

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MATHEUS SCARPATTO RODRIGUES

**TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PREVINEM AS
ALTERAÇÕES CEREBRAIS CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA DE
PARKINSON ASSOCIADAS À HIPERCOLESTEROLEMIA:
EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS**

CRICIÚMA, SC

2019

MATHEUS SCARPATTO RODRIGUES

**TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PREVINEM AS
ALTERAÇÕES CEREBRAIS CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA DE
PARKINSON ASSOCIADAS À HIPERCOLESTEROLEMIA:
EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

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

Coorientador: Prof^o. Dr^o. Paulo Cesar Lock Silveira.

CRICIÚMA, SC

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R696t Rodrigues, Matheus Scarpatto.

Tratamento com nanopartículas de ouro previnem as alterações cerebrais características da doença de parkinson associadas à hipercolesterolemia : evidências experimentais / Matheus Scarpatto Rodrigues. - 2019.

56 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Jade de Oliveira.

Coorientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico. 2. Nanopartículas de ouro - Efeitos antiinflamatórios. 3. *Hipercolesterolemia*. 4. Parkinson, Doença de. I. Título.

CDD. 22. ed. 615.1

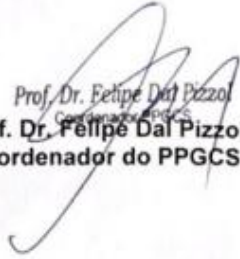
Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

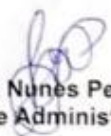


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 323

Com início às 14h (quatorze horas) do dia dez do mês de junho de 2019 (dois mil e dezanove), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Matheus Scarpatto Rodrigues** sob a orientação da **Profa. Dra. Jade de Oliveira**, intitulada "TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PREVINEM AS ALTERAÇÕES CEREBRAIS CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA DE PARKINSON ASSOCIADAS À HIPERCOLESTEROLEMIA". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Profa. Dra. Cristiane Damiani Tomasi (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15 (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 10 (dez) de junho de 2019 (dois mil e dezanove).


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS


Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver modificado e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, no Laboratório de Neurologia Experimental, e no Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma me acompanharam, me auxiliaram, me fizeram crescer durante a realização deste projeto.

A minha família e aos verdadeiros mestres com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder sabedoria, proteção e amparo nas decisões e acertos durante toda a minha trajetória até aqui. À minha família por estar sempre perto e presente quando mais precisei, e por me apoiar em minhas decisões. Graças a eles hoje posso dizer que estou concluindo um mestrado, sendo até então, a primeira pessoa da família a alcançar este nível de formação.

À minha namorada Gabriela por todos os momentos de compreensão, demonstrações de amor e de paciência nos momentos difíceis.

Aos meus colegas e amigos de laboratório pelo apoio de sempre na rotina laboratorial essencial para a realização deste trabalho. Aos colegas do laboratório de Fisiopatologia Experimental, ao meu co-orientador Doutor Paulo Cesar Lock Silveira, pelo apoio e ensinamentos a mim direcionados. Agradeço a minha orientadora, Doutora Jade de Oliveira, pela paciência, compreensão e principalmente pela orientação durante a realização deste trabalho, sem você não teria chegado a estes resultados e ao fim do mestrado. Estendo meus agradecimentos a todos do laboratório de Neurologia Experimental que me acolheram muito bem, aprendi muito com vocês.

A todos os professores que de alguma forma me ajudaram a atingir o conhecimento necessário para chegar até aqui, meus mais sinceros e humildes agradecimentos. Ao curso de biomedicina e à professora Jade por me proporcionar a experiência da prática docente.

A UNESC como instituição por me proporcionar, desde a graduação, oportunidades e conhecimento para crescer pessoalmente e profissionalmente.

A UNESC, a FAPESC e a CAPES / CNPq por financiar e apoiar desde o início a realização deste projeto.

Estendo meus agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para eu chegar até aqui. À todos, meu muito obrigado!

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é consequência.”

Albert Einstein

RESUMO

Ao longo dos anos, os estudos vêm apontando a hipercolesterolemia como um fator de risco para o desenvolvimento de neuropatologias, tais como a doença de Parkinson. Em alguns países a prevalência de hipercolesterolemia chega a 50% em adultos. A disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e a consequente neuroinflamação, parecem conectar os níveis aumentados de colesterol no sangue às neuropatologias. Nesse sentido, torna-se imperativo o estudo de estratégias terapêuticas anti-inflamatórias que atenuem os efeitos da hipercolesterolemia no sistema nervoso central (SNC), a fim de evitar o desenvolvimento e progressão dessas patologias. De particular interesse, estudos experimentais demonstraram que as nanopartículas de ouro (GNPs) possuem relevantes efeitos anti-inflamatórios. Tendo isso em mente, hipotetizamos que o tratamento crônico com GNPs possa reduzir alterações cerebrais e comportamentais características da doença de Parkinson associadas à hipercolesterolemia. Para isso, camundongos *Swiss* machos com três meses de idade foram alimentados com dieta padrão para roedores ou dieta rica em colesterol (1,25% colesterol). Ademais, os animais foram concomitantemente tratados com GNPs (2,5 mg/Kg, em solução aquosa) ou com veículo (solução aquosa) via gavagem, em dias alternados. Ao final dos tratamentos (oito semanas) os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais do campo aberto, suspensão pela cauda, postura cataléptica e borrifagem da sacarose. Em adição analisou-se os níveis de colesterol total no plasma, bem como a permeabilidade da BHE nas estruturas cerebrais córtex, hipocampo e bulbo olfatório. A hipercolesterolemia, nos camundongos alimentados com dieta rica em colesterol foi associada à postura cataléptica, assim como ao comportamento tipo-depressivo. Notavelmente, o tratamento com GNPs foi capaz de prevenir a alteração postural e comportamento tipo-depressivo induzidos pela hipercolesterolemia nos camundongos. Os camundongos expostos à dieta hipercolesterolêmica também apresentaram um aumento na permeabilidade da BHE no bulbo olfatório e hipocampo. O tratamento com GNPs melhorou o dano na BHE associado à hipercolesterolemia no bulbo olfatório, mas não no hipocampo, dos animais. Nossos dados demonstraram que o tratamento com GNPs parece potencialmente capaz de atenuar as disfunções cerebrais induzidas pela hipercolesterolemia. No entanto, mais estudos são necessários para que os mecanismos envolvidos nos efeitos neuroprotetores das GNPs sejam caracterizados.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia; Doença de Parkinson; Permeabilidade da Barreira hematoencefálica; Nanopartículas de ouro; Efeitos anti-inflamatórios.

ABSTRACT

Over the years, studies have been pointing hypercholesterolemia as a risk factor for the development of neuropathologies, such as Parkinson's disease. Prevalence of hypercholesterolemia ranged from 50 to 84% in some countries. Blood brain barrier (BBB) dysfunction and consequent neuroinflammation appear to link increased blood cholesterol levels to neuropathologies. In this regard, it is important to study anti-inflammatory therapeutic strategies that attenuate the effects of hypercholesterolemia in the central nervous system (CNS), in order to prevent the development and progression of these pathologies. Of particular interest, experimental evidence have shown that gold nanoparticles (GNPs) have relevant anti-inflammatory effects. Therefore, we hypothesized that chronic treatment with GNPs could reduce cerebral and behavioral changes characteristic of Parkinson's disease induced by hypercholesterolemia. For this, three-month-old male *Swiss* mice were exposed to a standard diet or a high cholesterol diet (1.25% cholesterol). In addition, the animals were concomitantly treated with GNPs (2.5 mg / kg in aqueous solution) or with vehicle (aqueous solution) via gavage on alternate days. At the end of the treatments (eight weeks) the mice were submitted to behavioral tests of open field, tail suspension, catalepsy and splash test. Additionally, total plasma cholesterol levels were analyzed as well as BBB permeability in brain structures: pre frontal cortex, hippocampus and olfactory bulb. Hypercholesterolemia, in the *Swiss* mice fed a high cholesterol diet, was associated with cataleptic posture, as well as depressive-like behavioral. Notably, GNPs treatment prevented the postural alteration and depressive-like behavioral induced by hypercholesterolemia in mice. Mice exposed to hypercholesterolemic diet also presented an increase on BBB permeability in the olfactory bulb and hippocampus. Treatment with GNPs ameliorated hypercholesterolemia-induced BBB disruption in the olfactory bulb, but not in the hippocampus, of the animals. Our data demonstrated that GNPs treatment appears to be potentially capable of attenuating the brain dysfunction induced by hypercholesterolemia. However, further studies are necessary to better characterize the mechanisms involved in the neuroprotective effects of GNPs.

