liberados no citosol dos neurônios, empacotados em partículas ricas em ApoE e transferidos para os astrócitos via transportadores ABC. Os neurônios, em condições normais, possuem pouca ou nenhuma gota lipídica (Islimye; Girard; Gould, 2022), ao contrário dos astrócitos. Dessa forma, os ácidos graxos transportados dos neurônios para os astrócitos podem ser armazenados em gotículas lipídicas e posteriormente serem utilizados como fonte energética (Lee *et al.*, 2017). Gotículas lipídicas são organelas evolutivamente conservadas que armazenam dinamicamente ácidos graxos (Walther; Chung; Farese, 2017).

1.3. PAPEL OXI-INFLAMATÓRIO DA HIPERCOLESTEROLEMIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

As perturbações no metabolismo e na captação do colesterol podem levar ao seu acúmulo na corrente sanguínea, caracterizando a hipercolesterolemia (Brown; Goldstein, 1984). A hipercolesterolemia pode ser adquirida, devido a hábitos de vida, ou ter caráter genético. A principal forma de hipercolesterolemia de origem hereditária é chamada HF. A HF é causada predominantemente por anormalidades no gene que codifica o LDLr, resultando em um metabolismo ineficaz da LDL (Hobbs; Brown; Goldstein, 1992).

Altas concentrações plasmáticas de colesterol, principalmente o presente na LDL, são um importante e conhecido fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Mozaffarian *et al.*, 2015). Além disso, nas últimas décadas, a hipercolesterolemia tem sido associada ao comprometimento cognitivo leve e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a DA (Kivipelto *et al.*, 2001; Kivipelto; Solomon, 2006). No ano de 2024, altas concentrações plasmáticas de LDL, na meia idade, passou a ser considerado um fator de risco para demência (Livingston *et al.*, 2024).

Estudos pré-clínicos já evidenciaram prejuízo cognitivo, particularmente na memória, tanto em animais modelo para a HF (os camundongos LDLr^{-/-}) (de Oliveira *et al.*, 2011; 2020; Engel *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2012; Mulder *et al.*, 2004), quanto em animais com hipercolesterolemia induzida por dieta (Mancini *et al.*, 2021; Moreira

et al., 2014; Rodrigues *et al.*, 2021; Ullrich; Pirchl; Humpel, 2010). Esses déficits cognitivos foram associados a uma disfunção no hipocampo, principal área cerebral envolvida com a formação de memória (Bird; Burgess, 2008). Todavia, os mecanismos pelos quais a hipercolesterolemia induz danos cerebrais ainda não estão bem estabelecidos, embora algumas hipóteses tenham sido propostas ao longo do tempo (de Bem *et al.*, 2021; de Oliveira; Moreira; de Bem, 2024).

É amplamente conhecido que altas concentrações de LDL circulante induzem disfunção endotelial (como revisado no Capítulo I). Este pode ser um dos fatores que levam à disfunção da BHE, que parece estar implicada nos prejuízos cognitivos encontrados em animais hipercolesterolêmicos (de Oliveira *et al.*, 2020). Animais que receberam uma dieta rica em colesterol apresentam aumento da permeabilidade da BHE no hipocampo (Chen *et al.*, 2008), no córtex cerebral (Chen *et al.*, 2008) e em outras regiões cerebrais (Chen *et al.*, 2008; Chen; Ghribi; Geiger, 2010).

Um estudo conduzido por de Oliveira e colaboradores (2020) observaram que tanto camundongos modelos para HF (LDLr^{-/-}), quanto animais C57bl/6 com hipercolesterolemia moderada, induzida por dieta, exibem alterações na permeabilidade da BHE no hipocampo. Ainda mais importante, este trabalho evidenciou que uma dieta rica em colesterol agrava a disfunção da BHE encontrada em camundongos LDLr^{-/-} (de Oliveira *et al.*, 2020), demonstrando o importante papel que altas concentrações de colesterol têm sobre a integridade da BHE.

Com a integridade da BHE prejudicada, componentes do sistema periférico, como a LDL, conseguem adentrar o parênquima cerebral. Neste contexto, estudos experimentais em animais hipercolesterolêmicos já demonstraram a presença de ApoB (Chen *et al.*, 2010) e ApoB100 (Löffler *et al.*, 2013) no SNC. Cabe ressaltar que a ApoB é a Apo presente na LDL, que em condições normais não são encontradas no cérebro (Pitas *et al.*, 1987). Uma vez presente no SNC, ApoB é reconhecida pelos LDLr e endocitada, levando ao aumento e acúmulo de colesterol nos neurônios (Ghribi *et al.*, 2006). Especificamente, animais com hipercolesterolemia induzida por dieta exibem alterações no metabolismo do colesterol cerebral, com aumento do conteúdo de colesterol no cérebro (Sparks *et al.*, 1994) e nos neurônios do hipocampo (Ghribi *et al.*, 2006). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que o extravasamento de LDL para micróglia adjacentes ao vaso induz o comprometimento das propriedades regenerativas das micróglia (Zhou *et al.*, 2024).

Além disso, já foi demonstrado que altas concentrações de LDL provocam alterações na função e estrutura dos endolisossomos, tanto em um estudo *in vivo* (Chen *et al.*, 2010) quanto em um estudo *in vitro* utilizando cultura primária de neurônios exposta à LDL (Hui; Chen; Geiger, 2012). Alterações na morfologia e função dos endolisossomos são consideradas marcadores precoces da DA (Tate; Mathews, 2006). A disfunção dos endossomos induzidos pela hipercolesterolemia em animais está implicada na diminuição das áreas sinápticas e no aumento de A β e tau fosforilada, condições características da DA (Chen *et al.*, 2010).

Como mencionado anteriormente, alterações sinápticas são marcadores de DA e declínio cognitivo leve (Anand; Schoo, 2024). Nesse contexto, estudos experimentais relataram que camundongos modelo para HF exibem número reduzido de sinaptofisina no hipocampo (Mulder *et al.*, 2004, 2007), além de exibirem um número reduzido de células em proliferação e de conexões sinápticas no giro denteado (Mulder *et al.*, 2007). Além disso, animais com hipercolesterolemia induzida por dieta têm uma diminuição na expressão de sinaptofisina no bulbo olfatório (Chen *et al.*, 2010). Em cultura primária de neurônios expostos à LDL, também há uma expressão diminuída de sinaptofisina (Hui; Chen; Geiger, 2012). A hipercolesterolemia também induz alterações no sistema colinérgico em animais (Moreira *et al.*, 2014; Paul; Borah, 2017; Ullrich; Pirchl; Humpel, 2010), demonstrando uma plasticidade neuronal reduzida em camundongos LDLr^{-/-}, assim como importantes alterações sinápticas induzidas pela hipercolesterolemia.

Outro importante fator que acarreta em danos cognitivos é o estresse oxidativo, que induz danos a macromoléculas e pode levar a morte neuronal (Niedzielska *et al.*, 2015). Tanto animais modelos de HF (De Oliveira *et al.*, 2014), quanto animais com hipercolesterolemia induzida por dieta (Paul; Borah, 2017; Prasanthi *et al.*, 2010) apresentam aumento da produção de espécies reativas (ER) no hipocampo. Somado a isso, uma dieta rica em colesterol reduz a atividade da glutatona redutase (GR) no cérebro total de ratos (Otunola *et al.*, 2014). Em camundongos LDLr^{-/-} a atividade da GR é aumentada aos três meses de idade (Moreira *et al.*, 2012) e reduzida aos cinco meses no hipocampo (De Oliveira *et al.*, 2014). Ainda, a hipercolesterolemia induzida por dieta diminui os níveis de glutatona (GSH) (Gökkus; Mostafazadeh, 2003; Montilla *et al.*, 2006), a atividade da superóxido dismutase (SOD) (Afonso *et al.*, 2013; Montilla *et al.*, 2006; Otunola *et al.*, 2014) e a atividade da Catalase (CAT) (Montilla *et al.*, 2006) no cérebro de ratos. Coelho alimentados com uma dieta rica em colesterol

apresentam uma diminuição da razão GSH/GSSG no hipocampo (Prasanthi *et al.*, 2010).

A elevação de espécies reativas causada pela hipercolesterolemia induzida por dieta leva a peroxidação lipídica em amostra de cérebro total de ratos (Gökkus; Mostafazadeh, 2003; Montilla *et al.*, 2006; Otunola *et al.*, 2014) e hipocampo de coelhos (Prasanthi *et al.*, 2010). Ademais, a hipercolesterolemia induz a carbonilação de proteínas no hipocampo de coelhos (Aytan *et al.*, 2008).

Alteração na permeabilidade da BHE e extravasamento de componentes para o parênquima cerebral resultam em neuroinflamação. Camundongos modelo para HF exibem astrogliose desde jovens (de Oliveira *et al.*, 2020) e aumento da densidade microglial no hipocampo (Rodrigues *et al.*, 2023) que parece se manter até a meia idade (14 meses). Somado a isso, a neuroinflamação encontrada nos camundongos LDLr^{-/-} parece se agravar quando os mesmos recebem uma dieta rica em colesterol/gordura (Thirumangalakudi *et al.*, 2008). Hipercolesterolemia induzida por dieta também induz neuroinflamação no hipocampo, evidenciada pela microgliose (Chen *et al.*, 2018; Granholm *et al.*, 2008; Ledreux *et al.*, 2016; Thirumangalakudi *et al.*, 2008) e astrogliose (Chen *et al.*, 2018; Paul; Borah, 2017) de animais. Juntamente com isso, no hipocampo de animais hipercolesterolêmicos, há um aumento da expressão de genes associados à resposta inflamatória (Abuelezz; Hendawy, 2021), e de citocinas pró inflamatórias (Abuelezz; Hendawy, 2021; Chen *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2005; Thirumangalakudi *et al.*, 2008).

Dessa forma, a neuroinflamação mediada por micróglia parece ter um importante papel nas alterações cognitivas induzidas pela hipercolesterolemia. Em animais LDLr^{-/-} foi observado um aumento no número de micróglia na região perivascular. Além disso, quando esses camundongos receberam o tratamento de minociclina, um modulador microglial, houve uma melhora da função cognitiva dos animais hipercolesterolêmicos (Rodrigues *et al.*, 2023), sugerindo o papel das micróglia na disfunção cognitiva induzida pela hipercolesterolemia.

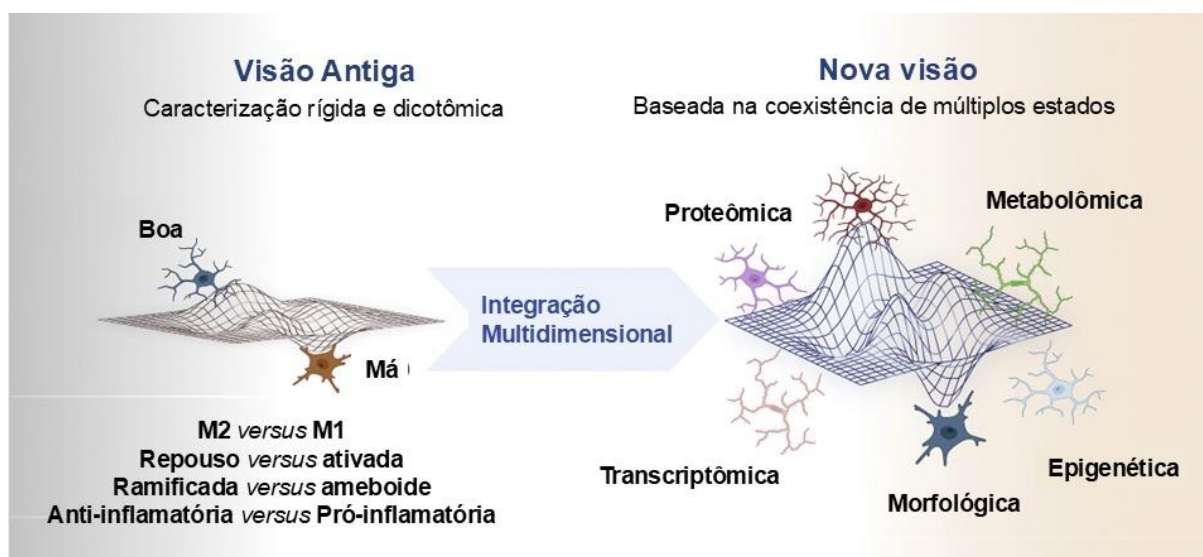
1.4. MICROGLIAS E NEURÔNIOS NO CONTEXTO DA HIPERCOLESTEROLEMIA

As micróglia são células imunológicas residentes do SNC que contribuem ativamente para a fisiologia e homeostase do cérebro, respondendo a qualquer alteração do ambiente (Nimmerjahn; Kirchhoff; Helmchen, 2005). Elas coordenam

processos fisiológicos essenciais como a sinaptogênese, mielinização (Reemst *et al.*, 2016), poda sináptica (Paolicelli *et al.*, 2011; Schafer *et al.*, 2012), regulação do fluxo sanguíneo cerebral e do acoplamento neurovascular (Bisht *et al.*, 2021; Császár *et al.*, 2022).

Por muito tempo, acreditava-se que a micróglia estava apenas em dois estados, M1 e M2 ou ainda, em repouso e ativada. No entanto, ao longo dos anos, percebeu-se que esses termos eram inconsistentes com as diversas funções e estados da micróglia. Então, novas designações surgiram com base nas características apresentadas por cada estado microglial (Paolicelli *et al.*, 2022) (Fig. 3). De particular interesse, as micróglias podem ser classificadas como: micróglia associada à doença, originalmente associada aos modelos de patologia da DA, fenótipo neurodegenerativo microglial e micróglia acumuladora de gotículas lipídicas (LDAMs).

Figura 5 – A jornada da nomenclatura da micróglia: De uma visão dicotômica à descoberta de um espectro de estados e funções multidimensionais



Fonte: Adaptado de Paolicelli *et al.*, 2022.

Micróglias *in vivo* e *in vitro* expostas ao LPS exibem um aumento de gotículas lipídicas (LDAM). Essas micróglias ricas em gotículas lipídicas parecem ter déficits de fagocitose, aumento da geração de ERO e liberam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Marschallinger *et al.*, 2020). A atividade fagocítica das micróglias é fundamental para homeostase cerebral, inclusive a capacidade das micróglias de fagocitar fibrilas e agregados A β , essenciais para a depuração do peptídeo A β (Colton; Wilcock, 2010; D'Andrea; Cole; Ard, 2004).

Como mencionado anteriormente, estudos experimentais evidenciaram que a hipercolesterolemia leva à microgliose em camundongos LDLr^{-/-} (Rodrigues *et al.*, 2023; Thirumangalakudi *et al.*, 2008). Contudo, até o momento, pouco se sabe sobre o efeito da hipercolesterolemia nas micróglia e qual fenótipo elas assumem nessa condição. Chen e colaboradores (2018) mostraram que camundongos fêmeas idosas submetidas a uma dieta rica em colesterol apresentam no hipocampo um aumento de expressão de CD68, enquanto a expressão de CD206 foi diminuída nas fêmeas idosas e aumentada com a dieta hipercolesterolêmica. A expressão de CD68 geralmente está associada com um perfil inflamatório da micróglia, enquanto CD206 é mais pró-resolutivo. Esse mesmo estudo evidenciou que os níveis desses marcadores não foram alterados em fêmeas jovens que receberam dieta rica em colesterol (Chen *et al.*, 2018). Somado a isso, Keller e colaboradores (1999) relataram que em uma linhagem de micróglia de camundongo exposta à LDL houve um aumento na produção de espécies reativas (Keller *et al.*, 1999).

Curiosamente, um estudo *in vitro* relatou que a exposição ao colesterol em uma linhagem de micróglia expostas ao LPS atenuou a expressão de genes associado com a resposta imune inata e quimiotaxia, além de regular positivamente a expressão de genes anti-inflamatórios. O meio condicionado dessas micróglia teve um efeito neuroprotetor em células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) expostas ao peptídeo A β (de Dios *et al.*, 2023). De forma controversa, em culturas isoladas de micróglia de ratos que foram estimuladas com LPS, a redução dos níveis de colesterol induzidas pelo metil- β -ciclodextrina levou a uma diminuição na liberação de TNF α pelas micróglia. Interessantemente, a exposição ao metil- β -ciclodextrina resultou em uma diminuição da proporção de fagócitos ativos e na fagocitose de micróglia estimuladas com LPS, que foi restaurada com a exposição ao colesterol (Churchward; Todd, 2014).

Adicionalmente, os neurônios parecem ser altamente afetados pela hipercolesterolemia. Estudos experimentais já demonstraram que animais modelos para HF apresentam um número menor de células em proliferação no hipocampo (Engel *et al.*, 2019; Mulder *et al.*, 2007) e menor neurogênese (Engel *et al.*, 2019). Além disso, camundongos LDLr^{-/-} apresentam diminuição da proliferação celular no giro denteado desde jovens, aos 3 meses de idade (Engel *et al.*, 2019), condição que se mantém até os 14 meses de idade (Mulder *et al.*, 2007). Da mesma forma, quando células precursoras do hipocampo de camundongo foram expostas à LDL ou tiveram

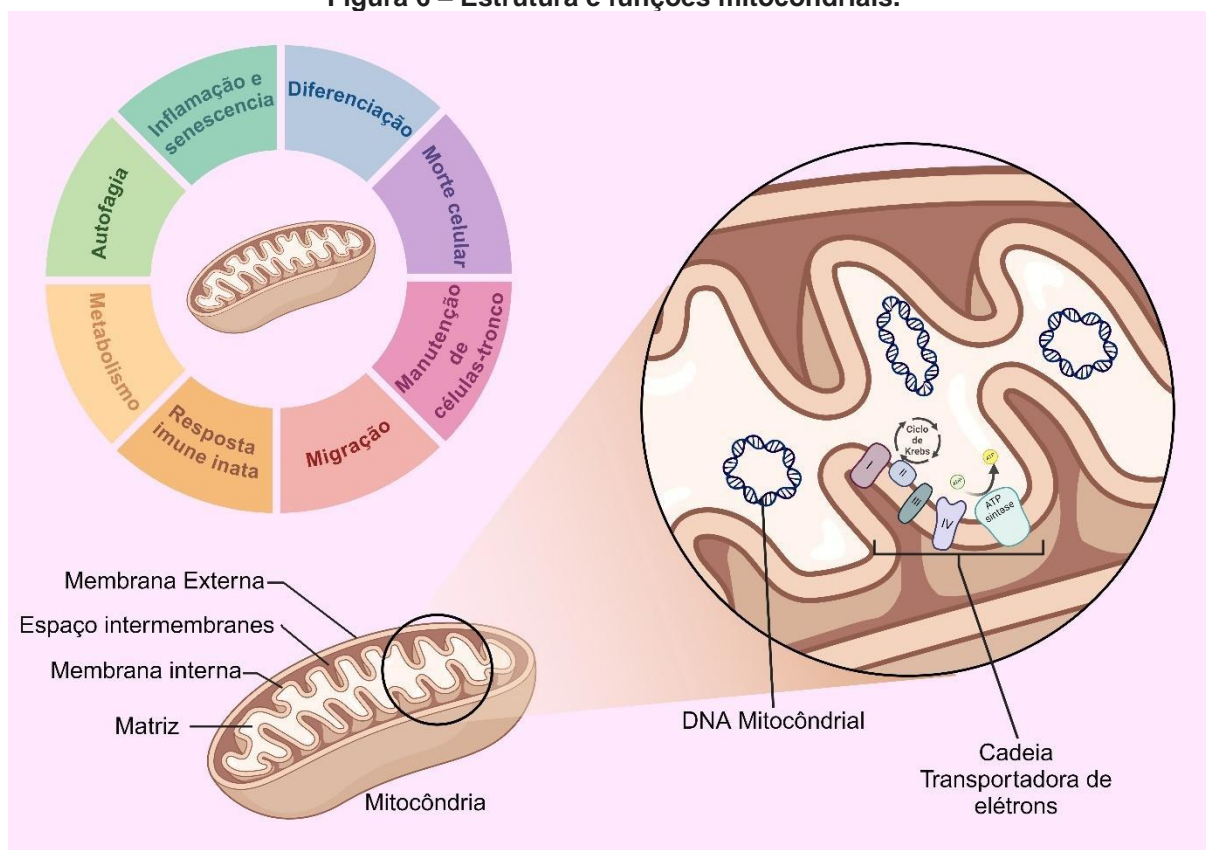
uma regulação negativa do LDLr, a proliferação celular foi diminuída (Engel *et al.*, 2019).