Key words: Hypercholesterolemia; Parkinson's disease; Blood brain barrier permeability; Gold nanoparticles; Anti-inflammatory effects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Síntese do colesterol.....	16
Figura 2. Transporte de colesterol no plasma.....	17
Figura 3. Desenho Experimental..	29
Figura 4. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs nos níveis de colesterol total plasmáticos em camundongos <i>Swiss</i>	34
Figura 5. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs sob o consumo alimentar e o ganho de peso em camundongos <i>Swiss</i> expostos a dieta rica em colesterol..	34
Figura 6. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs na locomoção e postura cataléptica em camundongos <i>Swiss</i>	35
Figura 7. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs no comportamento tipo-depressivo em camundongos <i>Swiss</i>	36
Figura 8. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs na permeabilidade da BHE ao corante fluoresceína de sódio em camundongos <i>Swiss</i>	37
Figura 9 - O tratamento com as nanopartículas de ouro (GNPs) melhoram as disfunções cerebrais induzidas pela exposição à uma dieta rica em colesterol em camundongos.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de referências.	19
Tabela 2 - Escore de catalepsia segundo Shiozaki e colaboradores.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A β – Peptídeo β -Amiloide
- AChE – Acetilcolinesterase
- Apos – Apolipoproteína
- APP – Proteína percursora amiloide
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- GNP – Nanopartículas de ouro
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
- IDL – Lipoproteína de densidade intermediária
- IL1 β – Interleucina 1 β
- IL6 – Interleucina 6
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- NF κ B – Fator Nuclear Kappa Beta
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- QM – Quilomícron
- SNC – Sistema Nervoso Central
- TLR4 – Receptor semelhante ao Toll-4
- VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 METABOLISMO DO COLESTEROL	15
1.2 HIPERCOLESTEROLEMIA E SUAS CONSEQUÊNCIAS	18
1.2.1 Hipercolesterolemia e prejuízos cognitivos	20
1.2.2 Hipercolesterolemia e doença de Parkinson	21
1.2.3 Hipercolesterolemia e depressão	23
1.2.4 Hipercolesterolemia, BHE e neuroinflamação	24
1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO	25
2 OBJETIVO	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
3 MATERIAIS E METODOS	28
3.1 ANIMAIS	28
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	28
3.3 ANÁLISE DE NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL.....	29
3.4 ANÁLISE CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO	30
3.5 ANALISES COMPORTAMENTAIS	30
3.5.1 Teste do campo aberto	30
3.5.2 Avaliação da postura cataléptica	30
3.5.3 Teste de suspensão pela cauda	31
3.5.4 Teste de borrifagem da sacarose	31
3.6 ANÁLISE FUNCIONAL DE PERMEABILIDADE DA BHE.....	32
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
4 RESULTADOS	33
4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À DIETA RICA EM COLESTEROL E DO TRATAMENTO COM GNPS NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL E PARÂMETROS ALIMENTARES	33
4.2 EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DO TRATAMENTO COM GNPS EM ALTERAÇÕES MOTORAS E NÃO-MOTORAS CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA DE PARKINSON EM MODELO EXPERIMENTAL	34
4.3 EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DO TRATAMENTO COM GNPS NA PERMEABILIDADE DA BHE EM REGIÕES CEREBRAIS SABIDAMENTE ACOMETIDAS NA DOENÇA DE PARKINSON E DEPRESSÃO	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ETICA NO USO DE ANIMAIS	57

1 INTRODUÇÃO

O colesterol, um álcool não saturado da família dos compostos esteroides, é essencial para o funcionamento normal de todas as células animais. Além de componente estrutural indispensável das membranas celulares, o colesterol é também precursor biossintético de hormônios esteroides, ácidos biliares e vitamina D, bem como desempenha papel crítico em processos de sinalização e proliferação celular (Goedeke e Fernandez-Hernando, 2011; Mclean, 2012). No sistema nervoso central (SNC), este lipídeo é um importante constituinte da bainha de mielina, a qual envolve o axônio neuronal, acelerando assim a transmissão de impulsos e sinais nervosos de um neurônio a outro (Saher et al, 2005). Entretanto, níveis elevados de colesterol na corrente sanguínea, principalmente na lipoproteína de baixa densidade (LDL), levam a um quadro clínico denominado hipercolesterolemia. A hipercolesterolemia está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, particularmente as relacionadas à aterosclerose (Sugiyama et al, 2015; Kannel et al, 1971; Gordon et al., 1989; Khot et al., 2003). Nos últimos anos, especialmente nas últimas duas décadas, estudos clínicos e pré-clínicos vêm demonstrando que a hipercolesterolemia também é um importante fator de risco ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Alzheimer e Parkinson, e transtornos depressivos (Sparks et al., 1990; Wolozin et al, 2000; Michikawa, 2003; Hu et al., 2008; Solomon et al., 2009; Chuang et al., 2014).

1.1 METABOLISMO DO COLESTEROL

Devido a grande importância biológica do colesterol, as células necessitam de um suprimento contínuo desta gordura. Nos animais, a concentração média de colesterol é de aproximadamente 2,2 mg de colesterol por grama de peso corporal. No entanto, esta concentração sofre grande variação se relacionada a cada tecido ou órgão, principalmente em mamíferos. Por exemplo, a quantidade média de colesterol no cérebro corresponde a aproximadamente 25% do colesterol total presente no organismo, sendo que o cérebro corresponde a cerca de 10% do peso corporal, ou seja, no cérebro a concentração média de colesterol é de 15 – 20 mg/g de tecido. No SNC, o colesterol é particularmente abundante na bainha de mielina (70-80% do colesterol total no cérebro adulto), mas também está presente em todas as células do SNC, tais como nas células gliais (Dietschy e Turley, 2004).

Nas células animais, o colesterol pode ser proveniente da síntese hepática e extra-hepática (síntese endógena) ou da dieta (Calpe-Berdiel, 2009). Em condições normais, estima-se que aproximadamente 60% do colesterol presente no organismo seja sintetizado (cerca de

700 mg/dia) enquanto o restante, os outros 40%, são derivados da dieta (Leoni e Caccia, 2013).

A síntese endógena de colesterol (síntese *de novo*), nos mamíferos, ocorre em todas as células, mas principalmente no fígado e intestino, os quais respondem por cerca de 10% de toda a produção. No citosol das células e no retículo endoplasmático, o seu precursor acetil-CoA é condensado com outras duas moléculas de acetil-CoA em duas reações enzimáticas sucessivas, formando o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) que em seguida sofre a ação da enzima HMG-CoA redutase convertendo-se em mevalonato. Em seguida o mevalonato sofre a adição de três grupos fosfato em três passos consecutivos que o tornam uma unidade isoprenoíde ativa. A seguir seis unidades isoprenoídes são condensadas dando origem ao esqualeno. Por fim, a ação da lanosterol sintetase faz a ciclização do esqualeno, formando o lanosterol, que nos animais é convertido em colesterol por meio de 20 reações sucessivas. A síntese do colesterol encontra-se resumida na figura 1 (Nelson e Cox, 2014).

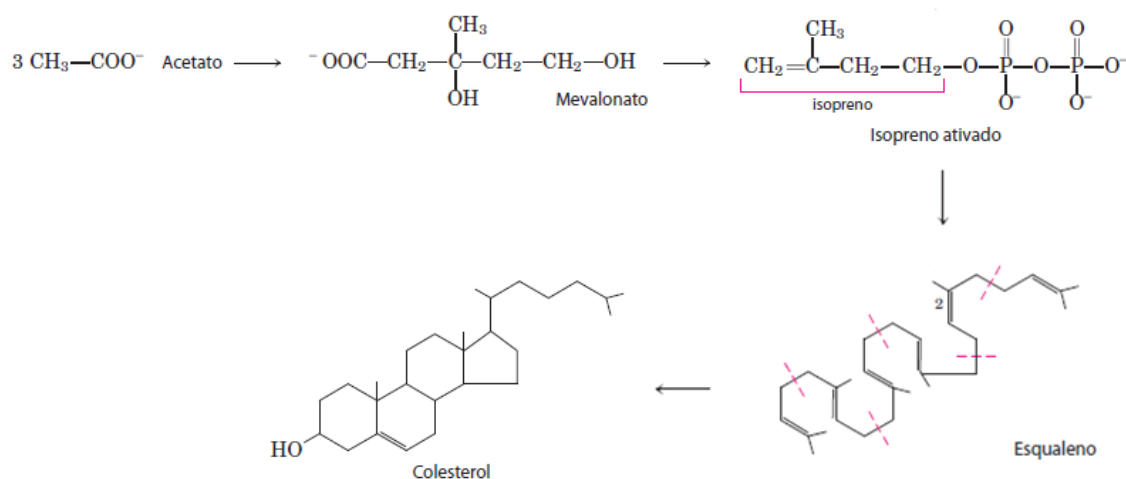


Figura 1. Síntese do colesterol. A síntese do colesterol inicia-se por um precursor comum, o acetil coA. Moléculas de acetil-coA (acetato) passam por processos de condensação, intermediados por enzimas, até que seja formado o mevalonato. Este torna-se uma unidade isoprenoíde ativa, via adição de grupamentos fosfato em três reações consecutivas. Após a ativação do mevalonato, seis unidades isoprenoídes se condensam, formando o esqualeno, o qual é convertido em lanosterol por uma reação de ciclização. Nos animais, o lanosterol é posteriormente convertido em colesterol por meio de 20 reações consecutivas, as quais ocorrem no retículo endoplasmático. Fonte: Nelson e Cox (2014) com adaptações do autor (2019)

Por ser de natureza lipídica e hidrofóbica, o colesterol, assim como outros lipídeos, necessita de moléculas carreadoras, denominadas lipoproteínas, para ser transportado na corrente sanguínea. Essas moléculas possuem um núcleo hidrofóbico contendo triglicerídeos, antioxidantes, vitaminas lipossolúveis e éster de colesterol; e um revestimento hidrofílico que contém colesterol livre, fosfolipídios e apolipoproteínas (Apos) (Hegele, 2009).