Camundongos LDLr^{-/-} também exibem alteração nos níveis de RNAm de proteínas associadas com a apoptose no hipocampo. Ainda mais importante, a marcação de apoptose colocaliza-se com os neurônios, evidenciando morte neuronal em camundongos LDLr^{-/-} (de Oliveira *et al.*, 2020). Ainda, células SH-SY5Y expostas ao colesterol são mais suscetíveis à morte celular induzida pelo A β (de Dios *et al.*, 2023). Em células de neuroblastoma humano, a exposição ao colesterol intensificou a geração de ER causadas pelo A β (de Dios *et al.*, 2023), assim como a exposição ao LDL, *per se*, levou ao aumento de produção de ER (Engel *et al.*, 2016). Ainda, os neurônios necessitam que suas mitocôndrias estejam viáveis para que possam suprir toda a necessidade energética que eles necessitam (Kann; Kovács; Kann, 2007). Deste modo, alterações mitocondriais desempenham efeitos significativos na viabilidade neuronal.

1.5. FUNÇÃO MITOCONDRIAL ASSOCIADA A DISFUNÇÃO COGNITIVA

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e que têm inúmeras funções nas células, sendo a formação de ATP pela fosforilação oxidativa a mais conhecida. A mitocôndria é formada por uma membrana externa e uma membrana interna, com composição e funções distintas (Giacomello *et al.*, 2020) (Ilustrado na Figura 6). Na matriz mitocondrial são formados NADH e FADH₂, pelo Ciclo de Krebs. Estas coenzimas reduzidas, por sua vez, doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, presente na membrana mitocondrial interna (MMI) (Hüttemann *et al.*, 2008). A cadeia transportadora de elétrons é formada por quatro complexos mitocondriais, que além de participarem de reações redox, bombeiam prótons para o espaço intermembranas. O gradiente de prótons gerado pelos complexos mitocondriais (I, III e IV) é utilizado pela ATP sintase, ou também chamado de complexo V, para fosforilar ADP em ATP (Giacomello *et al.*, 2020). Além disso, a mitocôndria é uma das principais fontes de geração de ERO, pelos complexos I e III (Muller; Liu; Van Remmen, 2004; Murphy, 2009), o que pode ser agravado na presença de estressores e toxinas (Nishimura *et al.*, 2021).

Figura 6 – Estrutura e funções mitocondriais.



Legenda: No canto superior esquerdo, esquematização dos processos celulares os quais as mitocôndrias participam. Na parte inferior, esquematização da estrutura mitocondrial. Imagem criada pelo Biorender.

Como forma de modular a função mitocondrial, as mitocôndrias têm a capacidade de alterar seu tamanho, forma e organização (Friedman; Nunnari, 2014). Este processo é chamado de dinâmica mitocondrial, no qual as mitocôndrias podem se fundir umas às outras (fusão) ou se dividirem por fissão, dependendo do estímulo (Figura 7). Além disso, as mitocôndrias podem ser degradadas por autofagia, um processo conhecido como mitofagia (Green; Brand; Murphy, 2004).

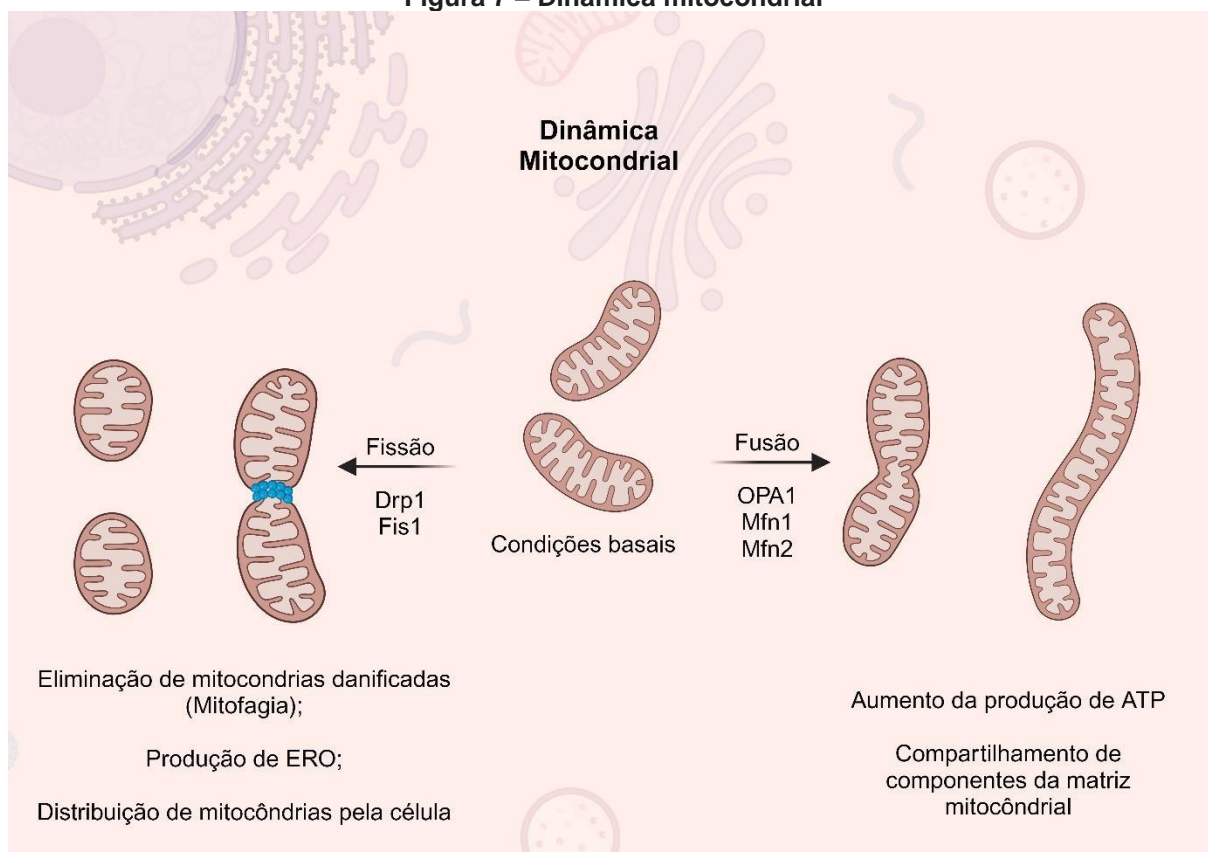
A coordenação desses processos garante a manutenção da forma, distribuição e crescimento das mitocôndrias, que é essencial para a homeostase, estabilidade e sobrevivência celular (Calo *et al.*, 2013; Twig; Shirihai, 2011). Da mesma forma, disfunções desses processos podem levar a alterações na função mitocondrial e bioenergética celular. Por exemplo, já foi demonstrado que existe uma produção aumentada de ATP em mitocôndrias fundidas (Westermann, 2012) e, em mitocôndrias fragmentadas, que passaram por fissão, há maior produção de ERO. Alterações na fissão mitocondrial mantêm mitocôndrias danificadas, o que gera efeitos negativos na atividade dos complexos mitocondriais, na produção de ATP e, conseqüentemente leva à morte celular (Galloway *et al.*, 2012). Entretanto, a fragmentação mitocondrial

é necessária para a distribuição equivalente de mitocôndrias para células-filhas durante a divisão celular (Giacomello *et al.*, 2020).

Mitocôndrias disfuncionais contendo proteínas e membranas danificadas, e até alterações no DNA mitocondrial, promovem a divisão e fragmentação mitocondrial por fissão (Frank *et al.*, 2012; Scott; Youle, 2010). A fissão mitocondrial garante que a porção danificada seja eliminada, sendo esse processo coordenado principalmente pela proteína relacionada à dinamina 1 (Drp1) (Boldogh; Pon, 2006; Hollenbeck; Saxton, 2005). A Drp1 irá interagir com proteínas presentes na membrana mitocondrial externa (MME), como a proteína de fissão mitocondrial 1 (Fis1). Em seguida, a Drp1 forma uma estrutura semelhante a um anel ao redor da mitocôndria e a membrana mitocondrial é então dividida por meio da hidrólise de GTP (Lee; Yoon, 2016; Losó n *et al.*, 2013) (Figura 7).

A fusão mitocondrial, por sua vez, é o processo pelo qual duas mitocôndrias se fundem e compartilham seus conteúdos, como DNA mitocondrial, metabólitos, proteínas e lipídeos (Lacombe; Scorrano, 2024). As principais moléculas associadas com a fusão mitocondrial são a proteína de atrofia óptica 1 (OPA 1), localizada na MMI, e as mitofusinas (Mfn) 1 e 2 presentes na MME. Deste modo, a Mfn1 e a Mfn2 são responsáveis pela fusão da MME enquanto a OPA1 é responsável pela fusão da MMI. Além disso, OPA1 desempenha um papel crucial na formação e na manutenção da junção das cristas mitocondriais (Frezza *et al.*, 2006) (Figura 7).

Figura 7 – Dinâmica mitocondrial



Legenda: Dependendo do estímulo, as mitocôndrias podem passar por fissão e se dividir. Esse processo é coordenado principalmente pela Drp1 e Fis1. As mitocôndrias podem passar por fissão para eliminação de partes mitocondriais danificadas ou para distribuição de mitocôndrias pela célula ou até para as células-filhas, durante a divisão celular. O processo de fusão mitocondrial é orquestrado principalmente pela OPA-1, Mfn1 e Mfn2. A fusão mitocondrial leva ao aumento da produção de ATP e ao compartilhamento de componentes presentes na matriz mitocondrial. Figura criada no BioRender.

Como mencionado anteriormente, o funcionamento adequado das mitocôndrias é essencial para os neurônios devido à alta demanda energética necessária para suas funções, além de fornecer intermediários importantes para a síntese de neurotransmissores (Guo; Tian; Du, 2017). Não obstante, alterações na geração de ATP podem levar a morte neuronal (Sebastián; Palacín; Zorzano, 2017). A disfunção mitocondrial é encontrada em doenças neurodegenerativas (Calkins *et al.*, 2011; Filosto *et al.*, 2011) e tem sido sugerida como um possível alvo terapêutico no tratamento dessas doenças (Rai *et al.*, 2020; Trushina; Nguyen; Trushin, 2023).

Estudos experimentais mostraram que a HF (de Oliveira *et al.*, 2011; De Oliveira *et al.*, 2013) e a hipercolesterolemia induzida por dieta (Mancini *et al.*, 2021; Paul; Borah, 2017) levam a prejuízos mitocondriais. De particular interesse, no córtex cerebral de animais, a atividade dos complexos I e II mitocondriais foi negativamente relacionada com os níveis de colesterol plasmático (de Oliveira *et al.*, 2011), indicando um efeito significativo da hipercolesterolemia na função mitocondrial.

Tendo em vista que a hipercolesterolemia leva a alterações cognitivas, e que o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não está totalmente claro, o presente estudo teve como objetivo avaliar, em linhagens de micróglia e de neurônios, o efeito que a exposição à LDL e o plasma de animais hipercolesterolêmicos têm na função mitocondrial, na autofagia e na formação de gotas lipídicas. Nossa principal hipótese é que durante hipercolesterolemia, devido à disfunção da BHE, as células cerebrais ficam expostas à LDL causando modulações nas micróglias, induzindo estados disfuncionais destas células. Além disso, acreditamos que tanto a LDL como fatores mediadores liberados pela micróglia podem causar neurotoxicidade, e que as mitocôndrias neuronais, bem como as gotas lipídicas, podem ser importantes alvos da hipercolesterolemia.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Elucidar os efeitos prejudiciais da hipercolesterolemia nas células do sistema nervoso central, com ênfase no impacto da exposição à LDL nas mitocôndrias da linhagem celular neuronal do hipocampo, na função digestiva microglial e na influência dos mediadores liberados pela micróglia sobre neurônios.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Revisar na literatura o impacto da hipercolesterolemia no endotélio e sua associação com a alteração na permeabilidade da barreira encefálica, assim como o efeito no sistema nervoso central

ii) Investigar o impacto que a exposição à LDL tem sobre a função mitocondrial de uma linhagem de neurônios de hipocampo de camundongos;

iii) Investigar o efeito que a exposição à LDL e ao plasma hipercolesterolêmico tem sobre uma linhagem de células microgliais de camundongos; além de compreender o impacto de mediadores liberados por micróglia expostas à LDL e ao plasma hipercolesterolêmico, por meio do uso de meio condicionado, sobre uma linhagem de neurônios de hipocampo de camundongos.

PARTE II

2. CAPÍTULO I

Revisão de literatura submetida na revista “Metabolic Brain Disease”, que será aqui apresentado no formato exigido pela revista

Hypercholesterolemia, oxidative stress, and low-grade inflammation: a potentially dangerous scenario to blood-brain barrier

Hémelin Resende Farias^a, Lílian Corrêa Costa-Beber^b, Fátima Theresinha da Costa Rodrigues Guma^b, Jade de Oliveira^a

^aLaboratory of investigation on metabolic disorders and neurodegenerative diseases, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

^bGumaLab, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

Corresponding author: Jade de Oliveira, Depto. Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; e-mail: deoliveirajade10@gmail.com

ORCID ID:

Hémelin Resende Farias^a: 0000-0003-4918-4982

Lílian Corrêa Costa-Beber^b : 0000-0001-7796-1641

Fátima Theresinha da Costa Rodrigues Guma^b: 0000-0003-2369-7739

Jade de Oliveira^a: 0000-0003-1454-2866

ABSTRACT: For more than a century, hypercholesterolemia has been linked to atherosclerotic cardiovascular disease. Notably, this metabolic condition has also been pointed out as a risk factor for neurodegenerative diseases, such as Alzheimer’s disease. Oxidative stress seems to be the connective factor between hypercholesterolemia and diseases such as cardiac and brain pathology. By disturbing redox homeostasis, hypercholesterolemia impairs nitric oxide availability, an essential vasoprotective element, and jeopardizes endothelial function and selective permeability. The Central Nervous System is partially protected from peripheral insults due to an arrangement between endothelial cells, astrocytes, microglia, and pericytes that form the blood-brain barrier (BBB). The endothelial dysfunction related to hypercholesterolemia increases the risk of developing cardiovascular diseases and also initiates BBB breakdown, which is a cause of brain damage characterized by neuroinflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and, ultimately, neuronal and synaptic impairment. In this regard, we reviewed the mechanisms by which hypercholesterolemia-induced oxidative stress affects peripheral vessels, BBB, and leads to memory deficits. Finally, we suggest oxidative stress as the missing link between hypercholesterolemia and dementia.

Keywords: cholesterol; oxidative stress; inflammation; endothelial dysfunction; Dementia; mild cognitive impairment.

3. CAPÍTULO II

Artigo publicado em *preprint* e na revista “Molecular Neurobiology”, que será aqui apresentado nas normas exigidas pela revista



bioRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

HOME | SUBMIT

New Results

Follow this preprint

LDL exposure disrupts mitochondrial function and dynamics in a hippocampal neuronal cell line

Hémelin Resende Farias, Jessica Marques Obelar Ramos, Caroline Griesang, Lucas Santos, Osmar Vieira Ramires Junior, Debora Guerini de Souza, Fernanda Silva Ferreira, Sabrina Somacal, Leo Anderson Meira Martins, Diogo Onofre Gomes de Souza, José Cláudio Fonseca Moreira, Ângela Terezinha de Souza Wyse, Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma, Jade de Oliveira

doi: <https://doi.org/10.1101/2024.06.12.598647>

Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s12035-024-04476-y>

RESEARCH



LDL Exposure Disrupts Mitochondrial Function and Dynamics in a Hippocampal Neuronal Cell Line

Hémelin Resende Farias¹ · Jessica Marques Obelar Ramos¹ · Caroline Tainá Griesang¹ · Lucas Santos^{1,2} · Osmar Vieira Ramires Junior¹ · Debora Guerini Souza¹ · Fernanda Silva Ferreira¹ · Sabrina Somacal³ · Leo Anderson Meira Martins⁴ · Diogo Onofre Gomes de Souza¹ · José Cláudio Fonseca Moreira^{1,2} · Angela T. S. Wyse¹ · Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma¹ · Jade de Oliveira¹

Received: 27 June 2024 / Accepted: 30 August 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

LDL exposure disrupts mitochondrial function and dynamics in a hippocampal neuronal cell line

Hémelin Resende Farias¹, Jessica Marques Obelar Ramos¹, Caroline Tainá Griesang¹, Lucas Santos^{1,2}, Osmar Vieira Ramires Junior¹, Debora Guerini Souza¹, Fernanda Silva Ferreira¹, Sabrina Somacal³, Leo Anderson Meira Martins⁴, Diogo Onofre Gomes de Souza¹, José Cláudio Fonseca Moreira^{1,2}, Angela TS Wyse¹, Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma¹, Jade de Oliveira¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

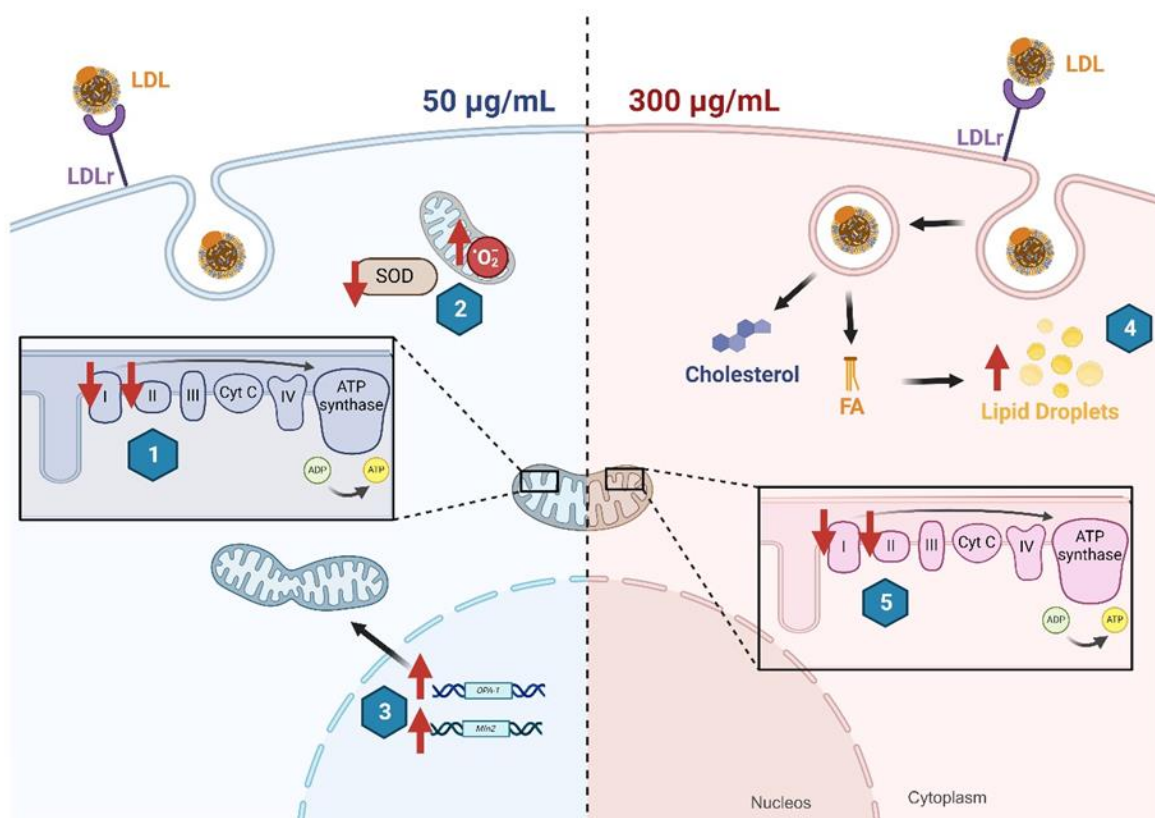
² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Jade de Oliveira, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. Email: deoliveirajade10@gmail.com

LDL-induced mitochondrial dysfunction
HT-22 cells (Mouse Hippocampal Neuron Cell Line)



Graphic Abstract. HT-22 hippocampal neuron cell line exposed to human low-density lipoprotein (LDL). On the left, LDL [50 µg/mL] exposure (1) decreased mitochondrial complex I and II activities, (2) increased mitochondrial superoxide production and decreased superoxide dismutase activity, and (3) increased the expression of genes associated with mitochondrial fusion. On the right, LDL [300 µg/mL] exposure (4) induced intracellular lipid accumulation and (5) decreased mitochondrial complex I and II activities.

ABSTRACT

Hypercholesterolemia has been associated with cognitive dysfunction and neurodegenerative diseases. Moreover, this metabolic condition disrupts the blood-brain barrier, allowing Low-Density Lipoprotein (LDL) to enter the Central Nervous System. Thus, we investigated the effects of LDL exposure on mitochondrial function in a mouse hippocampal neuronal cell line (HT-22). HT-22 cells were exposed to human LDL (50 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hours. After this, intracellular lipid droplet (LD) content, cell viability, cell death, and mitochondrial parameters were assessed. We found that the higher LDL concentration increases LD content compared to control. Both concentrations increased the number of Annexin V-positive cells, indicating apoptosis. Moreover, in mitochondrial parameters, the LDL exposure on hippocampal neuronal cell line leads to a decrease in mitochondrial complexes I and II activities in both concentrations tested and a reduction in Mitotracker™ Red fluorescence and Mitotracker™ Red and Mitotracker™ Green ratio in the higher concentration, indicating mitochondrial impairment. The LDL incubation induces mitochondrial superoxide production and decreases superoxide dismutase activity in the lower concentration in HT-22 cells. Finally, LDL exposure increases the expression of genes associated with mitochondrial fusion (OPA1 and Mitofusin 2) in the lower concentration. In conclusion, our findings suggest that LDL exposure induces mitochondrial dysfunction and modulates mitochondrial dynamics in the hippocampal neuronal cells.

Keywords: Hypercholesterolemia; brain dysfunction; LDL-cholesterol; mitochondria; HT-22 cells.

1 INTRODUCTION

Hypercholesterolemia is a metabolic disorder characterized by high plasmatic cholesterol levels [1]. It is already established that elevated plasmatic cholesterol levels are a risk factor for developing atherosclerotic cardiovascular disease and stroke [2]. Moreover, in the last decades, hypercholesterolemia has been associated with the development of cognitive impairment characteristic of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease [3–6]. Importantly, the low-density lipoprotein (LDL) is strongly associated with damage induced by hypercholesterolemia in the cells [7]. This lipoprotein is responsible for transporting cholesterol from the blood to the tissues [8, 9], however, it is easily oxidized in peripheral tissues[10].

The exact mechanism by which hypercholesterolemia leads to neuronal damage and, consequently, cognitive impairment is unclear, however, some mechanisms have been proposed. Experimental studies in hypercholesterolemic rodents demonstrated alterations in the cholinergic system [11–13] reduced mitochondrial metabolism [13–16], increases in reactive species production [13–17], and alterations in antioxidant enzyme activities [14, 15, 17, 18] in different brain regions.

In the Central Nervous System (CNS), cholesterol metabolism occurs independently of peripheral metabolism since the plasma lipoproteins cannot cross the blood-brain barrier (BBB) [19]. Therefore, under normal conditions, brain cholesterol is derived from astrocytes [20, 21]. However, hypercholesterolemia is associated with BBB disruption [13, 22, 23] and neuroinflammation [11, 13, 24, 25], allowing the entry of compounds of the peripheral system to the CNS, such as LDL [26, 27] and inflammatory factors [28, 29].

In vitro studies have already demonstrated that LDL causes an increase in reactive species production in human neuroblastoma cells [30], disturbs the structure and function of endolysosomes, and increases the Amyloid β production in primary neurons [31]. However, the direct effect of LDL on neuronal mitochondria is unclear. The neurons have high energetic demands to accomplish their functions and need their mitochondria working properly [32–35]. The mitochondria are responsible for several metabolic functions, such as ATP production. Moreover, the mitochondria are the primary source of reactive oxygen species production, mainly in oxidative phosphorylation [36]. Thus, when mitochondrial function is disturbed, especially mitochondrial complex alteration, it leads to energetic deficits and oxidative stress [37].

Mitochondria are remarkably dynamic organelles that control their size, morphology, and number through fusion and fission, processes known as mitochondrial dynamics [38]. The maintenance of the mitochondrial organization, function, and morphology is complex, and it is orchestrated by a group of proteins that maintain the equilibrium between shape and function by coordinating their activities [39]. These proteins are dynamin-related

protein1 (Drp1), mitofusin (Mfn) 1 and Mfn2, and Optic Atrophy 1 (OPA1). The main proteins associated with mitochondrial fusion are Mfn 1 and Mfn 2, which mediate outer mitochondrial membrane fusion, while OPA1 mediates the inner mitochondrial membrane fusion [38]. The main protein associated with mitochondrial fission is Drp1 [40]. Therefore, herein, we investigated the effects of LDL exposure on mitochondrial parameters in HT-22 cells, mainly on mitochondrial function and dynamics, cell death, and oxidative stress.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell Culture and Experimental Design

HT-22 cells (Mouse Hippocampal Neuronal cell line) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, D7777) containing 10% fetal bovine serum (FBS, CRIPION, SP, Brazil) and 100 IU penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, P0781), at 37 °C in 5% CO₂ and 95% air in a humidified atmosphere. HT-22 cells were seeded at the density of 2x10⁴/cm². After 24 hours, HT-22 cells were exposed to LDL (50 or 300 µg/ml) for 24 hours (as illustrated in Fig. 1). Ideally, employing the precise LDL concentration found within the human or mouse brain with hypercholesterolemia would optimize experimental rigor. However, this information remains unavailable. The concentration used in this work was based on previous studies that evaluated the effect of LDL on CNS cells [12, 30, 31]. Furthermore, using human LDL in a rodent cell line presents potential limitations, although precedent exists demonstrating the capacity of rodent neurons to internalize human LDL [31]. The control cells were incubated only with DMEM. Initially, PBS was used as a control because of its role in LDL dialysis. However, our previous findings indicated no significant difference between cells exposed to PBS and only DMEM supplemented with FBS (10% v/v) (data not shown). All experiments were repeated at least three times. To minimize inter-individual variations in LDL properties, plasma for isolation was obtained from a controlled group of three healthy donors. Discontinuous density-gradient ultracentrifugation in KBr solutions containing 30 mmol/L EDTA was employed for LDL isolation, following the method described by de Bem et al. [41]. Moreover, replicates were performed with the LDL from the same individual, and the same LDL was used in different techniques to minimize the variations between individuals LDL. The concentration of LDL was determined from the total protein concentration, and protein content was quantified by the method described by Lowry et al. [42], using bovine serum albumin as standard. Ethical Committee project approved under number 4557728.

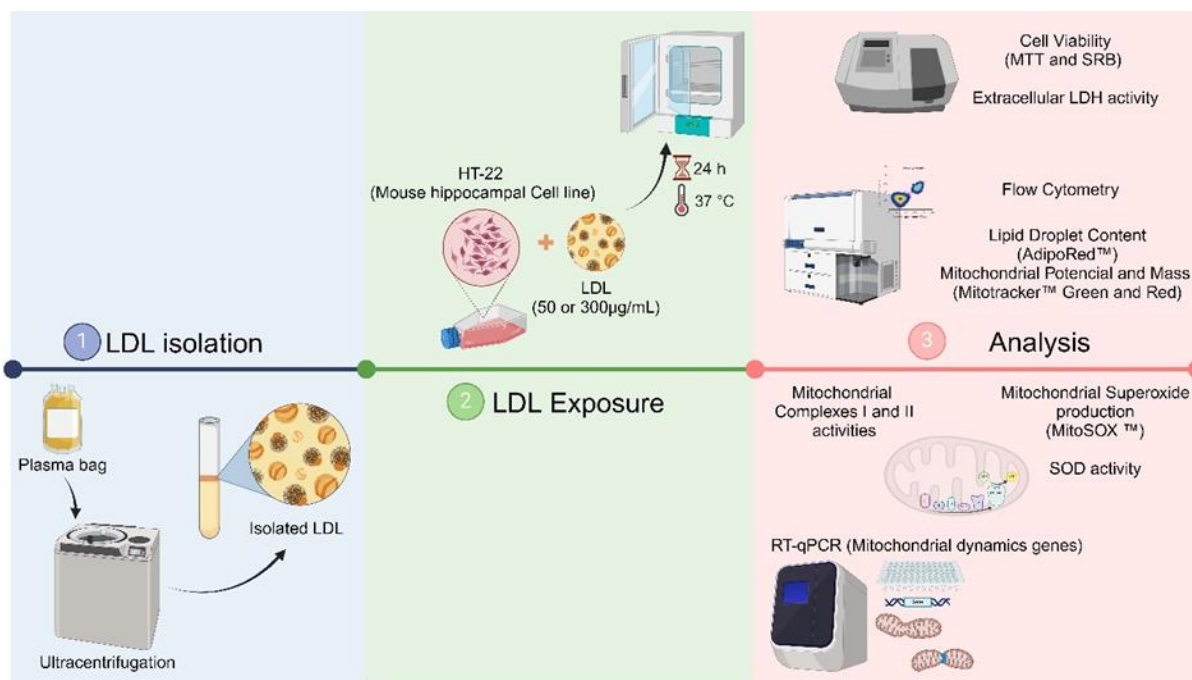


Fig. 1 Experimental Design. Low-Density Lipoprotein (LDL) was isolated from normolipidemic human serum by discontinuous density-gradient ultracentrifugation (1). Next, HT-22 cells were exposed to LDL in the concentration of 50 and 300 µg/mL for 24 hours (2). Finally, cell viability, lipid droplets content, cell death, mitochondrial parameters of function, and dynamics, and oxidative stress were measured (3).

2.2 AdipoRed™ assay

Intracellular lipid droplets were quantified using the AdipoRed™ Assay Reagent (Lonza, PT-7009) according to the manufacturer's protocol. Briefly, after LDL exposure, the cells were prewashed with PBS once and incubated with the AdipoRed™ Reagent for 15 min (1:40). Data acquisition and analysis were performed in FACSCalibur™ flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Data were analyzed using FlowJo XV version 10 (FlowJo LLC).

2.3 Cell viability assay

The cell viability was assessed by the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. After LDL exposure, MTT (Sigma-Aldrich, M2128) solution (5 mg/mL dissolved in PBS sterile) was added to the medium, reaching a final concentration of 0.5 mg/mL. The cells were incubated for three hours at 37°C, and the formazan formed by the reduction of MTT was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Results are expressed as the percentage of control cells. All experiments were performed in technical triplicate. This protocol was adapted from Farias et al [43].

2.4 Cell Density

To assess cell density and determine the effects of LDL exposure on cell survival, we utilized the sulforhodamine B (SRB) assay. After the LDL exposure, HT-22 cells were stained with 0.4% sulforhodamine B (Sigma-Aldrich, S1402) in acetic acid 1% for one hour at room temperature. Excess unbound SRB was removed by washing the cells five times with distilled water. The stained cells were then dissolved in 1% SDS, and the absorbance was measured at 560 nm using the SpectraMax® M5 (Molecular Devices). Results were expressed as a percentage of control.

2.5 Lactate dehydrogenase (LDH) activity

LDH release was performed to test the loss of plasma membrane integrity. After LDL exposure, the culture medium was collected, centrifuged, and analyzed. The LDH activity was performed using the LDH diagnostic kit according to the manufacturer's instructions (BioTecnica, Varginha, Brazil).

2.6 AnnexinV positive-cells

The FITC Annexin V (QuatroG, 100034) was performed for cell death analysis following the manufacturer's instructions. Samples were incubated in a binding buffer containing Annexin-V FITC for 15 minutes in the dark at room temperature. Data acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur™ flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Data were analyzed using Data were analyzed using FlowJo XV version 10 (FlowJo LLC).

2.7 Mitochondrial Complexes activities

Mitochondrial complex I (NADH dehydrogenase) activity was measured by the NADH-dependent ferric reduction rate at 420 nm, as described by Cassina and Radi [44]. The activity was calculated in nanomoles per minute per milligram of protein. The complex II activity was measured according to Fischer et al [45] by the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP). The results were expressed as nanomoles per minute per milligram of protein.

2.8 Mitotracker™ Red and Green

Mitochondrial mass and membrane potential were evaluated by Mitotracker™ Green (MTG - Invitrogen™, M7514) and Red (MTR-Invitrogen™, M7512) dye, respectively. Therefore, it was possible to establish a relationship between MTR and MTG fluorescence to estimate the rate of mitochondrial function [46].

After LDL exposure, HT-22 cells were harvested using trypsin. Then, cells were resuspended and incubated for 20 minutes in the dark with 100 nM of MTG and 100 nM of MTR diluted into pre-warmed (37 °C) Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). The samples were analyzed using a FACSCalibur™ flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) and data were analyzed using FlowJo XV version 10 (FlowJo LLC).

2.9 MitoSOX™

For quantitation of mitochondrial superoxide generation, cells were loaded with MitoSOX™ Red (Invitrogen™, #M36008). After LDL exposure, the cells were prewashed with PBS once loaded with MitoSOX™ Red (500nM) in HBSS for 30 min. Cells were then washed. Fluorescence intensity was then measured at 510/580 nm in SpectraMax® M5 (Molecular Devices)[47].

2.10 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined using the RANSOD kit (Randox, SD125). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) to form a formazan dye that is assayed by spectrophotometric analysis at 505 nm at 37 °C in lysed cells. SOD activity is expressed as U/mg of protein. One unit of SOD causes a 50 % inhibition of the rate of reduction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride under the conditions of the assay.

2.11 Gene expression analysis (RT-qPCR)

RNA extraction was performed using TRIzol® Reagent (ThermoFisher Scientific, USA) and 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, M3148) following the manufacturer's protocol and Santos et al. [48]. RNA concentration and purity were quantified using the I-Quant equipment (Loccus, BR), with purity verified through the ratio of absorbances at 260nm and 280nm (A260/A280). The cDNA synthesis reaction was then performed using 2 µg of RNA for each sample with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription® kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Gene-specific primers were designed using IDT Design software (Integrated DNA Technologies Inc., USA), ensuring no secondary structures were generated. Primer efficiency was evaluated to confirm the absence of nonspecific amplifications. Subsequently, gene expression analysis for proteins involved in mitochondrial dynamics: Mitofusin 1 (MFN1), mitofusin 2 (MFN2), optic atrophy protein 1 (OPA1), and dynamin-related protein

1 (DRP-1) and β -actin housekeeping gene was conducted using the sequences shown in Table 1. RT-qPCR reactions were performed in triplicate using the PowerUp™ SYBR® Green Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, USA), following the manufacturer's instructions. The results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Table 1. Sequence of primers used for RT-qPCR

Gene	Primer sequences
MFN1	Forward: 5' GGT GGA AAT ACA GGG CTA CAG 3'
	Reverse: 5' ACA CTC AGG AAG CAG TTG G 3'
MFN2	Forward: 5' ATG TCC CTG CTC TTT TCT CG 3'
	Reverse: 5' TCC AGT TCT GTG TTC CTG TG 3'
OPA1	Forward: 5' ACG ACA AAG GCA TCC ACC 3'
	Reverse: 5' GAG CAA TCA TTT CCA GCA CAC 3'
DRP1	Forward: 5' TCA ATA AGC TGC AGG ACG TC 3'
	Reverse: 5' TTC TGG TGA AAC CTG GAC TAG 3'
β -actin	Forward: 5' TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG 3'

Reverse: 5' TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT 3'

2.12 Statistical analyses

All experiments were performed on at least three occasions. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA with Dunnett post hoc tests was used for data analysis, and a significant difference was defined as $p < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 LDL exposure leads to an increase in intracellular lipid droplet content in the hippocampal neuron cell line.