O transporte do colesterol na corrente sanguínea está ilustrado na figura 2. A porcentagem de colesterol proveniente da dieta é primeiramente absorvida do lúmen intestinal e transportada, via quilomícrons (QM), aos capilares sanguíneos. Ao longo do percurso os QM, que são as maiores lipoproteínas e as menos densas, acabam liberando, via ação da lipase lipoproteica, boa quantidade de triglicerídeos para os tecidos. Os QM remanescentes (ricos em colesterol e Apos) são captados pelo fígado, onde são metabolizados. No fígado, o colesterol pode ser convertido em ácidos biliares, secretado na bile ou empacotado em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). O VLDL, ao sair do fígado e chegar à corrente sanguínea, acaba perdendo lipídios para o tecido muscular e adiposo, sendo assim convertido em lipoproteína de baixa densidade (LDL), a lipoproteína com maior concentração de colesterol. O LDL transporta o colesterol para os tecidos periféricos e retorna ao fígado, onde é novamente metabolizado. O transporte reverso do colesterol, aquele que vai dos tecidos ao fígado, onde o lipídeo é excretado via bile, é realizado pela lipoproteína de alta densidade (HDL) (Lewis e Rader, 2005; Faludi et al., 2017).

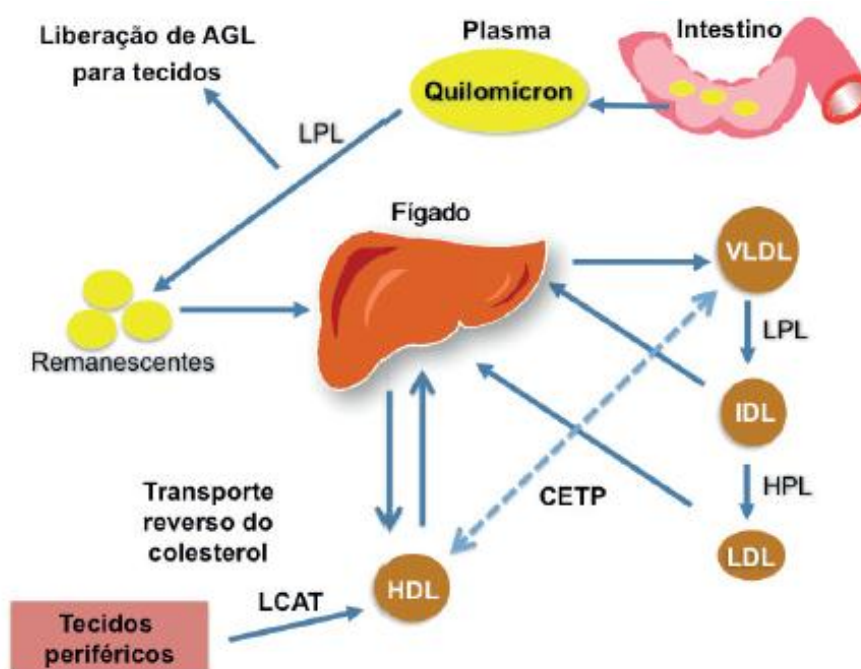


Figura 2. Transporte de colesterol no plasma. O transporte de lipídeos no nosso organismo é realizado com o auxílio de lipoproteínas. Ele inicia-se no intestino delgado, onde a gordura proveniente da dieta é inicialmente captada pelos quilomícrons, que carregam os lipídeos ao fígado para serem metabolizados. No fígado, o colesterol pode ser esterificado, convertido em ácidos biliares, secretado na bile ou empacotado em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) para ser transportado para os tecidos extra-hepáticos. Neste transporte endógeno, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é de suma importância por ser a lipoproteína mais rica em colesterol. O excesso de colesterol dos tecidos periféricos retorna ao fígado para ser metabolizado, via transporte reverso do colesterol, processo este intermediado principalmente pela lipoproteína de alta densidade (HDL).
Fonte: (Faludi et al., 2017).

A homeostase do colesterol é regulada principalmente pelo receptor de LDL, uma vez que o mesmo medeia a remoção e o catabolismo de partículas lipoproteicas contendo colesterol da circulação sanguínea (Brown e Goldstein, 1986; Hobbs et al., 1992). As partículas de LDL circulantes, ligam-se ao receptor de LDL presente na superfície das células. O ligante fisiológico mais importante do receptor é a LDL, a qual contém uma única cópia de ApoB100 e carrega aproximadamente 65 a 70% do colesterol plasmático em humanos. Outras lipoproteínas contendo apoE, tais como a VLDL, a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e a HDL também podem ligar-se ao receptor de LDL (Innerarity e Mahley, 1978; Weisgraber et al., 1978; Jeon e Blacklow, 2005). Quando a função deste receptor é diminuída, ocorre insuficiência na remoção e endocitose da LDL plasmática, o que leva ao estímulo da síntese de colesterol hepático e conseqüentemente a maiores níveis de colesterol na corrente sanguínea (Brown e Goldstein, 1984).

1.2 HIPERCOLESTEROLEMIA E SUAS CONSEQUÊNCIAS

A hipercolesterolemia pode ocorrer por origem genética ou devido à dieta, através da ingestão de grandes quantidades de carboidratos e/ou colesterol (Durrington, 2003; Busnelli et al., 2013). O principal exemplo de hipercolesterolemia de origem genética é a hipercolesterolemia familiar, a qual é causada por mutações no gene que codifica o receptor de LDL. A hipercolesterolemia familiar é um distúrbio que afeta uma a cada 250 pessoas no mundo, tornando-a uma alteração relativamente comum na população mundial. Esta prevalência varia de acordo com a idade e a localização geográfica, mas não entre outras covariáveis envolvidas como sexo, peso corporal e predisposição genética (Akioyamen et al., 2017).

Um estudo desenvolvido por Faria Neto e colaboradores (2016), mostrou que uma proporção significativa de adolescentes brasileiros apresenta alterações nos níveis lipídicos plasmáticos, as quais incluem a hipercolesterolemia. Nos Estados Unidos, mais de cem milhões de adultos apresentam altos níveis de colesterol na corrente sanguínea (Karr, 2017). Em alguns países, evidências mais recentes mostram que a prevalência de hipercolesterolemia entre adultos pode chegar a 50% (Scheidt-Nave et al., 2013; La Sierra et al., 2015).

A hipercolesterolemia é caracterizada por níveis de colesterol total séricos acima dos valores de referência (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017; Santos, 2015). Como a hipercolesterolemia, seja ela familiar ou adquirida, e outros distúrbios no metabolismo dos lipídeos, estão relacionados ao desenvolvimento de doenças, principalmente as cardiovasculares, estabeleceu-se a Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de

Aterosclerose. Essa diretriz traz os valores de referência para o perfil lipídico em adultos, a qual engloba, dentre outros parâmetros, os níveis de colesterol total e os níveis de colesterol presente na LDL. Os valores plasmáticos de colesterol total desejáveis estão abaixo de 190 mg/dL. Já os níveis de colesterol presente na lipoproteína LDL devem ser considerados de acordo com o grupo de estratificação de risco para eventos cardiovasculares encontrados no paciente. Por exemplo, indivíduos considerados pertencentes ao grupo de alto risco devem ter níveis séricos de LDL menores que 50 mg/dL (Tabela 1) (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Tabela 1. Valores de Referências.

Lipídeos	Com Jejum(mg/dL)	Sem Jejum(mg/dL)	Categoria Referencial
Colesterol Total	<190	<190	Desejável
HDL-c	>40	>40	Desejável
Triglicérides	<150	<175	Desejável
Categoria de risco			
	<130	<130	Baixo
	<100	<100	Intermediário
LDL-c	<70	<70	Alto
	<50	<50	Muito Alto

Legenda: Valores referenciais e de alvo terapêutico do perfil lipídico (Adaptado - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Assim como a diabetes *mellitus*, a obesidade, o tabagismo, a hipertensão entre outros, altos níveis séricos de colesterol são conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Mendis, 2011; Poirier et al, 2006). A hipercolesterolemia, de particular interesse, é um importante fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Mcnamara, 2000).

O papel do colesterol na aterosclerose foi descrito pela primeira vez em 1913, quando Nikolai Anitschkow, em St. Petersburg, Rússia, alimentou coelhos com colesterol e constatou alterações ateroscleróticas em suas artérias semelhantes aquelas observadas em humanos (Konstantinov et al, 2006). Por aterosclerose entende-se o desenvolvimento de placas ateromatosas na túnica íntima das artérias. Com base em experimentos em animais e observações em humanos, a maioria dos modelos atuais de aterosclerose postula uma mudança qualitativa inicial na monocamada de células endoteliais que reveste a superfície arterial interna. Em paralelo ocorrem alterações na permeabilidade endotelial e na composição da matriz extracelular abaixo do endotélio, o que promove a entrada e retenção de partículas

de LDL na parede arterial. Isto é seguido por aumento do processo inflamatório, e por fim formação das placas de ateroma (Libby, 2011).

As placas ateroscleróticas, uma vez formadas, podem bloquear parcialmente ou totalmente um vaso sanguíneo de médio ou grande calibre em locais como o coração, cérebro, pelve, pernas, braços ou rins. Devido a isso, doenças como a doença arterial coronariana ou carotídea, doença arterial periférica e doença renal crônica podem ocorrer (American Heart Association, 2017). Estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram por doenças vasculares em 2015, representando 31% de todas as mortes em nível global. Desses óbitos, estima-se que 7,4 milhões ocorrem devido às doenças cardiovasculares e 6,7 milhões devido a acidentes vasculares cerebrais. Além disso, das 17 milhões de mortes prematuras (pessoas com menos de 70 anos) por doenças crônicas não transmissíveis, 82% acontecem em países de baixa e média renda e 37% são causadas por doenças cardiovasculares (OMS, 2017).

Além desta associação entre os níveis aumentados de colesterol na circulação sanguínea e eventos vasculares, nas últimas décadas a hipercolesterolemia vem sendo associada a distúrbios neurodegenerativos e psiquiátricos (Ariza et al., 2016; Kivipelto et al., 2001; Sparks et al, 2005; Zambon et al., 2010).