First, we evaluated the intracellular lipid droplet content after 24 hours of LDL exposure. We observed an increase in the intracellular lipid droplet content at the higher concentration of LDL (Fig. 2a and 2b), confirming that LDL is taken up by HT-22 cells.

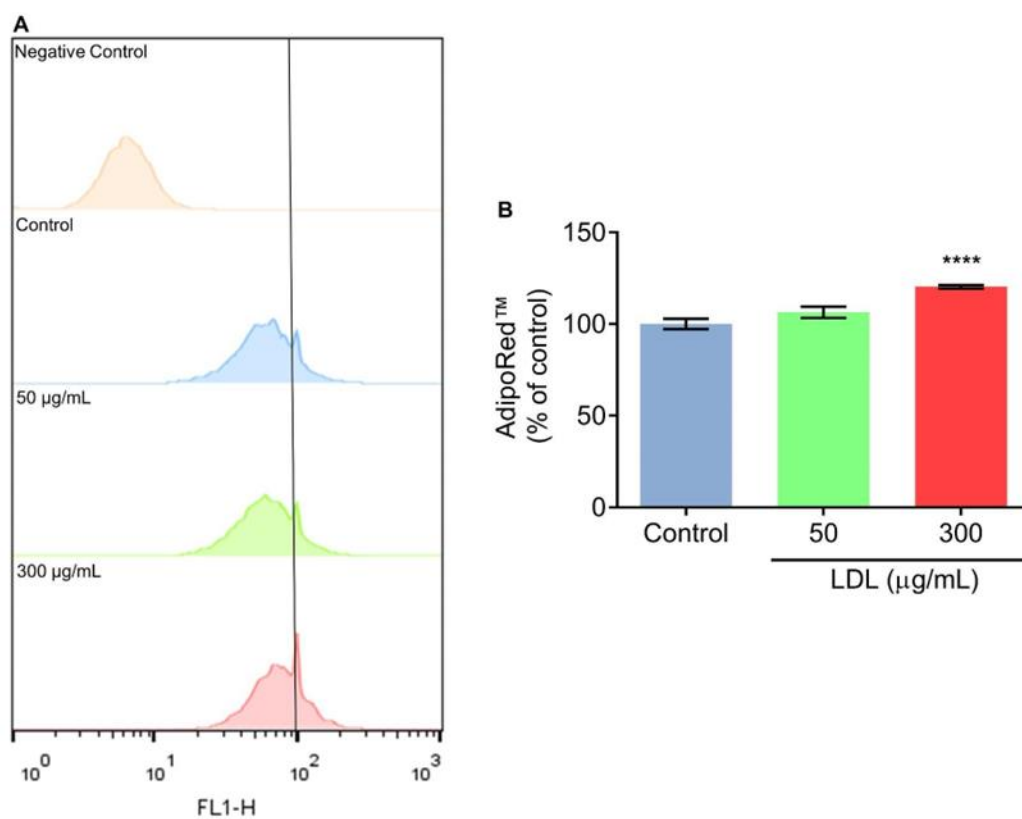


Fig. 2 LDL exposure increases lipid droplets in HT-22 cells. (a) Representative histogram of lipid droplets assessed by AdipoRed™. (b) Lipid Droplets. Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using a One-way ANOVA/Dunnett post hoc test. **** p <0.0001 compared to control group.

3.2 LDL exposure induces an increase in AnnexinV-positive cells in the hippocampal neuron cell line

Exposure to LDL did not affect the viability of hippocampal neuronal cell line, as assessed by the MTT (Fig. 3a) and SRB assays (Fig. 3b). However, when we measured the cellular death by Annexin, we observed that LDL exposure (50 and 300 μ g/mL) leads to a significant increase of AnnexinV-positive cells in HT-22 cells (Fig. 3 d and e), suggesting that LDL induces apoptosis. Moreover, HT-22 cells exposed to LDL have no alteration in extracellular LDH activity, an indicative of necrosis (Fig. 3c).

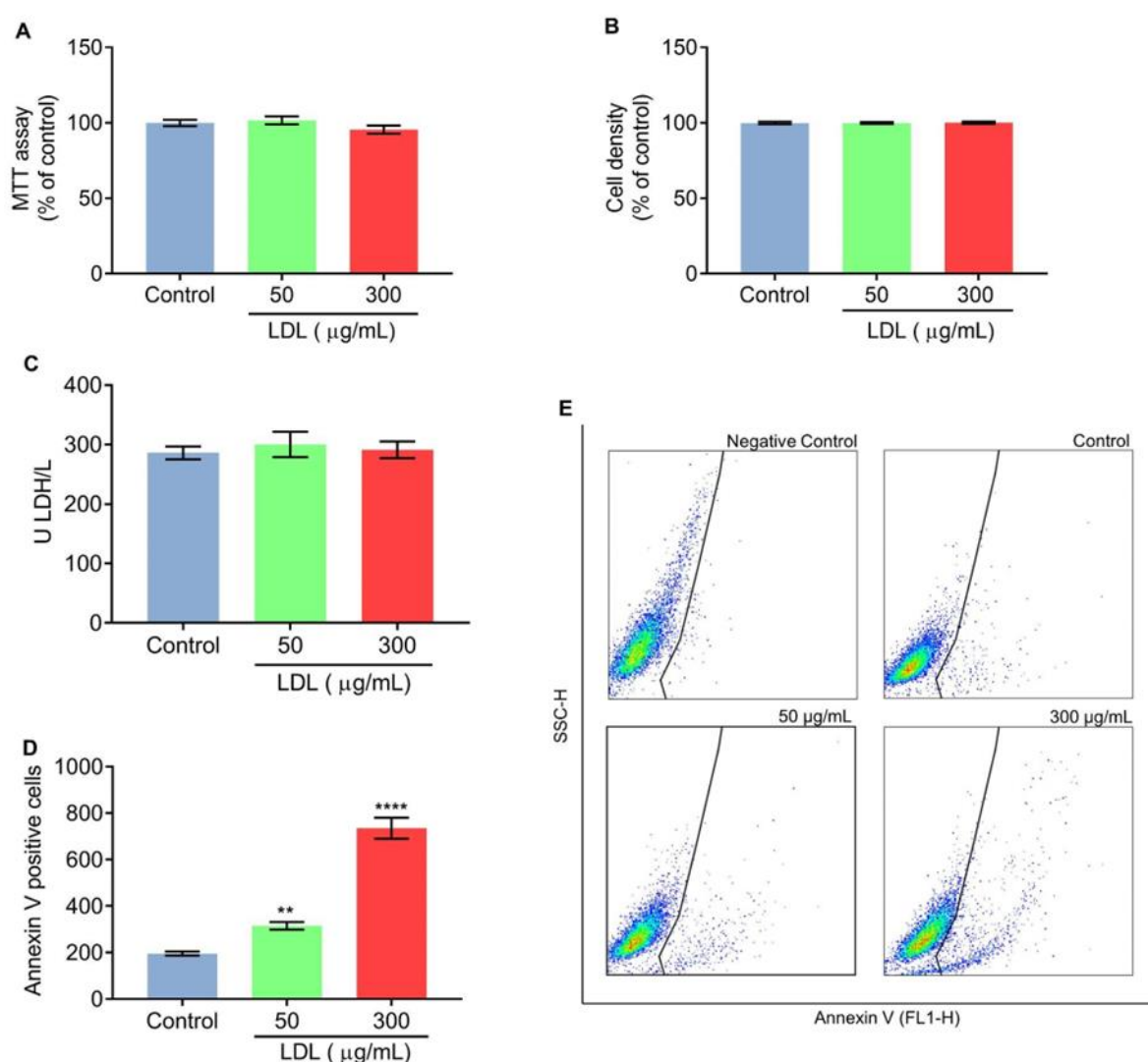


Fig. 3 LDL induces an increase in AnnexinV-positive cells in HT-22 cells. (a) The Cell viability was measured using an MTT assay. (b) SRB assay was used to measure cell density. (c) Extracellular LDH activity. (d) and (e) AnnexinV-positive cells, (d) graphic analysis, (e) Dot plot. Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using a One-way ANOVA/Dunnett post hoc test. ** p <0.01, **** p <0.0001 compared to control group.

3.3 LDL exposure leads to a reduction in mitochondrial complexes activities and alteration in mitochondrial membrane potential in HT-22 cells

The effect of LDL on the mitochondria of the hippocampal neuron cell line (HT-22) was evaluated. We observed that exposure to LDL leads to a decrease in mitochondrial complexes I (Fig. 4a) and II (Fig. 4b) activities in both concentrations (50 and 300 $\mu\text{g/mL}$). Afterward, the measurement of mitochondrial mass (MTG) and potential (MTR) was made using flow cytometry. We observed that LDL induces a significant reduction in MTR fluorescence in the concentration of 300 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4d) without altering the mitochondrial mass (Fig. 4e). We also observed that the exposure to LDL at 300 $\mu\text{g/mL}$ decreases significantly the MTR/MTG ratio (Fig. 4f). Figure 4c shows a fluorescence shift to the left and down upon exposure to 300 $\mu\text{g/mL}$ of LDL in HT-22 cells, indicating mitochondrial damage induced by LDL.

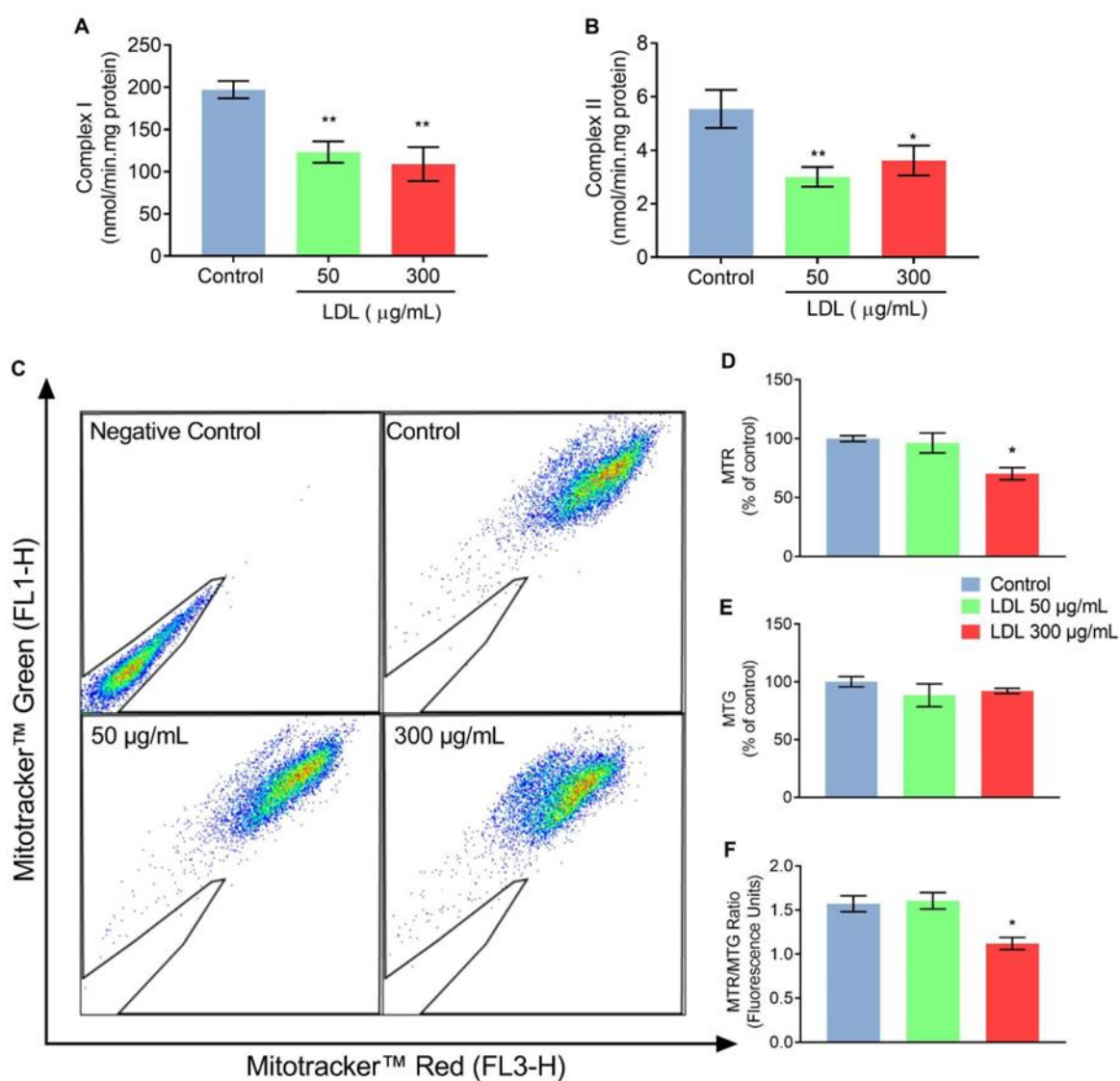


Fig. 4 LDL induces mitochondrial dysfunction in the hippocampal neuron cell line. (a) Mitochondrial complex I activity. (b) Mitochondrial complex II activity. (c) Dot plot of Mitotracker™ Red and Green. (d) Graphic representation of Mitotracker™ red fluorescence (% of control). (e) Graphic representation of Mitotracker™ green fluorescence (% of control). (f) Mitotracker™ Red and Mitotracker™ green ratio. Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA/Dunnett post hoc test. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ compared to control group. Legend: MTR - Mitotracker™ Red; MTG - Mitotracker™ Green

3.4 LDL exposure induces an increase in the mitochondrial superoxide production and reduces superoxide dismutase activity in HT-22 cells

It has been established that mitochondrial dysfunction increases reactive species production [49]. Then, we evaluated the effect of LDL on mitochondrial superoxide production and Superoxide Dismutase activity. Our results demonstrated that the lower concentration (50 $\mu\text{g/mL}$) of LDL induces a significant increase in mitochondrial superoxide production (Fig. 5a), as well as a significant decrease in Superoxide dismutase activity (Fig. 5b). These results indicated that LDL induces an oxidative environment in HT 22 cells.

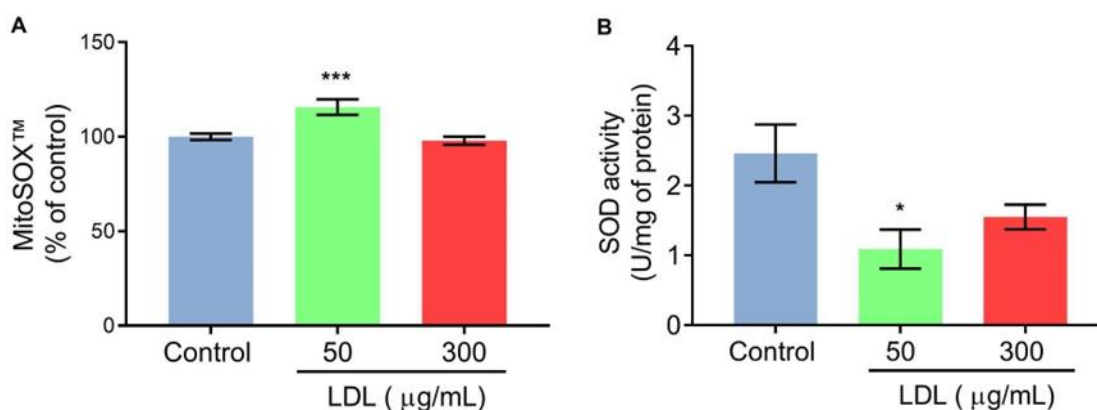


Fig. 5 LDL exposure induces an oxidative environment in the hippocampal neuron cell line. (a) Mitochondrial superoxide production assessed by MitoSOX™. (b) Superoxide Dismutase (SOD) activity. Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA/Dunnett post hoc test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to control group.

3.5 LDL exposure induces an increase in the expression of genes associated with mitochondrial fusion in HT-22 cells

We evaluated the effect of exposure to LDL on gene expression of proteins associated with mitochondrial dynamics. We observed that at the lower concentration of LDL (50 $\mu\text{g/mL}$), there was a significant increase in the gene expression of OPA1 (Fig. 6b), a protein associated with inner mitochondrial membrane fusion, and MFN2 (Fig. 6d), a protein associated with outer mitochondrial membrane fusion [50]. The LDL exposure did not significantly change the DRP1 (Fig. 6a) and MFN1 (Fig. 6c) expression.

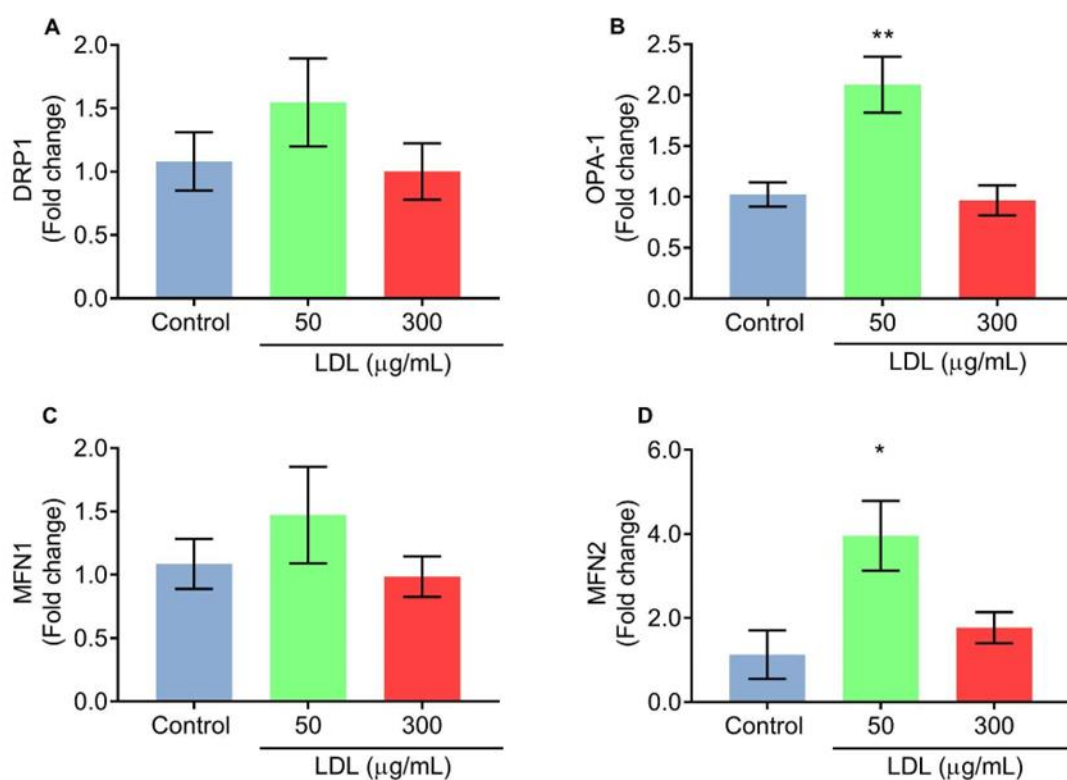


Fig. 6 LDL exposure increases the expression of genes associated with mitochondrial fusion in the hippocampal neuron cell line. (a) DRP1 expression, (b) OPA-1 expression. (c) MFN1 expression. (d) MFN2 expression. Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA/Dunnett post hoc test. * p <0.05, ** p <0.01 compared to control group.

4 DISCUSSION

Hypercholesterolemia has been experimentally linked with BBB breakdown and cognitive impairment [13, 22, 23]. Importantly, the BBB dysfunction allows the leakage to the brain parenchyma of peripheral system compounds, including LDL-cholesterol [28]. Moreover, the hippocampus, a brain area critical for memory, is particularly vulnerable to damage induced by hypercholesterolemia [13, 17, 24, 51]. However, the exact mechanism by which high LDL cholesterol levels lead to neuronal damage and subsequent dementia remains unclear. We hypothesize that neurons exposed to LDL will have impaired mitochondrial homeostasis, which may lead to the activation of cell death mechanisms.

Using a Hydrophilic Stain Nile Red (AdipoRed™), we verified that in the higher concentration of LDL, the intracellular lipid droplet was increased in HT-22 cells. Previous study demonstrated that LDL exposure increases in lipid droplets in hippocampal neural precursor cells [52]. In health conditions, neurons do not present high lipid droplet contents since they have a lower capacity to use lipids for energy production [53]. However, lipid droplets are increased in neurons in several neurodegenerative diseases [54–57], associated with cognitive impairment [58].

Next, the cellular viability assay showed that LDL does not alter the cell viability of HT-22 cells assessed by the MTT assay. Similarly, it was previously demonstrated that LDL does not alter this parameter in HT-22 cells (100 µg/ml) using the CCK-8 assay [59], nor in hippocampal neural precursor cells (25 to 200µg/ml), performed by the resazurin assay [52]. Similar experiments using the MTT assay on SHSY-5Y cells (neuroblastoma cells) and embryonic cortical neurons were performed by Dias et al [60] and Sugawa et al. [61], respectively. Dias et al [60] demonstrated that LDL does not alter the MTT assay in different concentrations (0.8, 1.6, 4.0, 8.0 µg/ml) and times of exposure (2 and 16h). The concentrations tested by Dias et al. [60] were significantly lower than those used in this work. However, Sugawa et al. [61] demonstrated that, after 24 hours, 100 µg/ml of LDL did not alter MTT assay results in embryonic cortical neurons.

We also observed that LDL causes no alteration in the necrosis parameter in HT-22 cells, assessed by extracellular LDH activity. While LDL does not alter cellular viability or necrosis levels, we observed an increase in Annexin V staining, suggesting apoptosis of HT-22 cells in both concentrations. Annexin V is a dye-labeled phosphatidylserine (PS)-binding protein [62]. PS is localized exclusively on the inner leaflet of the cell membrane [63, 64]. After induction of apoptosis, PS is flipped to the outer membrane and acts as an “eat me” signal to recruited phagocytes [65–67]. This increase in Annexin V fluorescence can indicate that LDL is leading to apoptosis. However, it is important to mention that Annexin V staining alone is insufficient to confirm cell death since the plasmatic membrane can be intact. A previous study using primary cortical neurons of rats observed TUNEL-positive staining after exposure to 100 µg/mL LDL, suggesting apoptosis [61]. In contrast, Engel et al [52] did not find evidence of pyknotic nucleus presence, another indicator of apoptosis, in hippocampal neural precursor cells treated with different concentrations of LDL (25 to 200 µg/mL). These findings suggest that LDL can induce neurotoxicity and possible apoptosis in some neuron cells, but further studies are needed to confirm this hypothesis.

Neurons require properly functioning mitochondria to maintain their activity, as they have high ATP demands [68]. Mitochondria have several metabolic functions, mainly combining electron transport along the electron transport chain with oxygen consumption and generation of ATP [69]. These organelles are also strictly involved with apoptosis [70, 71]. Our previous work using hypercholesterolemic animals showed a negative correlation between cholesterol levels and complex I and II activities in the cerebral cortex [14]. Moreover, Paul and Borah [13] demonstrated a reduction in complex I and II activities in different brain areas, including the hippocampus, in an experimental model of hypercholesterolemia. Consistent with these findings, our current data

demonstrate that LDL exposure in HT-22 cells caused a decrease in both complex I and II activities, suggesting that LDL impairs the activity of these respiratory chain complexes.

To better understand the effect of LDL on mitochondria, we assessed the mass and mitochondrial potential with Mitotracker™ Green and Red, respectively, using flow cytometry. MTR gets across the cellular membrane and accumulates in active mitochondria, depending on their oxidative activity. In addition, MTG labels mitochondria independently of the membrane potential, providing a readout related solely to mitochondrial mass. Therefore, by performing the ratio between MTR and MTG, it is possible to establish the rate of mitochondrial function [72, 73]. Our data suggests that exposure to a higher concentration of LDL (300 μ g/mL) in HT-22 cells was associated with a reduction in MTR fluorescence. Nonetheless, LDL at 300 μ g/mL reduced the MTR/MTG ratio in the neurons, suggesting a possible mitochondrial alteration. The MTR/MTG ratio reduction can suggest mitochondrial dysfunction, which, together with a decrease in mitochondrial membrane potential, may be correlated with neuronal death [74–76].

It has been known that impairment of mitochondria caused by decreases in the mitochondrial complex is responsible for producing reactive species, such as superoxide anions [77–80]. Here, we found that LDL (50 μ g/ml) exposure increases mitochondrial superoxide anion production in HT-22 cells. Moreover, a previous study demonstrated in other brain cells, such as astrocytes and microglia cultures, that LDL causes a significant increase in reactive species generation [81], as well as in human neuroblastoma cells (SHSY-5Y) [30]. It is important to mention that we observed that LDL induces a decrease in complex I and II activity in both concentrations tested, however, there was an increase in mitochondrial superoxide production only in the cells exposed to 50 μ g/mL of LDL. It can be explained by some antioxidant modulation, mainly for Superoxide Dismutase (SOD) activity. We observed that at 50 μ g/mL, LDL leads to a decrease in SOD activity, suggesting that superoxide production is increased at this exposure concentration. It was in agreement with previous studies that have demonstrated that hypercholesterolemia leads to a decrease in SOD activity in the hippocampus of rodents [82–84].

Hypercholesterolemia has been associated with oxidative stress in both peripheral and central nervous systems [14, 15, 17, 85]. An oxidative environment, characterized by high levels of ROS, is associated with changes in mitochondrial dynamics [86], including an increase in mitochondrial fusion [87]. Our results demonstrated that the lower concentration of LDL leads to an increase in the expression of OPA-1 and Mfn2 genes, both associated with mitochondrial fusion [50]. Mitochondrial fusion occurs when mitochondria merge their outer and inner mitochondrial membranes, resulting in mitochondrial elongation. Fusion facilitates the distribution and

mixing of mtDNA, metabolites, proteins, and lipids, acting as a protective mechanism against partially dysfunctional mitochondria by diluting damaged components [88].

In summary, the lower concentration of LDL triggered an increase in mitochondrial superoxide production and a decrease in antioxidant defense. This increase in reactive species appears to induce a modulation in mitochondrial fusion as evidenced by the increased expression of genes associated with fusion at this LDL concentration. Interestingly, the lower LDL concentration did not alter the MTR/MTG ratio. This might be explained by the modulation of mitochondria fusion, potentially preserving the mitochondrial membrane potential [89]. Our findings suggest a link between hypercholesterolemia and cognitive impairment, possibly mediated by LDL-induced mitochondrial dysfunction. Notably, we demonstrate that oxidized LDL and the non-oxidized form of lipoprotein, can cause neuronal damage.

Nevertheless, further investigation is essential to definitively determine the impact of LDL on neuronal death pathways, as well as mitochondrial images, to confirm mitochondrial fusion. Furthermore, the potential influence of LDL on microglia and astrocytes, and the subsequent effects of mediators released by these glial cells on neurons, cannot be disregarded and warrant further exploration.

Statements and Declarations

Fundings

This study was supported by the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [CNPq/MCTI/FNDCT No 18/2021 - Faixa A - Grupos Emergentes No do Processo: 407006/2021-4], Edital Universal 405128/2021-5/CNPq , Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS [21/2551-0000 740-0 Edital FAPERGS | 10/2020 Auxílio Recem Doutor -ARD], Brazilian National Institute of Science and Technology on Excitotoxicity and neuroprotection (INEN 2014-465671/2014-4), Instituto Nacional Saúde Cerebral (INSC, No 406020/2022-1/ CNPq, Brazil. (INSC 406020/2022-1) and L'Oréal -UNESCO-ABC program Brazil para Mulheres na Ciência.

Competing Interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Author Contributions

H. R. F. Cell Culture, LDL isolation, flow cytometer, biochemical and molecular analyses, writing and reviewing the manuscript. J. M. O. Flow cytometer and biochemical analyses. C. G. Cell Culture, LDL isolation.

L.S. Molecular analyses. O. V. R. Junior. biochemical analyses. D. G. S. biochemical analyses and manuscript review. F. S. F. biochemical analyses. S. S. LDL isolation. L. A. M. M. Flow cytometer analyses. D. O. G. de S. biochemical analyses manuscript review. J. C. F. M. biochemical analyses manuscript review. A. T. de S. W. biochemical analyses manuscript review. F. T. C. R. G. work supervision, manuscript review. J. O. Elaboration of the main hypothesis and experimental protocol, work supervision, manuscript review. The first draft of the manuscript was written by H. R. F. and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available but are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval:

This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of Hospital Nossa Senhora da Conceição - Grupo Hospitalar Conceição (February 24th, 2021; N° 4557728).”

References

1. Martinez-Hervas S, Ascaso JF (2023) Hypercholesterolemia. *Encycl Endocr Dis* 320–326. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65340-0>
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al (2015) Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 131:e29–e39. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000152>
3. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, et al (2001) Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: Longitudinal, population based study. *Br Med J*. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7300.1447>
4. Kivipelto M, Solomon A (2006) Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence. *Acta Neurol Scand* 114:50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00685.x>
5. Zambón D, Quintana M, Mata P, et al (2010) Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. *Am J Med*. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.08.015>
6. de Bem AF, Krolow R, Farias HR, et al (2021) Animal Models of Metabolic Disorders in the Study of Neurodegenerative Diseases: An Overview. *Front Neurosci* 14:604150. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.604150/BIBTEX>
7. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, et al (2018) Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *Int J Mol Sci* 19:3426. <https://doi.org/10.3390/IJMS19113426>
8. Lewis GF, Rader DJ (2005) New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 96:1221–1232. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000170946.56981.5C>
9. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, et al (2017) Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq. Bras. Cardiol.* 1–76
10. Steinberg D (2009) The LDL modification hypothesis of atherogenesis: An update. *J Lipid Res* 50:. <https://doi.org/10.1194/JLR.R800087-JLR200>
11. Ullrich C, Pirchl M, Humpel C (2010) Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci* 45:408. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2010.08.001>
12. Moreira ELG, De Oliveira J, Engel DF, et al (2014) Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: Up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? *J Neural Transm*. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-1107-9>
13. Paul R, Borah A (2017) Global loss of acetylcholinesterase activity with mitochondrial complexes inhibition and inflammation in brain of hypercholesterolemic mice. *Sci Reports* 2017 7:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17911-z>
14. de Oliveira J, Hort MA, Moreira ELG, et al (2011) Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Neuroscience* 197:99–106. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.09.009>
15. De Oliveira J, Moreira ELG, Mancini G, et al (2013) Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. *Neurochem Res*. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1110-4>
16. Paul R, Choudhury A, Chandra Boruah D, et al (2017) Hypercholesterolemia causes psychomotor abnormalities in mice and alterations in cortico-striatal biogenic amine neurotransmitters: Relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Int* 108:15–26. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2017.01.021>
17. Prasanthi JRP, Dasari B, Marwarha G, et al (2010) Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radic Biol Med* 49:1212–1220. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.07.007>
18. Paul R, Choudhury A, Kumar S, et al (2017) Cholesterol contributes to dopamine-neuronal loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of mitochondrial dysfunctions and oxidative stress. *PLoS One* 12:. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0171285>
19. Björkhem I, Meaney S, Fogelman AM (2004) Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*
20. Dietschy JM, Turley SD (2004) Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.*
21. Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW (2009) Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 109:125–134. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2009.05917.X>
22. de Oliveira J, Engel DF, de Paula GC, et al (2020) High Cholesterol Diet Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption in LDLr^{-/-} Mice: Impact on Cognitive Function. *J Alzheimer's Dis* 78:97–115. <https://doi.org/10.3233/JAD-200541>

23. Chen X, Ghribi O, Geiger JD (2010) Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. In: *Journal of Alzheimer's Disease*
24. Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, et al (2008) High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05415.x>
25. Chen YL, Wang LM, Chen Y, et al (2016) Changes in astrocyte functional markers and β -amyloid metabolism-related proteins in the early stages of hypercholesterolemia. *Neuroscience* 316:178–191. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.12.039>
26. Löffler T, Flunkert S, Havas D, et al (2013) Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice. *Neurobiol Aging* 34:2379–2388. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2013.04.008>
27. Chen X, Wagener JF, Morgan DH, et al (2010) Endolysosome Mechanisms Associated with Alzheimer's Disease-like Pathology in Rabbits Ingesting Cholesterol-Enriched Diet. *J Alzheimer's Dis* 22:1289–1303. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101323>
28. Rapp JH, Pan XM, Neumann M, et al (2008) Microemboli composed of cholesterol crystals disrupt the blood-brain barrier and reduce cognition. *Stroke* 39:2354–2361. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.496737>
29. Chen X, Wagener JF, Morgan DH, et al (2010) Endolysosome mechanisms associated with Alzheimer's disease-like pathology in rabbits ingesting cholesterol-enriched diet. *J Alzheimers Dis* 22:1289–1303. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101323>
30. Engel DF, de Oliveira J, Lopes JB, et al (2016) Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr^{-/-} mouse experimental model. *Behav Brain Res* 311:31–38. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2016.05.029>
31. Hui L, Chen X, Geiger JD (2012) Endolysosome involvement in LDL cholesterol-induced Alzheimer's disease-like pathology in primary cultured neurons. *Life Sci* 91:1159–1168. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2012.04.039>
32. Chen H, Chan DC (2006) Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 18:453–459. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2006.06.004>
33. Knott AB, Bossy-Wetzel E (2008) Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147:283–292. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1427.030>
34. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9:505–518. <https://doi.org/10.1038/NRN2417>
35. Rangaraju V, Calloway N, Ryan TA (2014) Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell* 156:825–835. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.12.042>
36. Freeman LR, Keller JN (2012) Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*
37. Halliwell B (2011) Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.*
38. Pernas L, Scorrano L (2016) Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol* 78:505–531. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021115-105011/1>
39. Lee H, Yoon Y (2016) Mitochondrial fission and fusion. *Biochem Soc Trans* 44:1725–1735. <https://doi.org/10.1042/BST20160129>
40. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, et al (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1:515–525. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00055-7)
41. Bem AF de, Farina M, Portella R de L, et al (2008) Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 201:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.030>
42. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
43. Farias HR, Gabriel JR, Cecconi ML, et al (2020) The metabolic effect of α -ketoisocaproic acid: in vivo and in vitro studies. *Metab Brain Dis*. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00626-y>
44. Cassina A, Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0178>
45. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, et al (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23–36. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(85\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(85)90135-4)
46. Agnello M, Morici G, Rinaldi AM (2008) A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology* 56:145–149. <https://doi.org/10.1007/S10616-008-9143-2/FIGURES/3>