1.2.1 Hipercolesterolemia e prejuízos cognitivos

Altos níveis plasmáticos de colesterol podem provocar modificações neurológicas e neurodegenerativas, as quais incluem alterações características da doença de Alzheimer (Sparks et al, 1990; Sparks et al, 1994; Solomon et al, 2009; Chen et al, 2004; Sun, 2014). A doença de Alzheimer é um distúrbio neurodegenerativo de caráter progressivo e irreversível, caracterizada por perda de memória gradativa, além de déficits cognitivos e alterações comportamentais (López e Dekosky, 2008). As principais características neuropatológicas dessa doença são a presença de formas insolúveis do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) em placas amiloides nos espaços extracelulares, e a agregação da proteína tau dos microtúbulos em emaranhados neurofibrilares nos neurônios, particularmente no córtex cerebral e hipocampo (Kumar; Singh e Ekavali, 2015).

Existem dois tipos de doença Alzheimer, o de origem genética e o esporádico. Geneticamente, a doença pode ter origem por meio de mutações autossômicas dominantes em genes que codificam proteínas envolvidas na produção do $A\beta$, como a proteína precursora amiloide (APP). Deste modo, há um desenvolvimento precoce da doença (idade média 45 anos) devido principalmente à superprodução do $A\beta$ no tecido cerebral. Já a forma

esporádica, mais comum, na qual não se sabe ao certo o que leva ao acúmulo de A β no cérebro afetado, tem início mais tardio (idade média 80 anos) (Masters et al, 2015).

Estudos clínicos e epidemiológicos indicam que indivíduos hipercolesterolêmicos são mais susceptíveis a desenvolver a doença de Alzheimer esporádica. Em especial, um estudo prospectivo de coorte realizado por Kivipelto e colaboradores (2001), apontou que indivíduos acometidos com hipercolesterolemia durante a meia idade, tiveram maior comprometimento cognitivo leve e suscetibilidade à doença de Alzheimer em idades mais avançadas (Kivipelto et al., 2002, 2005). Segundo os autores, a hipercolesterolemia aumenta em três vezes a probabilidade de desenvolver esta neuropatologia, principalmente se o aumento no colesterol total vier acompanhado de altos níveis de LDL (Kivipelto et al., 2002).

Outro estudo realizado por Pappolla et al (2003), encontrou uma ligação entre níveis elevados de colesterol e a patologia amiloide cerebral em indivíduos com idade entre 40 e 55 anos, porém o mesmo não se fez presente em idosos, sugerindo que o colesterol alto durante o estágio pré-sintomático (principalmente meia idade), é importante para o desenvolvimento da doença de Alzheimer.

Por sua vez, Refolo e colaboradores (2000), utilizando animais modificados geneticamente para a doença de Alzheimer e alimentados com uma dieta rica em colesterol, demonstraram que a hipercolesterolemia induz aumento nos níveis cerebrais do peptídeo A β . Nessa mesma linha de evidência, Moreira e colaboradores (2013) ao submeter camundongos *Swiss* adultos jovens a uma dieta rica em colesterol (1,25% de colesterol) por oito semanas, observaram alterações neuroquímicas e comportamentais características da doença de Alzheimer. O consumo de dieta com alto teor de colesterol provocou aumento na atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos, o que foi associado a prejuízos de memória espacial, memória exploratória e de aprendizado.

1.2.2 Hipercolesterolemia e doença de Parkinson

Mais recentemente a hipercolesterolemia também vem sendo apontada como um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Parkinson (Paul et al., 2017 A; Paul et al., 2017 B). A doença de Parkinson é um distúrbio neurodegenerativo progressivo e irreversível caracterizado por manifestações clínicas como o tremor em repouso, bradicinesia, rigidez, instabilidade postural e marcha arrastada (Dickson, 2012). A doença de Parkinson é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na via nigro-estriatal e pela presença de

corpos de Lewy (emaranhados proteicos formados devido ao acúmulo de proteínas α -sinucleína) nos neurônios (Dickson et al, 2009; Miller e O'Callaghan, 2015). A perda de neurônios dopaminérgicos e consequente diminuição dos níveis de dopamina nas áreas cerebrais que recebem estímulos destes neurônios, estão diretamente relacionadas com os déficits motores característicos da doença (Galvan e Wichmann, 2008). Esta doença também é caracterizada clinicamente pela presença de alterações não-motoras, tais como prejuízos cognitivos e sintomas depressivos (Dauer e Przedborski, 2003; Ding et al., 2015).

Atualmente, estima-se que esta doença neurodegenerativa afete cerca de 1% das pessoas com mais de 60 anos, e 4% das pessoas com mais de 80 anos no mundo. Prevalência esta, que a torna a segunda doença neurodegenerativa mais frequente na população mundial, perdendo somente para a doença de Alzheimer (Reeve, 2014). A grande maioria dos casos de doença de Parkinson são de origem esporádica. De fato, a doença de Parkinson é definida como uma doença complexa e multifatorial resultante da interação de fatores de risco genéticos e ambientais durante toda a vida. A exposição a agrotóxicos e outros compostos químicos, poluentes ambientais, é considerada o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento de doença de Parkinson (Migliore e Coppedè, 2009). Nos últimos anos doenças metabólicas também foram associadas à doença de Parkinson (Martin-Jiménez et al., 2016; Ashraghi et al., 2016)

Uma correlação positiva entre altos níveis de colesterol e a doença de Parkinson fora observada em pacientes com idade entre 25 a 44 anos e 45 a 54 anos, porém tal relação não se fez presente em pacientes com mais de 55 anos (Hu et al, 2008). Além disso, Paul e colaboradores (2017), reportaram que camundongos expostos a uma dieta rica em colesterol apresentaram déficits comportamentais psicomotores, os quais foram associados à depleção dos níveis de aminas biogênicas, como serotonina e dopamina no córtex e estriado, respectivamente. Paul e coautores (2017b) também demonstraram que níveis plasmáticos de colesterol aumentados contribuem para a perda neuronal na substância negra em modelo experimental de doença de Parkinson induzido por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). De particular interesse, células neuronais expostas *in vitro* à um ambiente rico em colesterol, apresentaram maior deposição da proteína α -sinucleína (Marwarha et al, 2011; Glöckner et al, 2011).

1.2.3 Hipercolesterolemia e depressão

As doenças neurológicas são frequentemente acompanhadas pela depressão. As doenças de Alzheimer e de Parkinson são as principais doenças neurodegenerativas que tem a depressão como comorbidade (Raskind, 2008). De fato, evidências apontam que a hipercolesterolemia pode causar transtornos depressivos (Strekalova et al, 2015; Tyrovolas et al, 2009; Vural et al, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a depressão como um transtorno mental comum, caracterizado por tristeza persistente e perda de interesse em atividades nas quais o indivíduo normalmente sente prazer, acompanhadas por uma incapacidade de realizar atividades diárias, durante pelo menos duas semanas consecutivas (Who, 2018). Ainda segundo a OMS, a depressão é uma doença frequente em todo o mundo, com mais de 300 milhões de pessoas afetadas, e destas, cerca de 800 mil morrem por suicídio todos os anos. A principal hipótese para explicar a fisiopatologia da depressão é a hipótese monoaminérgica. Segundo ela, indivíduos afetados com a depressão possuem menores concentrações de neurotransmissores monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina e dopamina) na fenda sináptica, o que acaba por induzir sintomas e comportamentos do tipo depressivo (Belmaker, 2008).

Além disso, com o intuito de correlacionar a doença cerebrovascular à depressão, Alexopoulos e colaboradores (2006) propuseram a “hipótese vascular da depressão”. Segundo o autor as alterações cerebrovasculares, tais como a aterosclerose, elevam a suscetibilidade ao desenvolvimento de transtornos comportamentais e cognitivos, os quais incluem manifestações depressivas. Nesse contexto, foi demonstrado um aumento da incidência de depressão causado pela hipercolesterolemia, a qual ocorre tanto em indivíduos jovens como em idosos (Nakao et al, 2001; Iosifescu et al, 2005; Tyrovolas et al, 2009). Recentemente Engel e colaboradores (2016) mostraram em camundongos (knockout de receptores LDL) modelos experimentais de hipercolesterolemia familiar comportamento tipo-depressivo, o qual foi associado com alterações no metabolismo monoaminérgico (Engel, 2016).

Além disso, observou-se por meio de estudos clínicos e pré-clínicos que a hipercolesterolemia parece estar associada a uma pior resposta ao tratamento antidepressivo (Sonawalla et al, 2002; Papakostas et al, 2003; Iosifescu et al, 2005; Isingrini et al, 2010).

1.2.4 Hipercolesterolemia, BHE e neuroinflamação

Estudos experimentais utilizando modelos animais de hipercolesterolemia indicam que a inflamação periférica e conseqüentemente as alterações metabólicas e disfuncionais na barreira hematoencefálica (BHE) e neuroinflamação parecem preceder as alterações cerebrais características das doenças neurodegenerativas induzidas pela hipercolesterolemia (Sparks et al., 2000; Ghribi et al., 2006; Ullrich et al., 2010; de Oliveira et al., 2014). O SNC é protegido fisiologicamente e fisicamente pela BHE. A BHE é quem regula o transporte de substâncias da circulação sistêmica para o parênquima cerebral, as quais incluem células imunes periféricas, citocinas e outras moléculas inflamatórias (De Vries et al, 2012).

Animais modelos de hipercolesterolemia familiar alimentados com uma dieta rica em colesterol, apresentaram elevação no processo neuroinflamatório e comprometimento de memória (Thirumangalakudi et al, 2008). Neste mesmo modelo animal, foi também observado um aumento da permeabilidade da BHE e neuroinflamação em regiões cerebrais sabidamente acometidas na depressão e doença de Alzheimer, tais como córtex pré-frontal e hipocampo (De Oliveira et al, 2014). Strekalova e colaboradores (2015) mostraram que camundongos C57BL/6J alimentados com dieta rica em colesterol (0,2%) também apresentam comportamento tipo-depressivo e aumento da expressão hipocampal de receptor do tipo Tlr4, importante receptor envolvido com a resposta inflamatória.

Cabe destacar que os locais de morte neuronal, na doença de Parkinson, coincidem com aumento na permeabilidade da BHE (Carvey et al., 2005; Kortekaas et al., 2005). Nesse contexto, a inflamação tem sido associado como um mediador importante para o início e progressão da doença. Além disso estudos têm demonstrado que na patofisiologia da doença de Parkinson ocorre uma interação entre o parênquima cerebral e o sistema imune periférico (Hirsch et al., 2012). Inicialmente, estudos histopatológicos em cérebros de indivíduos com doença de Parkinson apresentaram diferentes células imunes circulantes (principalmente linfócitos T) e níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β e IL-6 (McGeer et al., 1988; Boka et al., 1994; Imamura et al., 2003). Mais tarde, proteínas do sistema complemento foram encontradas em corpos de Lewy extraneuronais, sugerindo que a ativação inflamatória ocorre em associação com a formação de depósitos de α -sinucleína (Gerhard et al., 2006; Bartels et al., 2010; Moehle e West, 2014). Estes dados foram corroborados em modelos experimentais da doença de Parkinson - nestes modelos a inflamação estava presente antes de ocorrer disfunção e morte neuronal (Kannarkat et al., 2013).

Atualmente os tratamentos das doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, são em grande parte meramente paliativos. Dessa forma, novas estratégias terapêuticas, como substâncias que possam atenuar parâmetros inflamatórios, vêm sendo cada vez mais estudadas. Nesse sentido, as nanopartículas de ouro (GNPs), moléculas com propriedades anti-inflamatórias, podem ser uma promissora estratégia para prevenção de alterações cerebrais associadas à hipercolesterolemia.

1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas inorgânicas cujas estruturas exibem funcionalidade e propriedades biológicas devido ao seu tamanho, despertam muito interesse de diferentes grupos e áreas de pesquisa (Bhattacharya e Mukherjee, 2008). Dentre elas, as GNPs recebem atenção especial devido às suas propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalíticas (Daniel e Astruc, 2004). As GNPs são extensivamente estudadas por serem biocompatíveis, atóxicas, de preparação simples, e fácil conjugação com biomoléculas (Hainfeld et al, 2006).

As GNPs têm também recebido grande atenção como agente anti-inflamatórios porque foram capazes de inibir a expressão do NF κ B e as subsequentes reações inflamatórias (Jeon et al, 2003). Nessa mesma linha de evidência, Tsai e colaboradores (2007) demonstraram que essas nanopartículas são capazes de diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, assim como a infiltração de macrófagos, utilizando um modelo experimental de artrite. Além disso, foi demonstrado que as GNPs são agentes antioxidantes que inibem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e melhoram as defesas antioxidantes (Barathmanikanth et al., 2010). Em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta, o tratamento com GNPs reduziu parâmetros inflamatórios e melhorou o metabolismo de gorduras e glicose, quando administrado em baixa dosagem (0,785 microgramas/grama) (Chen et al, 2018 A; Chen et al, 2018 B).

De particular interesse, estudo desenvolvido por Sela e colaboradores (2015) demonstrou que as GNPs podem ultrapassar a BHE sem a necessidade de estímulos externos adicionais, fato este que contribui positivamente com a sua biodisponibilidade e ação biológica no parênquima cerebral. No entanto, o papel das GNPs sob parâmetros comportamentais e neurológicos, ainda é pouco investigado na literatura. De particular interesse, o estudo desenvolvido por Muller et al (2017), mostrou que o tratamento com GNPs foi capaz de prevenir, via atenuação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo, déficits cognitivos e comportamentais característicos da doença de Alzheimer esporádica em camundongos.

A busca por intervenções terapêuticas para atenuar e/ou prevenir as consequências da hipercolesterolemia é de extrema importância, tendo em vista a sua grande prevalência na população mundial, bem como a relevância de suas consequências. Nas últimas décadas, a associação entre hipercolesterolemia e disfunções cerebrais vem sendo bastante estudada. O aumento da permeabilidade da BHE e a neuroinflamação parecem ser eventos que conectam a hipercolesterolemia a neuroinflamação, e a algumas neuropatologias. De particular importância, o uso de GNPs vem ganhando destaque em estudos visando o tratamento da inflamação. Sendo assim, nós hipotetizamos que o tratamento crônico com GNPs é capaz de prevenir os efeitos da hipercolesterolemia no SNC, particularmente àqueles associados à doença de Parkinson.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com GNPs nas alterações cerebrais e comportamentais características da doença de Parkinson em camundongos hipercolesterolêmicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Investigar os efeitos do tratamento crônico com GNPs e da exposição à dieta rica em colesterol, em camundongos *Swiss*, sobre:

- Consumo alimentar e peso corporal;
- Níveis de colesterol total no plasma;
- Parâmetros comportamentais, i.e., postura cataléptica e modelos experimentais de emocionalidade;
- Permeabilidade da BHE nas regiões cerebrais, e.g., bulbo olfatório, estriado e hipocampo.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 ANIMAIS

Para realização deste trabalho foi utilizado 100 camundongos machos da linhagem *Swiss* pesando entre 25 e 30g, com 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da UNESC. Os animais estiveram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7:00 às 19:00h), e com livre acesso a água e comida. Os procedimentos empregados para a realização deste presente trabalho obtiveram aprovação do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da UNESC, sob o parecer nº 007/2018-1.

3.2 SINTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro (GNPs) de tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich et al. (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor. Após a síntese, as soluções de GNPs foram caracterizadas empregando-se a técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro. Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SPR, foi realizada a temperatura ambiente utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL de cada uma das soluções, sendo que o espectro eletrônico das soluções foi monitorado diariamente ao longo de uma semana no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção, obtendo-se valor de 532 nm para GNPs de 20 nm.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Na figura 3 está representado o desenho experimental. Os camundongos *Swiss* machos adultos jovens (3 meses de idade) foram tratados com uma dieta padrão (valor calórico de 3,9 kcal/g) ou com uma dieta rica em colesterol (1,25% de colesterol; valor calórico de 4,7 kcal/g) (de Oliveira et al., 2011, 2013). Além disso, os camundongos foram concomitantemente

tratados com GNPs (2,5 mg/Kg, em solução aquosa) ou com solução veículo (solução aquosa) pela via oral (gavagem) em dias alternados, totalizando quatro grupos experimentais (figura 3B). Ao final de oito semanas de tratamentos os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais – testes de campo aberto, postura cataléptica, suspensão pela cauda, borrifagem da sacarose. Após a realização dos testes comportamentais, uma parte dos animais (em jejum de 6 horas) foi anestesiada e o sangue coletado por punção cardíaca para a determinação dos níveis de colesterol total no plasma. Já outra parcela dos animais foi submetida ao ensaio de fluoresceína de sódio (utilizado como marcador de permeabilidade da BHE), no qual foram dissecadas as regiões cerebrais bulbo olfatório, estriado e hipocampo (figura 3 A e B). Vale ressaltar que a ingestão de comida e o peso corporal foram controlados durante todo o período experimental.

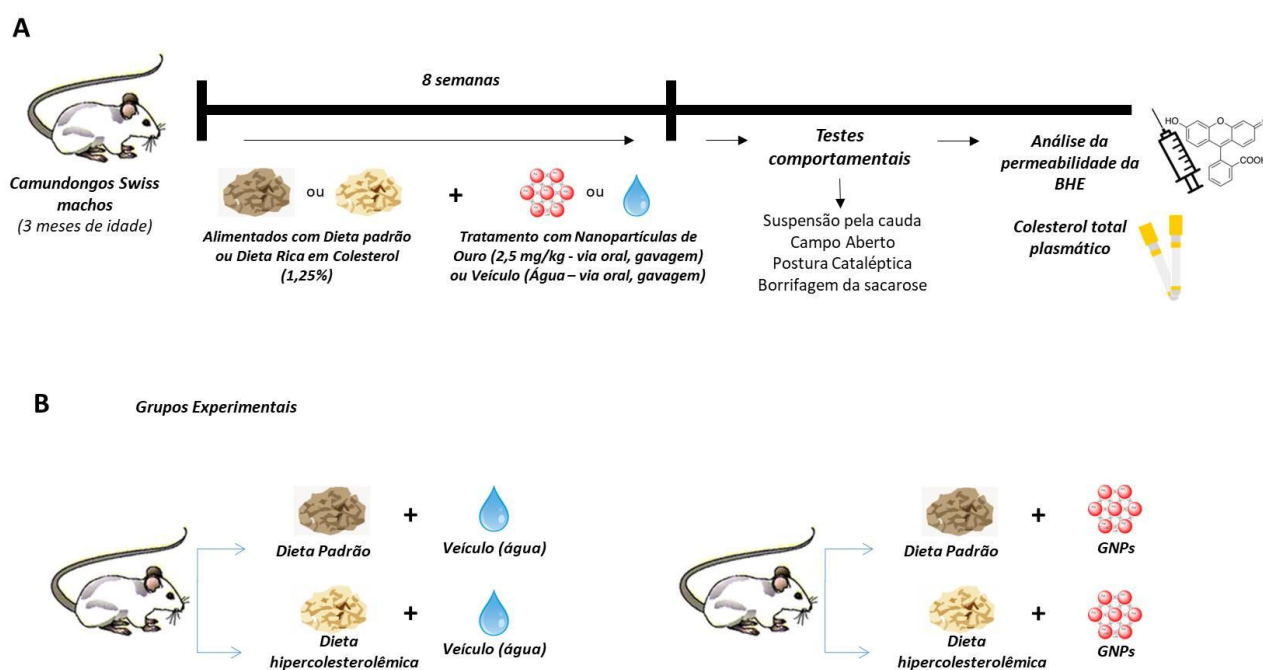


Figura 3. Desenho Experimental. Fonte: Elaboração dos autores (2019).