47. Yan HM, Ramachandran A, Bajt ML, et al (2010) The Oxygen Tension Modulates Acetaminophen-Induced Mitochondrial Oxidant Stress and Cell Injury in Cultured Hepatocytes. *Toxicol Sci* 117:515. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFQ208>
48. Santos L, Behrens L, Barbosa C, et al (2024) Histone 3 Trimethylation Patterns are Associated with Resilience or Stress Susceptibility in a Rat Model of Major Depression Disorder. *Mol Neurobiol* 1–20. <https://doi.org/10.1007/S12035-024-03912-3/METRICS>
49. Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs and Aging*
50. Pernas L, Scorrano L (2016) Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol* 78:505–531. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021115-105011/1>
51. de Oliveira J, Engel DF, de Paula GC, et al (2020) LDL Receptor Deficiency Does not Alter Brain Amyloid- β Levels but Causes an Exacerbation of Apoptosis. *J Alzheimer's Dis* 73:585–596. <https://doi.org/10.3233/JAD-190742>
52. Engel DF, Grzyb AN, de Oliveira J, et al (2019) 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. *Mol Metab* 30:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.002>
53. Schönfeld P, Reiser G (2013) Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy-Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:1493–1499. <https://doi.org/10.1038/JCBFM.2013.128>
54. Yang DS, Stavrides P, Saito M, et al (2014) Defective macroautophagic turnover of brain lipids in the TgCRND8Alzheimer mouse model: prevention by correcting lysosomal proteolytic deficits. *Brain* 137:3300. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWU278>
55. Kim I, DeBartolo D, Ramanan S, et al (2015) Excess Lipid Accumulation in Cortical Neurons in Multiple Sclerosis May Lead to Autophagic Dysfunction and Neurodegeneration (P5.237). *Neurology* 84:. https://doi.org/10.1212/WNL.84.14_SUPPLEMENT.P5.237
56. Farmer BC, Walsh AE, Kluemper JC, Johnson LA (2020) Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci* 14:. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.00742>
57. Colebc NB, Murphy DD, Grider T, et al (2002) Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein α -synuclein. *J Biol Chem* 277:6344–6352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108414200>
58. Li D, Xu N, Hou Y, et al (2022) Abnormal lipid droplets accumulation induced cognitive deficits in obstructive sleep apnea syndrome mice via JNK/SREBP/ACC pathway but not through PDP1/PDC pathway. *Mol Med* 28:1–19. <https://doi.org/10.1186/S10020-021-00427-8/FIGURES/10>
59. Gu H-F, Li H-Z, Xie X-J, et al (2017) Oxidized low-density lipoprotein induced mouse hippocampal HT-22 cell damage via promoting the shift from autophagy to apoptosis. *CNS Neurosci Ther* 23. <https://doi.org/10.1111/cns.12680>
60. Dias IHK, Mistry J, Fell S, et al Oxidized LDL lipids increase β -amyloid production by SH-SY5Y cells through glutathione depletion and lipid raft formation. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.012>
61. Sugawa M, Ikeda S, Kushima Y, et al (1997) Oxidized low density lipoprotein caused CNS neuron cell death. *Brain Res* 761:165–172. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00468-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00468-X)
62. Demchenko AP (2013) Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* 65:157–172. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9481-y>
63. Kiessling V, Wan C, Tamm LK (2009) Domain coupling in asymmetric lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1788:64–71. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2008.09.003>
64. Yamaji-Hasegawa A, Tsujimoto M (2006) Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. *Biol Pharm Bull* 29:1547–1553. <https://doi.org/10.1248/BPB.29.1547>
65. Bevers EM, Williamson PL (2016) Getting to the outer leaflet: Physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol Rev* 96:605–645. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00020.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0021627550010.JPEG>
66. Elliott MR, Ravichandran KS (2010) Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 189:1059–1070. <https://doi.org/10.1083/JCB.201004096>
67. Segawa K, Nagata S (2015) An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol* 25:639–650. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.08.003>
68. Kann O, Kovács R, Kann O (2007) Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:641–657. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00222.2006.-Mitochondria>
69. Sazanov LA (2015) A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. <https://doi.org/10.1038/nrm3997>
70. Akhtar F, Bokhari SRA (2022) Apoptosis. *StatPearls*

71. Nunnari J, Suomalainen A (2012) Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* 148:1145. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.02.035>
72. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol J-F (2011) Cytometric Assessment of Mitochondria Using Fluorescent Probes. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21061>
73. Puleston D (2015) Detection of mitochondrial mass, damage, and reactive oxygen species by flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2015:830–834. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT086298>
74. Connolly NM, Theurey P, Adam-Vizi V, et al (2017) Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 25:542–572. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0020-4>
75. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87:99–163. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00013.2006/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0010724230012.JPEG>
76. Sesso A, Belizário JE, Marques MM, et al (2012) Mitochondrial swelling and incipient outer membrane rupture in preapoptotic and apoptotic cells. *Anat Rec (Hoboken)* 295:1647–1659. <https://doi.org/10.1002/AR.22553>
77. Wani AA, Rangrez AY, Kumar H, et al (2008) Analysis of reactive oxygen species and antioxidant defenses in complex I deficient patients revealed a specific increase in superoxide dismutase activity. *Free Radic Res* 42:415–427. <https://doi.org/10.1080/10715760802068571>
78. Blacker TS, Duchon MR (2016) Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic Biol Med* 100:53–65. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.08.010>
79. Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795. <https://doi.org/10.1038/NATURE05292>
80. Wang L, Duan Q, Wang T, et al (2015) Mitochondrial Respiratory Chain Inhibitors Involved in ROS Production Induced by Acute High Concentrations of Iodide and the Effects of SOD as a Protective Factor. <https://doi.org/10.1155/2015/217670>
81. Keller JN, Hanni KB, Gabbita SP, et al (1999) Oxidized lipoproteins increase reactive oxygen species formation in microglia and astrocyte cell lines. *Brain Res* 830:10–15. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01272-X)
82. Montilla P, Espejo I, Muñoz MC, et al (2006) Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. *Clin Nutr* 25:146–153. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2005.10.004>
83. Afonso MS, De O Silva AM, Carvalho EB, et al (2013) Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Nutr Metab (Lond)* 10:19. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-19>
84. Otunola GA, Oloyede OB, Oladiji AT, Afolayan AJ (2014) Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats
85. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al (2017) Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 377:1119–1131. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>
86. Cid-Castro C, Hernández-Espinosa DR, Morán J (2018) ROS as Regulators of Mitochondrial Dynamics in Neurons. *Cell Mol Neurobiol* 2018 385 38:995–1007. <https://doi.org/10.1007/S10571-018-0584-7>
87. Shutt T, Geoffrion M, Milne R, McBride HM (2012) The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 13:909. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2012.128>
88. Lacombe A, Scorrano L (2024) The interplay between mitochondrial dynamics and autophagy: From a key homeostatic mechanism to a driver of pathology. *Semin Cell Dev Biol* 161–162:1–19. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2024.02.001>
89. Ikeda Y, Shirakabe A, Brady C, et al (2015) Molecular Mechanisms Mediating Mitochondrial Dynamics and Mitophagy and Their Functional Roles in the Cardiovascular System. *J Mol Cell Cardiol* 0:116. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2014.09.019>

4. CAPÍTULO III

Artigo submetido na revista “Journal of Cell Biology”

Microglial dysfunctional state induced by hypercholesterolemia can contribute to neuronal dysfunction

Hémelin R. Farias ^{1*#}; Sâmili W. Silva ^{1*}; Caroline Tainá Griesang¹; Lílian C. Costa-Beber ¹; Arieli C. Sousa ¹; Jéssica M. O. Ramos ¹; Lucas Santos ^{1,2}; Natália B. Nascimento ¹; Gabriela S. Leites ¹; Manuella P. Kaster ³; José Cláudio Fonseca Moreira^{1,2}; Fátima T. C. R. Guma¹; Jade de Oliveira¹

*These authors contributed equally to this work.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

#Corresponding author: Hémelin Resende Farias, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo I, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, BRAZIL, Fone: +55 51 3308 5546 e-mail: hemelinrf@gmail.com

PARTE III

3. CONCLUSÕES

A hipercolesterolemia, além de importante fator cardiovascular, também pode levar a demência (Livingston *et al.*, 2024). Estudos vêm demonstrando que níveis aumentados de colesterol no sangue, em particular o colesterol presente na LDL, levam ao aumento na permeabilidade da BHE (de Oliveira *et al.*, 2020; de Oliveira; Moreira; de Bem, 2024), neuroinflamação, e danos neuronais (de Oliveira *et al.*, 2020). As micróglia parecem ser importantes em orquestrar a disfunção cerebral induzida por alterações no metabolismo do colesterol. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que conectam a hipercolesterolemia à demência ainda não estão totalmente esclarecidos. Os estudos do nosso grupo de pesquisa vêm contribuindo para o entendimento da conexão entre a hipercolesterolemia e os desfechos neuroinflamatórios e de neurodegeneração. De particular interesse para este trabalho, já foi demonstrado que condições como a hipercolesterolemia que levam ao prejuízo da BHE causam o extravasamento de componentes plasmáticos para o SNC, como por exemplo, a LDL (Chen *et al.*, 2010). Dessa forma, esta tese de doutorado investigou os efeitos da LDL e do plasma hipercolesterolêmico nas células cerebrais. Além disso, foram avaliados os efeitos do meio condicionado de micróglia expostas à LDL e ao plasma rico em colesterol em neurônios hipocâmpais.

No Capítulo I, revisamos dados da literatura que demonstram que a hipercolesterolemia induz importantes alterações cardiovasculares e cerebrais. A hipercolesterolemia leva a uma maior geração de ERO e estresse oxidativo, liberação de citocinas pró inflamatórias que levam ao dano endotelial. A disfunção endotelial induz ruptura da BHE, alterando sua permeabilidade. O aumento na permeabilidade da BHE, causado pela hipercolesterolemia, permite o extravasamento de componentes do plasma para o parênquima cerebral e conseqüentemente neuroinflamação, estresse oxidativo, alterações mitocondriais e alterações sinápticas em tecidos cerebrais.

No Capítulo II, sabendo que os neurônios são altamente dependentes do bom funcionamento mitocondrial, nós avaliamos o efeito que a LDL tem sobre as mitocôndrias de uma linhagem de neurônios hipocâmpais, já que o hipocampo é a principal área cerebral associada com a memória (Voss *et al.*, 2017). Foi possível observar que a exposição à LDL nesses neurônios teve um efeito negativo na atividade dos complexos mitocondriais. Ainda, observou-se que a menor

concentração de LDL levou ao aumento da geração de espécies reativas e diminuição da defesa antioxidante, além de modular genes associados com a fusão mitocondrial dos neurônios. Já na maior concentração de LDL, houve um aumento de gotas lipídicas, sendo que normalmente os neurônios não acumulam lipídeos intracelulares (Schönfeld; Reiser, 2021). Juntos, esses resultados indicam que a LDL desencadeia disfunção mitocondrial e esse pode ser um dos mecanismos pelos quais a hipercolesterolemia induz danos cognitivos.

Por fim, no Capítulo III, avaliamos o efeito que a LDL e o soro de animais hipercolesterolêmicos têm sobre as micróglia. As micróglia são consideradas macrófagos do SNC e são essenciais para a manutenção cerebral. No entanto, como demonstrado previamente por nosso grupo, na hipercolesterolemia existe o aumento no número de micróglia em alguns tecidos cerebrais (Rodrigues *et al.*, 2023). Ainda mais importante, demonstramos previamente que a modulação da micróglia, pela minociclina, levou a melhora de parâmetros cognitivos de camundongos hipercolesterolêmicos, demonstrando o papel que a micróglia tem nas alterações cerebrais induzidas pela hipercolesterolemia (Rodrigues *et al.*, 2023).

Nós demonstramos que a exposição à LDL em linhagem celular de micróglia induziu ao aumento de gotas lipídicas, diminuição da autofagia e da expressão gênica de CD68, proteína relacionada com a fagocitose. Vale ressaltar que o acúmulo de gotas lipídicas nas micróglia é associado com o envelhecimento (Marschallinger *et al.*, 2020). Ainda, a exposição à LDL não alterou a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. Em conjunto, esses resultados demonstram que a LDL leva a um estado disfuncional das micróglia.

Sabendo que com alterações na permeabilidade da BHE permitem o extravasamento de componentes plasmáticos para o parênquima cerebral (Chen *et al.*, 2010), avaliamos o efeito que o plasma de camundongos hipercolesterolêmicos tem sobre as micróglia. Observamos que a exposição ao plasma hipercolesterolêmico induziu a diminuição da viabilidade celular, alterações na complexidade celular de micróglia e aumento da formação de gotas lipídicas. Além disso, observamos que os níveis de colesterol presentes no plasma foram positivamente correlacionados com as gotas lipídicas, indicando que o colesterol presente no plasma leva a formação de gotas lipídicas.

Considerando que as micróglia secretam vários mediadores no parênquima cerebral, que podem ter efeitos neuroprotetores (de Dios *et al.*, 2023) ou neurotóxicos

(Li *et al.*, 2024), avaliamos o efeito que o meio condicionado das micróglia tem sobre uma linhagem de neurônios hipocâmpais. Observamos que tanto o meio condicionado de micróglia previamente expostas à LDL, quanto plasma hipercolesterolêmico induzem alterações em parâmetros mitocondriais. Juntos, esses resultados sugerem que a modulação microglial causada por componentes hipercolesterolêmicos (LDL e plasma), levam a liberação de fatores neurotóxicos.

Portanto, com esse trabalho podemos concluir que a LDL leva importantes alterações mitocondriais dos neurônios. Da mesma forma, a LDL e o plasma de camundongos hipercolesterolêmicos levam a alterações microgliais, que podem ser associadas com um estado da micróglia disfuncional. Além disso, nós demonstramos que o meio condicionado das micróglia alterou alguns parâmetros mitocondriais neuronais, sugerindo um efeito neurotóxico causado pelos mediadores microgliais.

4.PERSPECTIVAS

Avaliar em um ambiente de co-cultura de micróglia e neurônios, o impacto que a LDL e o plasma de camundongos hipercolesterolêmicos têm sobre a comunicação célula-célula;

Levando em consideração que a metformina parece levar a melhora do metabolismo energético avaliar o efeito que a mesma tem sobre as alterações mitocondriais induzidas pela LDL em neurônios;

REFERÊNCIAS

- ABUELEZZ, S. A.; HENDAWY, N. HMGB1/RAGE/TLR4 axis and glutamate as novel targets for PCSK9 inhibitor in high fat cholesterol diet induced cognitive impairment and amyloidosis. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119310>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- AFONSO, M. S. *et al.* Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Nutrition & Metabolism**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 19, 2013. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3586571/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25865711/). Acesso em: 10 jan. 2024.
- ANAND, S.; SCHOO, C. Mild Cognitive Impairment. **StatPearls**, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK599514/>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- ARIZA, M. *et al.* Neuropsychological performance of young familial hypercholesterolemia patients. **European Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 34, p. e29–e31, 2016.
- AYTAN, N. *et al.* Oxidative stress related changes in the brain of hypercholesterolemic rabbits. **BioFactors**, [s. l.], v. 33, p. 225–236, 2008. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.5520330308>. Acesso em: 29 jun. 2023.
- BIRD, C. M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience** 2008 9:3, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 182–194, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrn2335>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- BISHT, K. *et al.* Capillary-associated microglia regulate vascular structure and function through PANX1-P2RY12 coupling in mice. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 5289–5289, 2021. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC8421455>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- BJÖRKHEM, I. *et al.* From brain to bile. Evidence that conjugation and omega-hydroxylation are important for elimination of 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) in humans. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 40, p. 37004–37010, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11463788/>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- BJÖRKHEM, I. *et al.* Oxysterols and neurodegenerative diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 171–179, 2009.
- BJÖRKHEM, I.; MEANEY, S.; FOGELMAN, A. M. **Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier**. [S. l.: s. n.], 2004.
- BOLDOGH, I. R.; PON, L. A. Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1763, n. 5–6, p. 450–462, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16624426/>. Acesso em: 11 ago. 2024.
- BOYLES, J. K. *et al.* Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous

system. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 1501–1513, 1985. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3932467/>. Acesso em: 24 jun. 2024.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. **How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis**. [S. l.: s. n.], 1984.

CALKINS, M. J. *et al.* Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. **Human molecular genetics**, [s. l.], v. 20, n. 23, p. 4515–4529, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21873260/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

CALO, L. *et al.* Mitochondrial dynamics: an emerging paradigm in ischemia-reperfusion injury. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 19, n. 39, p. 6848–6857, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23590157/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

CHEN, X. *et al.* Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 5, p. 12, 2008. Disponível em: </pmc/articles/PMC2330033/>. Acesso em: 19 jun. 2024.

CHEN, X. *et al.* Endolysosome mechanisms associated with Alzheimer's disease-like pathology in rabbits ingesting cholesterol-enriched diet. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1289, 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC3095894/>. Acesso em: 18 jun. 2024.

CHEN, Y. *et al.* Pro- and Anti-inflammatory Effects of High Cholesterol Diet on Aged Brain. **Aging and Disease**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 374, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5988593/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 453–459, 2006.

CHEN, X.; GHRIBI, O.; GEIGER, J. D. Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *In*: , 2010. **Journal of Alzheimer's Disease**. [S. l.: s. n.], 2010.

CHURCHWARD, M. A.; TODD, K. G. Statin treatment affects cytokine release and phagocytic activity in primary cultured microglia through two separable mechanisms. **Molecular Brain**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4247600/>. Acesso em: 3 jul. 2024.

COLTON, C. A.; WILCOCK, D. M. Assessing activation states in microglia. **CNS & neurological disorders drug targets**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 174–191, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20205642/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

CRAIG, M.; YARRARAPU, S. N. S.; DIMRI, M. Biochemistry, Cholesterol. **StatPearls**, [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513326/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

CSÁSZÁR, E. *et al.* Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.],

v. 219, n. 3, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35201268/>. Acesso em: 2 jul. 2024.

D'ANDREA, M. R.; COLE, G. M.; ARD, M. D. The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 675–683, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15172747/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

DE BEM, A. F. *et al.* Animal Models of Metabolic Disorders in the Study of Neurodegenerative Diseases: An Overview. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 14, p. 604150, 2021. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 16 abr. 2024.

DE DIOS, C. *et al.* Inflammasome activation under high cholesterol load triggers a protective microglial phenotype while promoting neuronal pyroptosis. **Translational Neurodegeneration**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2023. Disponível em: </pmc/articles/PMC9996936/>. Acesso em: 3 jan. 2024.

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

DE OLIVEIRA, J. *et al.* LDL Receptor Deficiency Does not Alter Brain Amyloid- β Levels but Causes an Exacerbation of Apoptosis. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 585–596, 2020.

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

DE OLIVEIRA, J. *et al.* Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. **Neurochemical Research**, [s. l.], 2013.

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

DE OLIVEIRA, J.; MOREIRA, E. L. G.; DE BEM, A. F. Beyond cardiovascular risk: Implications of Familial hypercholesterolemia on cognition and brain function. **Ageing research reviews**, [s. l.], v. 93, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38056504/>. Acesso em: 8 ago. 2024.

DI CESARE, M. *et al.* The Heart of the World. **Global heart**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38273998/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Thematic review series: Brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 1375–1397, 2004. Disponível em: <http://www.jlr.org/article/S0022227520313006/fulltext>. Acesso em: 24 jun. 2024.

ENGEL, D. F. *et al.* Impaired adult hippocampal neurogenesis in a mouse

model of familial hypercholesterolemia: A role for the LDL receptor and cholesterol metabolism in adult neural precursor cells. **Molecular Metabolism**, [s. l.], v. 30, p. 1, 2019. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6812372/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/312372/). Acesso em: 20 jun. 2024.

ENGEL, D. F. *et al.* Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr^{-/-} mouse experimental model. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 311, p. 31–38, 2016.

FALUDI AA *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], p. 1–76, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/whBsCyzTDzGYJcsBY7YVkJWn/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 21 jun. 2022.