3.3 ANÁLISE DE NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL

A análise dos níveis de colesterol total no plasma foi realizada com kit comercial (Bioliqid).

3.4 ANÁLISE CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO

O consumo alimentar foi mensurado durante todo o período experimental em dias alternados, a partir da subtração da quantidade inicial de ração pela quantidade final, após consumo da mesma pelos animais. Já para avaliação do ganho de peso corporal, foram mensurados semanalmente durante oito semanas os pesos corporais de cada animal. Então, a variação de peso foi calculada a partir da subtração do peso final de cada animal pelo seu respectivo peso inicial.

3.5 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

3.5.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora dos animais (Prut e Belzung, 2003). O aparelho feito de acrílico transparente com assoalho cinza foi dividido por linhas pretas em 25 quadrados (10 x 10 cm) e cercado por paredes elevadas em 40 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o número total de cruzamentos foi registrado por 5 minutos. Um cruzamento foi registrado quando o animal atravessou o quadrado com as quatro patas.

3.5.2 Avaliação da postura cataléptica

O tempo de imobilidade das patas dianteiras e das patas traseiras foi medida sobre uma barra horizontal (3 mm de diâmetro, 4,5 cm de altura, 10 cm de largura). A postura cataléptica, por sua vez, foi avaliada de acordo com o escore de catalepsia demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Escore de catalepsia segundo Shiozaki e colaboradores.

ESCORE DA CATALEPSIA	POSTURA CATALÉPTICA
0	<5s e ambas as patas traseiras
1	Das patas dianteiras durante 5 a 10s
2	Das patas dianteiras >10
3	Das patas dianteiras e traseiras durante 5 a 10s, ou postura cataléptica das patas dianteiras <5s e das patas traseiras >10s
4	Das patas dianteiras >10s e traseiras durante 5 a 10 s, ou postura cataléptica de patas dianteiras 5-10 s, e traseiras >10 s
5	Das patas dianteiras e traseiras >10s

Fonte: Shiozaki et al., 1999.

3.5.3 Teste de suspensão pela cauda

No teste de suspensão pela cauda foi avaliado o comportamento tipo-depressivo dos camundongos. A duração total da imobilidade induzida pela suspensão pela cauda foi registrada por um observador experiente durante o período total de 5 minutos, em que os camundongos ficaram suspensos a 50 centímetros do chão, presos por uma fita adesiva a 1 centímetro da base de suas caudas. Os camundongos foram considerados imóveis quando houve ausência de movimento ou movimentação passiva (Steru et al, 1985; Brocardo et al, 2008).

3.5.4 Teste de borrifagem da sacarose

Este teste foi realizado como descrito por Isingrini e colaboradores (2010), e consistiu em borrifar uma solução 10% de sacarose no dorso de cada animal posicionado individualmente em uma caixa de acrílico (9 × 7 × 11 cm). Devido à viscosidade e palatabilidade da solução de sacarose, logo após a borrifagem o animal inicia um comportamento de autolimpeza. Após a aplicação da solução, o tempo total de autolimpeza foi mensurado durante 5 min como um índice de autocuidado e comportamento motivacional,

considerado um paralelo aos sintomas de apatia na depressão. O aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre cada sessão a fim de remover vestígios do animal anterior.

3.6 ANÁLISE FUNCIONAL DE PERMEABILIDADE DA BHE

A permeabilidade da BHE ao corante de baixo peso molecular, fluoresceína de sódio, foi avaliada no bulbo olfatório, estriado e hipocampo dos animais. Para isto, os camundongos foram anestesiados com isoflurano e a fluoresceína de sódio 4% (4 mL/kg) foi injetada na veia peniana. Após 30 minutos da administração, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, i.p.) e posteriormente perfundidos com solução salina e as estruturas cerebrais dissecadas e processadas para análise da concentração de fluoresceína de sódio (Bohara et al, 2014).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas por meio de análises de variâncias (ANOVA) de duas vias seguidas pelo teste de Duncan quando apropriado, ou por ANOVA de uma via com comparações múltiplas. Os resultados são considerados significativos para $p \leq 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica®. A fim de retirar os *outliers*, utilizou-se o programa GraphPad QuickCalcs: outlier calculator. Para um elemento ser considerado *outlier*, o mesmo deveria ser diferente dos demais valores sob um nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Nas últimas décadas a hipercolesterolemia, conhecido fator de risco cardiovascular, vem sendo associada também ao desenvolvimento de alterações no SNC características das doenças neurodegenerativas e suas comorbidades (Maxfield e Tabas, 2005; Ikonen, 2006; Eskelinen et al., 2011; Engel et al., 2016; Paul et al., 2017a). Neste sentido, este estudo teve como principal objetivo a busca por uma possível estratégia terapêutica para a prevenção de alterações cerebrais características da doença de Parkinson, induzidas pela hipercolesterolemia. Camundongos *Swiss* expostos à dieta rica em colesterol durante oito semanas foram utilizados como modelo experimental de hipercolesterolemia induzida por dieta. Além disso, os animais foram também expostos ao tratamento oral com GNPs (2,5 mg/kg) em dias alternados pelo mesmo período (Figura 3).

4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À DIETA RICA EM COLESTEROL E DO TRATAMENTO COM GNPS NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL E PARÂMETROS ALIMENTARES

Os camundongos expostos à dieta hipercolesterolêmica apresentaram um aumento significativo nos níveis séricos de colesterol ($p < 0,05$), quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão. Por outro lado, o tratamento com as GNPs não foi capaz de alterar os níveis de colesterol séricos dos animais hipercolesterolêmicos (Figura 4). É importante mencionar que os animais hipercolesterolêmicos (independentemente do tratamento com GNPs) ingeriram menos ração se comparados aos animais que receberam dieta padrão (Figura 5A) ($p < 0,05$), porém tiveram um ganho de peso significativamente maior se comparados aos animais alimentados com dieta padrão ($p < 0,05$) (Figura 5B). O tratamento com GNPs também não preveniu a redução no consumo alimentar e ganho de peso induzidos pela exposição à dieta rica em colesterol (Figura 5A e 5B). Além disso, os animais alimentados com dieta padrão e tratados com GNPs tiveram um menor consumo alimentar do que aqueles alimentados com dieta padrão e que receberam veículo ($p < 0,05$) (Figura 5A).

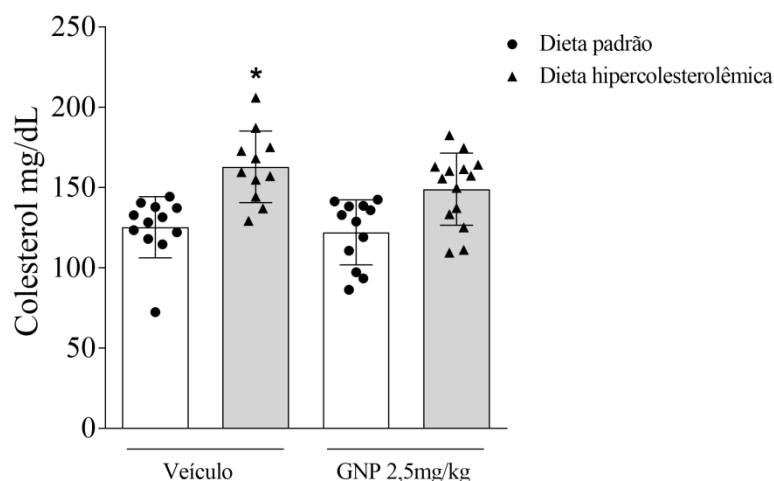


Figura 4. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs nos níveis de colesterol total plasmáticos em camundongos *Swiss*. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (12-14 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. *em relação aos camundongos tratados com uma dieta padrão e veículo.

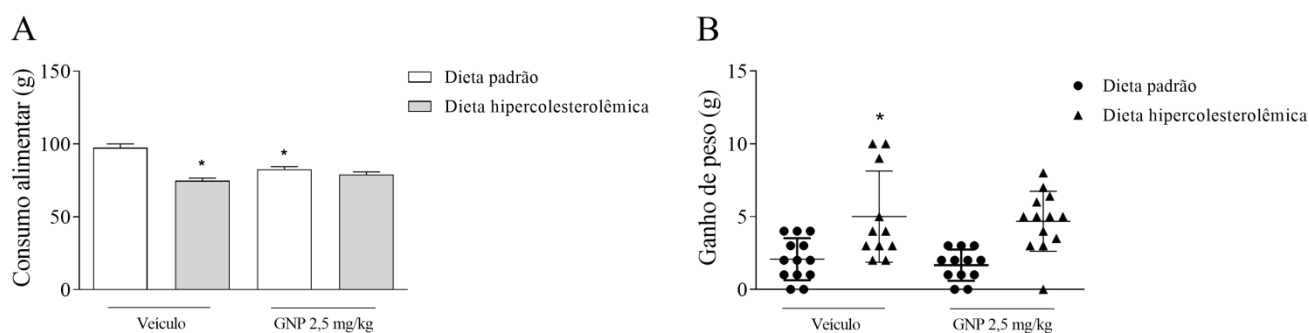


Figura 5. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs sob o consumo alimentar e o ganho de peso em camundongos *Swiss* expostos a dieta rica em colesterol. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (12-14 animais por grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de uma via com comparações múltiplas. *em relação aos camundongos tratados com dieta padrão e veículo.

4.2 EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DO TRATAMENTO COM GNPS EM ALTERAÇÕES MOTORAS E NÃO-MOTORAS CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA DE PARKINSON EM MODELO EXPERIMENTAL

Paul e colaboradores (2017a) demonstraram que camundongos expostos à dieta rica em colesterol apresentam alterações motoras, tais como postura cataléptica. Neste estudo, nós avaliamos se o tratamento com GNPs 2,5 mg/kg em dias alternados seria capaz de prevenir esta alteração característica da doença de Parkinson induzida pela hipercolesterolemia em camundongos. A postura cataléptica foi avaliada de acordo com o escore de catalepsia, onde registrou-se o tempo de imobilidade das patas dianteiras e das patas traseiras sobre uma barra horizontal. Nós observamos que a exposição à dieta rica em colesterol alterou a postura cataléptica de maneira significativa nos camundongos ($p < 0,05$). De particular importância, o

tratamento com GNPs foi capaz de prevenir a catalepsia em camundongos hipercolesterolêmicos ($p < 0,05$) (Figura 6B). Ademais foi avaliado a locomoção dos animais (Figura 6A). Não houve diferença entre o número de cruzamentos nos diferentes grupos experimentais. Portanto, a hipercolesterolemia e o tratamento com GNPs não modificaram a locomoção de camundongos *Swiss*.

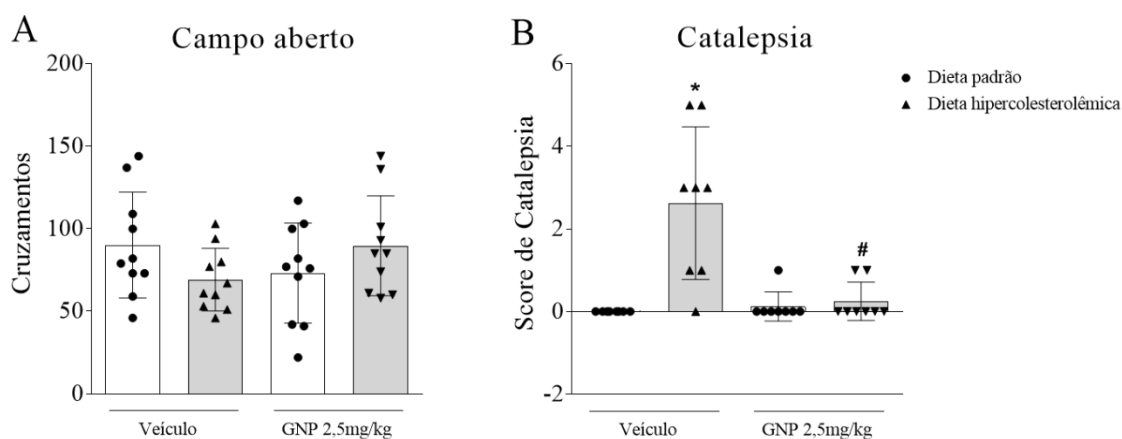


Figura 6. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs na locomoção e postura cataléptica em camundongos *Swiss*. Testes: A) campo aberto e B) de avaliação da postura cataléptica. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (8-10 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. *em relação aos camundongos tratados com uma dieta padrão e veículo, #em relação aos camundongos tratados com uma dieta hipercolesterolêmica e veículo.

Sintomas depressivos e ansiedade são importantes manifestações não motoras da doença de Parkinson (Lieberman, 2003). Sabendo disso, os grupos experimentais também foram submetidos a testes comportamentais para a análise de comportamento tipo-depressivo. No teste de suspensão pela cauda, os animais hipercolesterolêmicos apresentaram um maior tempo de imobilidade, i.e., um comportamento tipo-depressivo ($p < 0,05$) (figura 7A). Notavelmente, o tratamento com as GNPs preveniu o comportamento tipo-depressivo induzido pela hipercolesterolemia nos camundongos ($p < 0,05$) (figura 7A). No teste de borrifagem da sacarose, a hipercolesterolemia foi associada a um menor tempo de autolimpeza ($p < 0,05$), o que também indica um comportamento tipo-depressivo. A concomitante exposição às GNPs não foi capaz de prevenir a diminuição do tempo de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose (figura 7B).

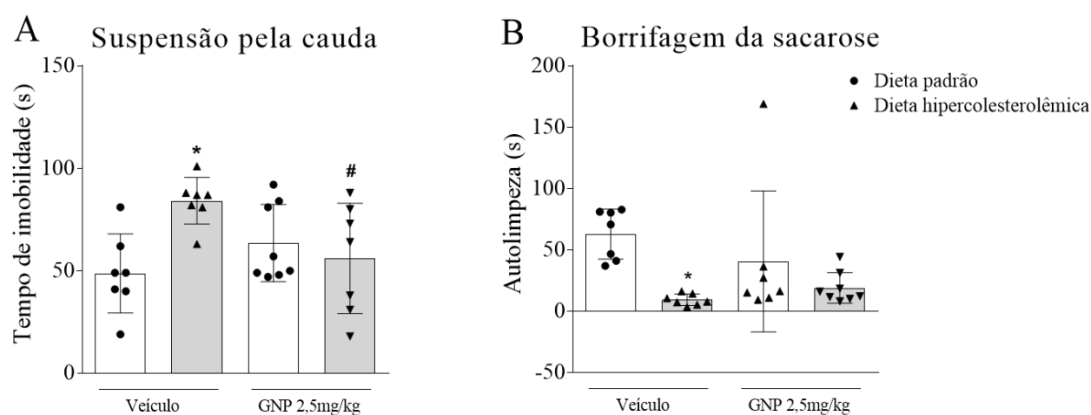


Figura 7. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs no comportamento tipo-depressivo em camundongos *Swiss*. Testes A) suspensão pela cauda e B) borrifagem de sacarose. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (8-10 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. *em relação aos camundongos tratados com uma dieta padrão e veículo, #em relação aos camundongos tratados com uma dieta hipercolesterolêmica e veículo.

4.3 EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DO TRATAMENTO COM GNPs NA PERMEABILIDADE DA BHE EM REGIÕES CEREBRAIS SABIDAMENTE ACOMETIDAS NA DOENÇA DE PARKINSON E DEPRESSÃO

Finalmente, avaliou-se a permeabilidade da BHE via ensaio da fluoresceína de sódio, nas estruturas cerebrais bulbo olfatório, estriado e hipocampo. Os camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram uma maior permeabilidade da BHE no bulbo olfatório e hipocampo ($p < 0,05$), quando comparados com os camundongos alimentados com dieta padrão (controles) (Figura 8A e 8C, respectivamente). De particular interesse, o tratamento com GNPs foi capaz de prevenir esta alteração na BHE no bulbo olfatório ($p < 0,05$) dos animais alimentados com dieta rica em colesterol (Figura 8A), mas não no hipocampo (Figura 8C). No que diz respeito ao estriado, não foram observadas diferenças significativas na permeabilidade da BHE nos diferentes grupos experimentais (Figura 8B).

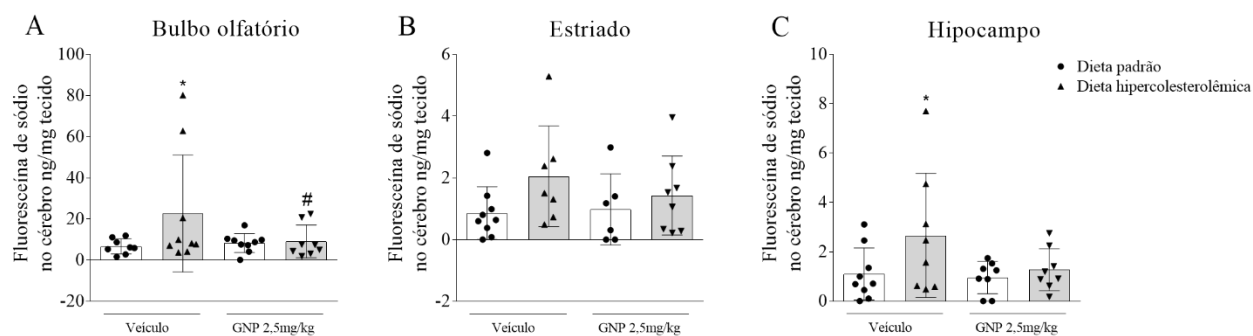


Figura 8. Efeitos da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com GNPs na permeabilidade da BHE ao corante fluoresceína de sódio em camundongos *Swiss*. A) Bulbo olfatório, B) Estriado e C) Hipocampo. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (8-10 animais/grupo). Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Duncan. *em relação aos camundongos tratados com uma dieta padrão e veículo, #em relação aos camundongos tratados com uma dieta hipercolesterolêmica e veículo.