FILOSTO, M. *et al.* The role of mitochondria in neurodegenerative diseases. **Journal of neurology**, [s. l.], v. 258, n. 10, p. 1763–1774, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21604203/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

FRANK, M. *et al.* Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1823, n. 12, p. 2297–2310, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22917578/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

FREZZA, C. *et al.* OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. **Cell**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 177–189, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839885/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature** **2014 505:7483**, [s. l.], v. 505, n. 7483, p. 335–343, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature12985>. Acesso em: 9 ago. 2024.

GHRIBI, O. *et al.* High cholesterol content in neurons increases BACE, β -amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 200, n. 2, p. 460–467, 2006.

GIACOMELLO, M. *et al.* The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** **2020 21:4**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 204–224, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-020-0210-7>. Acesso em: 10 ago. 2024.

GOEDEKE, L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 915–930, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22009455/>. Acesso em: 21 jun. 2022.

GÖKKUS, C.; MOSTAFAZADEH, T. Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. [s. l.], Disponível em: www.elsevier.com/locate/clinchim. Acesso em: 14 nov. 2023.

GORITZ, C.; MAUCH, D. H.; PFRIEGER, F. W. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. **Molecular and cellular neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 190–201, 2005. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15911344/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

GRANHOLM, A. C. *et al.* Effects of a Saturated Fat and High Cholesterol Diet on Memory and Hippocampal Morphology in the Middle-Aged Rat. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 133, 2008. Disponível em: </pmc/articles/PMC2670571/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 53 Suppl 1, n. SUPPL. 1, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14749275/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

GUO, L.; TIAN, J.; DU, H. Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Transmission Failure in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 1071, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5605817/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

HEGELE, R. A. **Plasma lipoproteins: Genetic influences and clinical implications.** [S. l.: s. n.], 2009.

HOBBS, H. H.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Human Mutation**, [s. l.], 1992.

HOLLENBECK, P. J.; SAXTON, W. M. The axonal transport of mitochondria. **Journal of cell science**, [s. l.], v. 118, n. Pt 23, p. 5411–5419, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16306220/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

HUI, L.; CHEN, X.; GEIGER, J. D. Endolysosome involvement in LDL cholesterol-induced Alzheimer's disease-like pathology in primary cultured neurons. **Life Sciences**, [s. l.], v. 91, n. 23–24, p. 1159–1168, 2012.

HÜTTEMANN, M. *et al.* Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 445–456, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10863-008-9169-3>. Acesso em: 10 ago. 2024.

ISLIMYE, E.; GIRARD, V.; GOULD, A. P. Functions of Stress-Induced Lipid Droplets in the Nervous System. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 10, p. 863907, 2022. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 26 jun. 2024.

JEROME, W. G. Lysosomes, cholesterol and atherosclerosis. **Clinical lipidology**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 853, 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC3105626/>. Acesso em: 21 jun. 2022.

KANN, Oliver; KOVÁCS, R.; KANN, O. Mitochondria and neuronal activity. **Am J Physiol Cell Physiol**, [s. l.], v. 292, p. 641–657, 2007. Disponível em: <http://www.ajpcell.org>.

KELLER, J. N. *et al.* Oxidized lipoproteins increase reactive oxygen species formation in microglia and astrocyte cell lines. **Brain Research**, [s. l.], v. 830, n. 1, p. 10–15, 1999.

KIVIPELTO, M. *et al.* Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **BMJ (Clinical research ed.)**, [s. l.], v. 322, n. 7300, p. 1447–1451, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11408299/>. Acesso em: 1 jul. 2024.

KIVIPELTO, M.; SOLOMON, A. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence. **Acta Neurologica Scandinavica**, [s. l.], v. 114, n. s185, p. 50–57, 2006.

LACOMBE, A.; SCORRANO, L. The interplay between mitochondrial dynamics and autophagy: From a key homeostatic mechanism to a driver of pathology. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [s. l.], v. 161–162, p. 1–19, 2024.

LEDREUX, A. *et al.* Detrimental effects of a high fat/high cholesterol diet on memory and hippocampal markers in aged rats. **Behavioural brain research**, [s. l.], v. 312, p. 294–304, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27343935/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

LEE, L. 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**, [s. l.], v. 312, n. 4, p. C500–C516, 2017. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00120.2016>. Acesso em: 1 jul. 2024.

LEE, H.; YOON, Y. Mitochondrial fission and fusion. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 1725–1735, 2016. Disponível em: </biochemsoctrans/article/44/6/1725/65630/Mitochondrial-fission-and-fusion>. Acesso em: 9 jun. 2024.

LEWIS, G. F.; RADER, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circulation research**, [s. l.], v. 96, n. 12, p. 1221–1232, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15976321/>. Acesso em: 21 jun. 2022.

LI, H. *et al.* Quercetin Inhibits Neuronal Pyroptosis and Ferroptosis by Modulating Microglial M1/M2 Polarization in Atherosclerosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 72, n. 21, p. 12156–12170, 2024. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jafc.4c01134>. Acesso em: 3 ago. 2024.

LIVINGSTON, G. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care: 2024 report of the Lancet standing Commission. **The Lancet**, [s. l.], v. 0, n. 0, 2024. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673624012960/fulltext>. Acesso em: 8 ago. 2024.

LÖFFLER, T. *et al.* Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPP^{sl} mice. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 34, n. 10, p. 2379–2388, 2013.

LOSÓ N, O. C. *et al.* Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 659, 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3583668/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

LUND, E. G.; GUILYARDO, J. M.; RUSSELL, D. W. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 13, p. 7238–7243, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10377398/>. Acesso em: 24 jun. 2024.

MANCINI, G. *et al.* A High Fat/Cholesterol Diet Recapitulates Some Alzheimer's Disease-Like Features in Mice: Focus on Hippocampal Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 1619–1633, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34219714/>. Acesso em: 21 jun. 2024.

MARSCHALLINGER, J. *et al.* Lipid droplet accumulating microglia represent a dysfunctional and pro-inflammatory state in the aging brain. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 194, 2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7595134/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34219714/). Acesso em: 28 jul. 2024.

MONTILLA, P. *et al.* Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 25, p. 146–153, 2006. Disponível em: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/clnu>. Acesso em: 15 nov. 2023.

MOREIRA, E. L. G. *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**, [s. l.], 2012.

MOREIRA, E. L. G. *et al.* Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: Up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event?. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], 2014.

MOUTINHO, M.; NUNES, M. J.; RODRIGUES, E. Cholesterol 24-hydroxylase: Brain cholesterol metabolism and beyond. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1861, n. 12 Pt A, p. 1911–1920, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27663182/>. Acesso em: 1 jul. 2024.

MOZAFFARIAN, D. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, [s. l.], v. 131, n. 4, p. e29–e39, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25520374/>. Acesso em: 21 jun. 2022.

MULDER, M. *et al.* LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. **Neuroscience research**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 251–256, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720268/>. Acesso em: 2 jul. 2024.

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

MULLER, F. L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 47, p. 49064–49073, 2004. Disponível em:

<http://www.jbc.org/article/S0021925819322963/fulltext>. Acesso em: 10 ago. 2024.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 417, n. 1, p. 1–13, 2009. Disponível em: </biochemj/article/417/1/1/45114/How-mitochondria-produce-reactive-oxygen-species>. Acesso em: 10 ago. 2024.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry 7th*. **W.H. Freeman and Company**, [s. l.], 2017.

NIEDZIELSKA, E. *et al.* Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology** **2015** **53**:6, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 4094–4125, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-015-9337-5>. Acesso em: 2 jul. 2024.

NIEWEG, K.; SCHALLER, H.; PFRIEGER, F. W. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 125–134, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x>. Acesso em: 21 jun. 2022.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 308, n. 5726, p. 1314–1318, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15831717/>. Acesso em: 2 jul. 2024.

NISHIMURA, Y. *et al.* Oxidative Stress as a Common Key Event in Developmental Neurotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2021, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8315852/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

OTUNOLA, G. A. *et al.* Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats. [s. l.], 2014. Disponível em: <http://www.biolres.com/content/47/1/5>. Acesso em: 15 nov. 2023.

PAOLICELLI, R. C. *et al.* Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. **Neuron**, [s. l.], v. 110, n. 21, p. 3458–3483, 2022. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0896627322009539/fulltext>. Acesso em: 3 jul. 2024.

PAOLICELLI, R. C. *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 333, n. 6048, p. 1456–1458, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778362/>. Acesso em: 2 jul. 2024.

PAUL, R.; BORAH, A. Global loss of acetylcholinesterase activity with mitochondrial complexes inhibition and inflammation in brain of hypercholesterolemic mice. **Scientific Reports** **2017** **7**:1, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17911-z>. Acesso em: 21 jun. 2022.

PFRIEGER, F. W.; UNGERER, N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. **Progress in lipid research**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 357–371, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21741992/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

PITAS, R. E. *et al.* Lipoproteins and their receptors in the central nervous

system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 262, n. 29, p. 14352–14360, 1987.

PRASANTHI, J. R. P. *et al.* Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 1212–1220, 2010.

RAHMAN, S. M. A. *et al.* High cholesterol diet results in increased expression of interleukin-6 and caspase-1 in the brain of apolipoprotein E knockout and wild type mice. [s. l.], Disponível em: www.elsevier.com/locate/jneuroim. Acesso em: 14 nov. 2023.

RAI, S. N. *et al.* Mitochondrial Dysfunction: a Potential Therapeutic Target to Treat Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology** 2020 57:7, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 3075–3088, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-020-01945-y>. Acesso em: 10 ago. 2024.

REEMST, K. *et al.* The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. **Frontiers in Human Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. NOV2016, p. 215574, 2016. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 2 jul. 2024.

RODRIGUES, M. S. *et al.* Microglia contribute to cognitive decline in hypercholesterolemic LDLr – / – mice. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], n. April, p. 1–22, 2023.

RODRIGUES, M. S. *et al.* Nanotechnology as a therapeutic strategy to prevent neuropsychomotor alterations associated with hypercholesterolemia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 201, p. 111608, 2021.

RUSSELL, D. W. Oxysterol biosynthetic enzymes. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1529, n. 1–3, p. 126–135, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11111082/>. Acesso em: 24 jun. 2024.

SAHER, G.; QUINTES, S.; NAVE, K. A. Cholesterol: a novel regulatory role in myelin formation. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 79–93, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21343408/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

SCHAFFER, D. P. *et al.* Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. **Neuron**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 691–705, 2012. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0896627312003340/fulltext>. Acesso em: 10 ago. 2024.

SCHÖNFELD, P.; REISER, G. How the brain fights fatty acids' toxicity. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 148, p. 105050, 2021.

SCOTT, I.; YOULE, R. J. Mitochondrial fission and fusion. **Essays in biochemistry**, [s. l.], v. 47, p. 85–98, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20533902/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

SEBASTIÁN, D.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A. Mitochondrial Dynamics:

Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 201–215, 2017. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1471491417300035/fulltext>. Acesso em: 11 ago. 2024.

SIMONS, K.; IKONEN, E. **How cells handle cholesterol**. [S. l.: s. n.], 2000.

SOLOMON, A. *et al.* Fax +41 61 306 12 34 E-Mail karger@karger.ch Midlife Serum Cholesterol and Increased Risk of Alzheimer's and Vascular Dementia Three Decades Later. **Original Research Article Dement Geriatr Cogn Disord**, [s. l.], v. 28, p. 75–80, 2009. Disponível em: www.karger.com.

SPARKS, D. L. *et al.* Induction of Alzheimer-like β -Amyloid Immunoreactivity in the Brains of Rabbits with Dietary Cholesterol. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 88–94, 1994.

TATE, B. A.; MATHEWS, P. M. Targeting the role of the endosome in the pathophysiology of Alzheimer's disease: a strategy for treatment. **Science of aging knowledge environment : SAGE KE**, [s. l.], v. 2006, n. 10, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16807486/>. Acesso em: 1 jul. 2024.

THIRUMANGALAKUDI, L. *et al.* High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], 2008.

TRUSHINA, E.; NGUYEN, T. K. O.; TRUSHIN, S. Modulation of Mitochondrial Function as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease 2023 10:4**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 675–685, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.14283/jpad.2023.108>. Acesso em: 10 ago. 2024.

TWIG, G.; SHIRIHAI, O. S. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. **Antioxidants & redox signaling**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1939–1951, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21128700/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

ULLRICH, C.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Molecular and Cellular Neurosciences**, [s. l.], v. 45, n. 4–13, p. 408, 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC2977849/>. Acesso em: 18 dez. 2023.

VANCE, J. E.; KARTEN, B.; HAYASHI, H. Lipid dynamics in neurons. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 399–403, 2006. Disponível em: </biochemsoctrans/article/34/3/399/64008/Lipid-dynamics-in-neurons>. Acesso em: 19 jun. 2024.

VANCE, J. E.; VANCE, D. E. **Biochemistry Of Lipids, Lipoproteins And Membranes**. [S. l.: s. n.], 2008.

VOSS, J. L. *et al.* A closer look at the hippocampus and memory. **Trends in cognitive sciences**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 577, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5659202/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

WALTHER, T. C.; CHUNG, J.; FARESE, R. V. Lipid Droplet Biogenesis. **Annual review of cell and developmental biology**, [s. l.], v. 33, p. 491–510, 2017.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28793795/>. Acesso em: 10 ago. 2024.



WESTERMANN, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1817, n. 10, p. 1833–1838, 2012.

ZAMBÓN, D. *et al.* Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **American Journal of Medicine**, [s. l.], 2010.

ZHOU, L. Q. *et al.* Ldl-stimulated microglial activation exacerbates ischemic white matter damage. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 119, p. 416–430, 2024.

7. ANEXOS

ANEXO I: ACEITE PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFRGS)

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 41034
Título: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA METFORMINA NAS ALTERAÇÕES COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR


Vigência: 01/09/2021 à 01/09/2025

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:

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

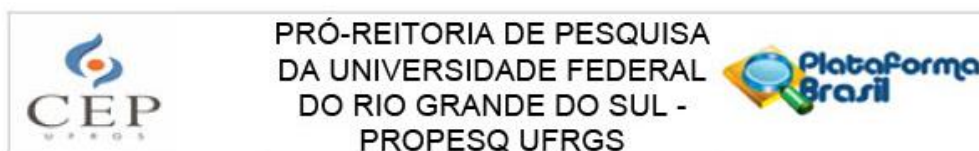
Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 276 camundongos machos adultos (90 dias de idade), 138 da linhagem C57BL/6 selvagens e 138 animais LDLr-/-, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo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

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


ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

1

ANEXO II: ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA EM CÉLULAS DA GLIA

Pesquisador: JADE DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68013323.8.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.974.858

Apresentação do Projeto:

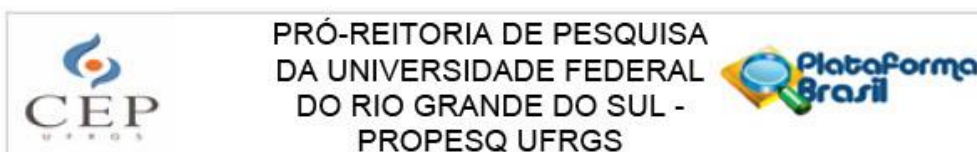
As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento Informações Básicas da Pesquisa n.º 2063497, datado em 16/03/2023, e "Projeto Detalhado", arquivo Projeto_Plataforma_Brasil.pdf.

Trata-se de projeto da Profa Dra Jade de Oliveira, a ser realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Introdução:

O colesterol é um álcool insaturado que participa tanto da composição de membranas celulares, quanto é precursor da síntese de hormônios esteróides, vitamina D e ácidos biliares, sendo essencial para a vida animal. Desequilíbrios no seu metabolismo, como a hipercolesterolemia, estão associados ao risco de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Porém, o mecanismo pelo qual a hipercolesterolemia leva a danos neurológicos ainda não está bem esclarecido. Estudos experimentais apresentaram evidências de que a hipercolesterolemia leva a modificações na barreira hematoencefálica (BHE), o que causa um aumento da permeabilidade da mesma, levando ao extravasamento de componentes do sistema periférico para o sistema nervoso central (SNC),

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3787 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.974.858

inclusive da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Uma característica comum entre as doenças neurodegenerativas é a neuroinflamação, e o grupo de pesquisa proponente já observou que em modelos experimentais de hipercolesterolemia, o processo inflamatório, mediado por células gliais, parece preceder as disfunções cerebrais características das doenças neurodegenerativas. Levando isso em consideração, há a proposta de estudos dos mecanismos de ativação das células gliais, das consequências dessa reatividade e de fármacos que possam exercer efeitos anti-inflamatórios para o manejo das alterações cerebrais induzidas pela hipercolesterolemia.

Hipótese:

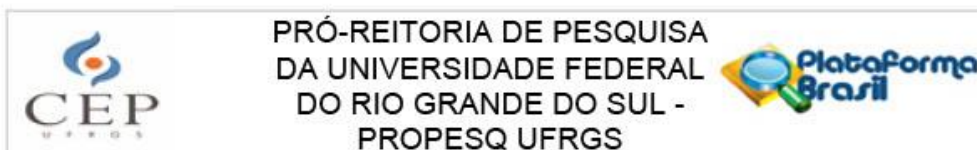
A nossa principal hipótese é que as alterações cerebrais induzidas por hipercolesterolemia estão relacionadas a processos de reatividade microglial e astrocitária, derivada da citotoxicidade direta da LDL sobre essas células via quebra da BHE. Também acreditamos que tais efeitos sobre o SNC ocorrem paralelamente aos observados periféricamente sobre macrófagos sanguíneos. Além disso, acreditamos que a inibição da ativação das micróglia é uma estratégia terapêutica interessante para prevenir e/ou atenuar o impacto da hipercolesterolemia no cérebro, e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Metodologia:

Candidatos à participantes da pesquisa presentes no departamento de Bioquímica da UFRGS serão convidados para participar da pesquisa entre os meses de março de 2023 até dezembro de 2027. Após aceitarem participar e assinar o TCLE, os participantes irão fazer a doação de sangue no Banco de Sangue do Grupo Hospitalar Conceição. Em seguida, o plasma será separado, para ser utilizado na pesquisa, enquanto as demais frações ficarão sob responsabilidade do Banco de Sangue. A bolsa de plasma será transportada até o Departamento de Bioquímica da UFRGS, seguindo as normas necessárias. Ao chegar no departamento, o plasma será utilizado para isolar a fração de LDL. Essa fração de LDL isolada será armazenada sob refrigeração (-20 °C) até sua utilização nas linhagens celulares in vitro.

As linhagens de macrófagos sanguíneos (RAW264.7), microglia (BV2), astrócitos (C6) e neurônios hipocámpais (HT-22) serão expostas a concentrações crescentes de LDL. As alternativas terapêuticas (minociclina, atorvastatina e metformina) serão testadas conforme julgado pertinente, considerando os resultados encontrados ao longo do estudo. A fim de avaliar os efeitos dos mediadores, produzidos pela ativação da micróglia, nos neurônios, células HT-22 serão expostas

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3787 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.974.858

ao meio condicionado das células BV2 previamente incubadas com LDL e/ou minociclina. Todas as linhagens serão expostas a LDL e/ou ao tratamento, por 24 horas ou 48 horas e em seguida serão realizados o teste de viabilidade celular por MTT, ensaio de proliferação celular por Sulforrodamina B, formação de espécies reativas de oxigênio por DCF, ensaios de citometria de fluxo, imunofluorescência e RT-PCR.

Coleta de sangue e obtenção do plasma: A coleta de sangue do participante será realizada no Banco de Sangue do Grupo Hospitalar Conceição, por um profissional treinado e capacitado para essa função. O profissional fará cuidadosa assepsia no braço do participante no local a ser puncionado. Ele colherá cerca de 450 ml do sangue por meio de agulha acoplada a um conjunto de bolsas plásticas, todos estéreis e de uso único.

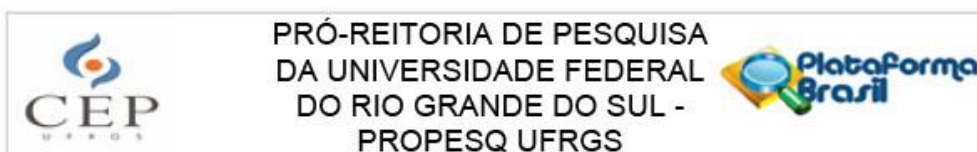
A duração da coleta em geral é de 8 a 12 minutos e o participante será assistido durante todo o procedimento. O procedimento poderá ser realizado em qualquer momento do dia (manhã/tarde), não sendo necessário estar em jejum. Dessa bolsa de sangue será separado o plasma, para utilização na pesquisa, enquanto as demais frações ficarão sob responsabilidade do Banco de Sangue.

Isolamento e oxidação de LDL: A fração de LDL será isolada a partir do plasma humano de candidatos participantes presentes no departamento de Bioquímica da UFRGS. O processo de isolamento da LDL será realizado por meio de ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade, conforme descrito por De Bem et al. (2008). Será adicionado EDTA 1 mg/mL e sacarose 0,5% ao plasma, a fim de evitar a agregação de LDL. O plasma-EDTA será ajustado a densidade de 1,22 g/mL utilizando KBr 0,326 g/mL, e em seguida será acionado NaCl 1,006 g/mL. Na sequência será executada a ultracentrifugação a 191000 x G por 2 horas, a 4 °C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX, rotor 4OST. Ao final desse processo, a camada contendo LDL (porção superior) será coletada e dialisada durante 16 horas a 4 °C em PBS 148 mM (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136 mM, pH 7,4). O teor de proteína da LDL isolada será determinado pelo método de Lowry (1951).

Critério de Inclusão:

Os candidatos a participante que devidamente assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), forem maiores de 18 anos, aptos a doação de sangue, e que sua última doação sanguínea tenha sido a mais de 60 dias (homens) ou 90 dias (mulheres). Os participantes não devem apresentar quadro de hipercolesterolemia, fazer uso de algum tipo de

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3787 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.974.858

hipercolesterolemiantes, como estatinas, ou apresentar idade superior a 69 anos.

Critério de Exclusão:

Não existe um critério de exclusão, uma vez que o participante atenda todos os critérios de inclusão, nada o torna inapto para a doação de sangue, exceto que ele mesmo retire sua autorização para participação da pesquisa e desista de sua participação no projeto.

Tamanho amostral: 30 participantes.

Cronograma:

Na Plataforma Brasil, informa-se etapa de Recrutamento de participantes prevista para ocorrer entre 01/05/2023 e 31/05/2028.

Orçamento:

Informado no valor de R\$ 1.500,00, relativo a Gastos com deslocamento ao Banco de Sangue. Financiamento próprio.

Objetivo da Pesquisa:

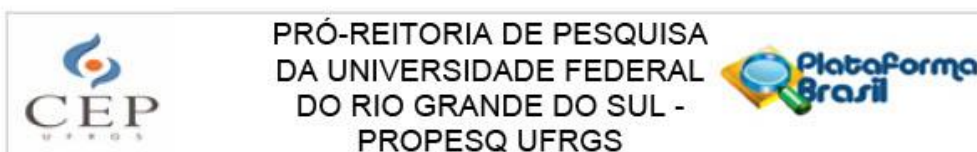
Objetivo Primário:

Investigar se a exposição direta a LDL isolada do plasma de doadores adultos quebra a homeostasia de macrófagos periféricos, microglia e astrócitos, por levar a um fenótipo reativo, pró-oxidante e pró-inflamatório in vitro. Além disso, buscamos avaliar possíveis estratégias farmacológicas de proteção neurológica sobre os efeitos nocivos da LDL nas células microgliais.

Objetivos Secundários:

Avaliar a toxicidade da LDL isolada de plasma de doadores adultos em macrófagos, microglia e astrócitos, sobre parâmetros de viabilidade, densidade, reatividade, proliferação e morte celular;
 Analisar os efeitos da LDL isolada de plasma de doadores adultos sobre parâmetros inflamatórios de macrófagos, microglia e astrócitos;
 Analisar o papel da microglia exposta a LDL isolada de plasma de doadores adultos como mediadora de danos sobre os neurônios, pelo uso de meio condicionado;
 Avaliar alternativas terapêuticas, pela administração de minociclina (eficiente na inibição da reatividade microglial), atorvastatina e metformina.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3787 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.974.858

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos estão descritos da seguinte forma:

"Dentre os riscos desse projeto têm-se o risco de quebra de sigilo dos participantes. Dessa forma, os pesquisadores garantem o sigilo e que farão tudo ao seu alcance para mantê-lo, bem como garantir a não violação e a integridade dos documentos (danos físicos, cópias, rasuras). Além disso, os resultados da pesquisa serão divulgados de forma agrupada, impossibilitando a identificação do participante, e somente a equipe de pesquisa terá acesso ao material e aos dados coletados. O trabalho também pode apresentar riscos de origem física, uma vez que será realizada a coleta de sangue do participante e isso pode gerar algum desconforto local, acresce que há risco de leve dor pós-coleta e risco de formação de hematoma ao redor do local da punção. Assim, os pesquisadores garantem que a coleta será realizada por profissionais habilitados para o procedimento, e tais riscos serão resolvidos com a observação de procedimentos que garantam cuidados e respeito de acordo com a manifestação do participante, como: realização de uma palpação cuidadosa e aplicação adequada da agulha, certificando-se da sua penetração completa na parede da veia. Além disso, ao perceber a formação de hematoma, a agulha e o garrote serão retirados e será aplicada pressão no local por um período mínimo de 3 minutos."

Benefícios:

Os benefícios são apenas indiretos e estão indicados do seguinte modo:

"Os participantes serão beneficiados de forma indireta, assim como a comunidade, com os resultados da pesquisa, pois dentre os objetivos desse projeto tem-se a avaliação dos mecanismos da toxicidade da LDL, a qual está presente em concentrações elevadas em pacientes hipercolesterolêmicos, em astrócitos e microglias, que pode estar relacionado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, e a avaliação do tratamento com minociclina para atenuar/reverter o processo de ativação microglial. Além disso, os resultados da pesquisa serão disponibilizados em plataformas digitais."

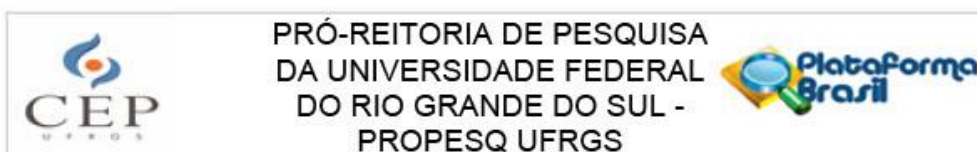
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com mérito, baseada na coleta de material de humanos e testagem posterior in vitro.

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco? Sim

Justificativa: A coleta de sangue constitui um biorrepositório de amostras biológicas.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3787 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.974.858

Hospital Nossa Senhora da Conceição - Grupo Hospitalar Conceição foi informado como centro coparticipante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto presente e com as devidas assinaturas.

Projeto completo apresentado.

Existe justificativa para o tamanho amostral, inferido em $n = 30$ "Como o objetivo do trabalho não é a análise do plasma em si, não será necessário um n significativo. Dessa forma, a demanda será da coleta de 1 bolsa a cada dois meses, durante o período de realização das análises, 5 anos, totalizando 30 bolsas de plasma, ou seja, a participação de 30 pessoas. Cabe destacar que para tanto, pode ser o mesmo participante, desde que respeitado o tempo mínimo entre cada doação, sendo esse de 2 meses para homens e 3 meses para mulheres."

Orçamento presente indicando uso de recursos próprios.

TCLE presente e adequado.

Está presente uma Declaração do profissional que obterá o consentimento, a ser assinada no momento da coleta.

Instituição coparticipante - os seguintes documentos estão presentes e assinados:

- Termo de Anuência de participação do Grupo Hospitalar Conceição (GHC).
- Declaração de infraestrutura assinada por profissional do GHC.
- Declaração da proponente referente a compromisso de envio de relatórios ao CEP GHC.

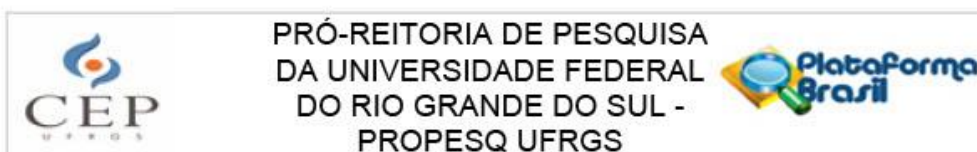
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos nos documentos do estudo.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS n° 510, de 2016, na Resolução CNS n° 466, de 2012, e na Norma Operacional n° 001, de 2013, do CNS, manifesta-se pela aprovação do presente projeto.

Reitera-se aos pesquisadores a necessidade de elaborar e apresentar os relatórios parciais e final da pesquisa, como preconiza a Resolução CNS/MS n° 466/2012, Capítulo XI, Item XI.2: "d.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3787 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 5.974.858

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_2063497.pdf	16/03/2023 22:23:00		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	16/03/2023 21:10:00	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil.pdf	15/03/2023 23:24:36	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração do Patrocinador	Declaraca_infraestrutura.pdf	25/01/2023 16:16:22	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração do Patrocinador	Declaracao_compromisso_relatorios.pdf	20/01/2023 11:06:19	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de concordância	Termo_Anuencia_GHC.pdf	20/01/2023 11:03:54	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/01/2023 10:57:42	JADE DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 30 de Março de 2023

Assinado por:
Patrícia Daniela Melchiors Angst
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3787 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO III: ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR E DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO REVESTIDAS COM RESVERATROL SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E METABOLISMO CEREBRAL

Pesquisador: JADE DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36473020.0.3001.5530

Instituição Proponente: HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEICAO SA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.557.728

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1663939.pdf, de 18/11/2020) e/ou do Projeto Detalhado (Projeto_detalhado_Hemelin_2.pdf, de 13/10/2020).

A hipercolesterolemia, particularmente a hipercolesterolemia familiar, além de conhecido fator de risco cardiovascular, vem sendo associada a alterações cerebrais características de doenças neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer. No entanto, o mecanismo exato pelo qual a hipercolesterolemia leva a danos neurológicos ainda não está bem elucidado. Estudos experimentais apontam que a hipercolesterolemia leva a modificações na barreira hematoencefálica (BHE), estresse oxidativo, bem como disfunção mitocondrial. Outro ponto importante é que existe uma linha de evidências que demonstra que com a hipercolesterolemia, existe um aumento da permeabilidade da BHE, que leva componentes do sistema periférico para o sistema nervoso central (SNC), inclusive da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Levando isso em consideração, o estudo de compostos que possam ser neuroprotetores e atenuem as consequências cerebrais da hipercolesterolemia, torna-se necessário. Nesse sentido, este trabalho tem o objetivo de melhor caracterizar a disfunção mitocondrial e metabólica causada pela hipercolesterolemia familiar, forma genética de hipercolesterolemia, utilizando modelos

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 4.557.728

experimentais in vitro. Além disso, pretendemos avaliar se o tratamento com nanopartículas de ouro (GNPs) revestidas com resveratrol podem prevenir estes danos. Para isto, no estudo in vitro serão utilizadas células da linhagem HT-22 (células hipocámpais de camundongo), tratadas com LDL em diferentes concentrações. Esta LDL será isolada do plasma de humanos. Além disso, também serão avaliados os parâmetros em células com gene do receptor de LDL (LDLr) silenciado. Concomitante ao tratamento com LDL ou com o silenciamento do LDLr, as células serão também tratadas com GNPs revestidas com resveratrol em diferentes concentrações ou GNPs ou resveratrol individualmente. Após os tratamentos, serão avaliados parâmetros mitocondriais através da respirometria de alta resolução em células intactas, viabilidade celular, formação de espécies reativas de oxigênio, e ensaio de citometria de fluxo. Com este projeto pretende-se contribuir para o entendimento do metabolismo e função mitocondrial na hipercolesterolemia familiar.

Hipótese:

A hipótese principal deste trabalho é que a hipercolesterolemia, mais precisamente a hipercolesterolemia familiar, onde se tem altos níveis de colesterol plasmático desde cedo, leva a alterações mitocondriais e metabólicas, principalmente em tecidos cerebrais. Além disso, de que nanopartículas revestidas com resveratrol terão ações terapêuticas para tais danos identificados.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar a função mitocondrial em células HT-22 expostas à LDL ou deficiência do LDLr, bem como avaliar os efeitos neuroprotetores das GNPs revestidas com resveratrol.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar os efeitos da LDL em células HT-22 sob parâmetros mitocondriais e metabólicos e possível efeito neuroprotetor de GNPs revestidas com resveratrol.

Avaliar o efeito neuroprotetor de GNPs revestidas com resveratrol em células HT-22 com o LDLr silenciado, sob parâmetros mitocondriais e metabólicos e possível efeito neuroprotetor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como riscos deste projeto temos os de origem psicológica, uma vez que existe um risco de quebra de sigilo dos voluntários. Assim os pesquisadores garantem o sigilo e que farão de tudo ao seu alcance para mantê-la, bem como garantir a não violação e a integridade dos documentos (danos físicos, cópias, rasuras).

Além do mais este trabalho também pode apresentar risco de origem física, uma vez que será

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 4.557.728

realizada coleta sanguínea dos voluntários e isto pode de alguma forma causar um desconforto local. Para isto, os pesquisadores garantem que a coleta será realizada por profissionais habilitados para o mesmo, além disso, o material biológico obtido, serão utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo e conforme acordado no TCLE (Anexo I) e em nenhum momento esta amostra biológica será utilizada para uma nova pesquisa sem a autorização do participante. Os pesquisadores também garantem que farão o descarte adequado do material biológico, conforme normas da ANVISA.

BENEFÍCIOS

Como benefícios deste trabalho, os voluntários terão proveito indireto, posterior auferido a comunidade uma vez que os objetivos desta pesquisa é avaliar os efeitos da hipercolesterolemia familiar e do tratamento com nanopartículas de ouro revestidas com resveratrol sobre a função mitocondrial e metabolismo cerebral. Além disso, o resultado da pesquisa será disponibilizado através de plataformas digitais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo experimental, no qual os voluntários presentes no departamento de Bioquímica da UFRGS serão convidados para participar da pesquisa entre o mês de janeiro de 2021 até novembro de 2023.

Após assinatura do TCLE, os voluntários irão fazer a coleta de sangue no banco de sangue do Grupo Hospitalar Conceição, em seguida o plasma será separado.

O plasma que será utilizado na pesquisa será transportado até o Departamento de Bioquímica da UFRGS seguindo as normas necessárias.

Imediatamente ao chegar no departamento, o plasma será utilizado para isolar a fração de LDL. Esta fração isolada de LDL, será armazenada em refrigeração (-20°C) até utilização em células HT-22.

Logo, as células da linhagem HT-22 serão tratadas com concentrações de 50, 100 e 300 g/mL de LDL (nativa e oxidada), e concomitante tratadas ou com veículo ou GNPs nas concentrações de 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 g/mL ou GNPs revestidas com resveratrol ou com resveratrol nas mesmas concentrações.

As células serão tratadas por 24 horas em seguida serão avaliados o teste de viabilidade celular por MTT, formação de espécies reativas de oxigênio por DCF, ensaio de citometria de fluxo, respirometria de alta resolução em células intactas. Os mesmos parâmetros também serão avaliados em células HT-22 que terão o gene do LDLr silenciado. Em paralelo a isto, será avaliado

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 4.557.728

o efeito protetor das GNP, resveratrol e GNP revestidas com resveratrol na oxidação do LDL do soro na presença de cobre.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

É importante esclarecer como será a coleta de plasma com fins da pesquisa, uma vez que a doação de sangue é um ato voluntário e altruísta - não contendo em si outro objetivo para além da doação. No documento carta resposta - os pesquisadores trazem a reordenação dos termos e a caracterização de participação em pesquisa dos sujeitos de pesquisa com a coleta de sangue, retirando o termo "doação". O TCLE foi reescrito e a linguagem adequada bem como os termos que vinham em siglas - agora estão por extenso; também trazendo citada a Resolução CNS nº 466 de 2012.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição - CEP/GHC, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1663939.pdf	18/12/2020 10:42:30		Aceito
Outros	Carta_resposta_2.pdf	18/12/2020 10:41:59	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2.pdf	18/12/2020 10:41:35	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Hemelin_3.pdf	18/12/2020 10:41:19	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Curriculo_participantes.pdf	18/11/2020 16:41:58	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_de_referencia_da_pesquisa.pdf	18/11/2020 16:41:20	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_ENTREGA_DE_RELATORIO.pdf	18/11/2020 16:40:22	JADE DE OLIVEIRA	Aceito

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 4.557.728

Outros	RELAcaO_DOS_INTEGRANTES_DO_P ROJETO_DE_PESQUISA.pdf	18/11/2020 16:39:24	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia.pdf	18/11/2020 16:34:42	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Pesquisadores.docx	13/10/2020 23:23:38	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_1.pdf	13/10/2020 23:18:34	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PUCRS.pdf	13/10/2020 22:57:50	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_Hemelin_2.pdf	13/10/2020 22:57:31	JADE DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Fevereiro de 2021

Assinado por:

Daniel Demétrio Faustino da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br