5 DISCUSSÃO

O colesterol é um lipídeo de relevância biológica, devido a seu grande número de funções. Dessa forma, as células necessitam de um suprimento contínuo deste lipídeo (Goedeke e Fernandez-Hernando, 2011; Mclean, 2012). Por outro lado, desequilíbrios na homeostase e metabolismo do colesterol estão associados ao desenvolvimento de algumas patologias. Há muitos anos a hipercolesterolemia é conhecido fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Sugiyama et al, 2015; Kannel et al, 1971; Gordon et al., 1989; Khot et al., 2003). Estudos mais recentes demonstram haver uma importante relação entre a hipercolesterolemia e o desenvolvimento de neuropatologias, tais como a doença de Parkinson (Paul et al., 2017a) e a depressão (Engel et al., 2016). Atualmente em alguns países a hipercolesterolemia afeta cerca de 50% dos adultos mundiais (La Sierra et al., 2015). Nesse sentido, torna-se importante o controle de suas consequências. Dessa forma, neste estudo foi avaliado o potencial efeito neuroprotetor do tratamento com GNPs, moléculas anti-inflamatórias e antioxidantes, nas consequências cerebrais características da doença de Parkinson induzidas pela exposição à uma dieta hipercolesterolêmica em camundongos *Swiss*.

A hipercolesterolemia é caracterizada pelo acúmulo de colesterol total na corrente sanguínea, podendo ser causada devido uma dieta inadequada ou alterações genéticas no metabolismo do colesterol (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). Como modelo animal de hipercolesterolemia utilizamos camundongos *Swiss* alimentados durante oito semanas com uma dieta suplementada com 1,25% de colesterol (Moreira et al., 2013). De acordo com estudo anteriores, estes camundongos apresentaram em torno de 30% de aumento nos níveis de colesterol total no plasma (Moreira et al., 2013; De Souza et al., 2019). De fato, o uso da exposição à dieta enriquecida com colesterol como modelo de hipercolesterolemia em coelhos e roedores (ratos e camundongos) já está muito bem descrito na literatura. Diversos estudos estão utilizando estes modelos em investigações relacionadas ao tratamento das consequências da hipercolesterolemia (Kapourchali, 2014; Goldstein et al., 2009).

A exemplo do que ocorre em modelos animais de outras doenças metabólicas induzidas por dieta, como da diabetes por exemplo (De Souza et al., 2004), os animais hipercolesterolêmicos ingeriram menos ração e ganharam mais peso se comparados aos animais alimentados com dieta padrão. Isto também está de acordo com o estudo recente que utilizou esse modelo de hipercolesterolemia (De Souza et al., 2019). Esta diferença entre consumo e ganho de peso possivelmente é decorrente das diferenças existentes entre os

valores energéticos de cada dieta. A dieta com alto teor de colesterol possui valor calórico de 4,7 kcal/g, enquanto que a dieta padrão para roedores tem o valor calórico de 3,8 kcal/g. Esta maior ingestão calórica dos animais que receberam a dieta rica em colesterol, acabou aumentando a saciedade e diminuindo a ingestão alimentar nestes animais quando comparados aos que receberam a dieta padrão.

Inúmeros estudos experimentais utilizando modelos animais de hipercolesterolemia, apontaram que altos níveis de colesterol no sangue induzem alterações cerebrais características da doença de Alzheimer (Sparks et al., 1994; Refolo et al., 2000; Moreira et al., 2012, 2013). Dentre estes trabalhos, o de Moreira e colaboradores (2013) demonstrou que camundongos *Swiss* expostos a uma dieta rica em colesterol apresentaram prejuízo de memória e aprendizado. Mais recentemente Paul e colaboradores (2017a), observaram que camundongos *Swiss* expostos à uma dieta hipercolesterolêmica contendo 5% de colesterol durante doze semanas, apresentaram um importante aumento dos níveis de colesterol no sangue, apresentaram alterações motoras, tais como acinesia e catalepsia. Os danos motores nestes camundongos hipercolesterolêmicos foram associados a uma diminuição nos níveis de dopamina no estriado (Paul et al., 2017a). Em nosso estudo a exposição a uma dieta rica em colesterol (1,25%) durante oito semanas também causou catalepsia nos animais. Dessa forma, nossos dados apontam que níveis moderadamente aumentados de colesterol no sangue já foram associados a alterações posturais características da doença de Parkinson nos camundongos.

É importante mencionar que a depressão está presente em cerca de 40% dos indivíduos com doença de Parkinson. A depressão é considerada uma alteração não motora dessa doença neurodegenerativa (Frisina et al., 2008). Os sintomas depressivos são mais frequentes em pacientes com doença de Parkinson do que na população em geral (Reijnders et al., 2008). De particular importância, modelos animais de doença de Parkinson – animais expostos à 6-hidroxidopamina, por exemplo – apresentam comportamento tipo-depressivo (Fontoura et al., 2017).

Nossos dados também apontaram comportamento do tipo-depressivo nos camundongos hipercolesterolêmicos, caracterizado pelo um aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e diminuição da autolimpeza no teste de borrifagem da sacarose. Moreira e colaboradores (2013) em seu estudo afirmaram que a hipercolesterolemia em camundongos *Swiss* não desencadeia comportamento tipo-depressivo. No entanto, estes autores utilizaram o teste do nado forçado para avaliação do comportamento tipo-depressivo. Cabe destacar que utilizando também o teste de nado forçado Paul e

colaboradores (2017a) mostraram que camundongos expostos à dieta hipercolesterolêmica apresentam comportamento tipo-depressivo, o que foi correlacionado com uma menor concentração de serotonina no córtex cerebral dos animais. Previamente Engel e colaboradores (2016) mostraram em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar comportamento tipo-depressivo utilizando inúmeros testes comportamentais, dentre eles os testes suspensão pela cauda e borrifagem da sacarose. Além disso, os autores apontaram que o comportamento-tipo depressivo induzido pela hipercolesterolemia esteve associado à uma maior atividade da enzima monoamina oxidase hipocampal. Uma possível explicação para estes resultados contraditórios é a diferença de finalidade dos testes disponíveis para avaliação de comportamento tipo-depressivo. Os dois testes, suspensão pela cauda e nado forçado, envolvem a análise do comportamento espontâneo do animal frente a uma situação desconfortável, no entanto, apresentam diferenças sutis. O teste de nado forçado é apropriado para a avaliação do efeito antidepressivo de fármacos. Já o teste de suspensão pela cauda apresenta boa validade preditiva, i.e. é indicado para avaliação de aspectos clínicos característicos da depressão em modelos experimentais. Além disso, este teste também é apropriado para a triagem de compostos com possíveis ações antidepressivas. O teste de borrifagem da sacarose, por sua vez, é considerado válido marcador comportamental de anedonia em animais modelos de depressão. Mais especificamente é mais indicado para a análise de alterações comportamentais associadas a alterações nos níveis de dopamina (Powell et al., 2012).

Mecanismos que relacionam os níveis aumentados de colesterol no plasma com o desenvolvimento de alterações cerebrais ainda não estão totalmente elucidados. Dentre os fatores conhecidos que correlacionam a hipercolesterolemia às doenças do SNC estão a disfunção da BHE e a neuroinflamação (Sparks et al., 2000; de Oliveira et al., 2014). Sparks e colaboradores (2000) demonstraram que a hipercolesterolemia afeta a integridade da BHE e desencadeia o aumento no extravasamento de IgG em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol (Sparks et al., 2000). Além disso, em camundongos modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, os altos níveis de colesterol no sangue foram associados a um aumento na permeabilidade da BHE no hipocampo, visualizada pelo aumento da expressão da aquaporina-4 (De Oliveira et al., 2014). Nesse sentido, neste trabalho nós avaliamos se os camundongos *Swiss* alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentariam prejuízo da BHE, por meio do ensaio com o corante fluoresceína de sódio. Os camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram aumentada permeabilidade da BHE no bulbo olfatório e hipocampo, mas não no estriado. O bulbo olfatório é uma das primeiras regiões cerebrais

afetadas na doença de Parkinson. Estima-se que 80% dos pacientes com doença de Parkinson tenham disfunção no bulbo olfatório (Doty, 2012). Já as alterações hipocampais estão bastante relacionadas à fisiopatologia da depressão. Ademais, a disfunção hipocampal está relacionada com as alterações neuropsiquiátricas presentes na doença de Parkinson (Calabresi et al., 2013; Cha et al., 2016).

As alterações da BHE associadas à hipercolesterolemia possivelmente são causadas pela inflamação periférica característica dessa condição metabólica. Uma característica importante da fisiopatologia de distúrbios metabólicos é a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Ferreira et al., 2014). No estudo de Lohmann e colaboradores (2009) camundongos expostos à dieta rica em colesterol apresentaram inflamação generalizada com aumento de recrutamento de linfócitos T e macrófagos para o tecido adiposo, por fim resultando na indução da produção de citocinas como TNF α , IL-1 β e IL-6. Em contraste, de Souza e coautores (2019) observaram uma diminuição dos níveis de IL-6 no hipocampo dos camundongos *Swiss* expostos à dieta hipercolesterolêmica. Em adição, evidências apontam a disfunção da BHE como possível evento desencadeador da doença de Parkinson, bem como da depressão (Carvey et al., 2005; Kortekaas et al., 2005).

Outro ponto importante nesse cenário é o envolvimento amplamente comprovado do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial na patogênese de doenças metabólicas, assim como das doenças neurodegenerativas (Fernández-Checa et al., 2010; Sorriento et al., 2014; Bhat et al., 2015; Rani et al., 2016; Jha et al., 2016). De particular interesse, o estresse oxidativo é considerado um importante mecanismo de conexão entre alterações na BHE e as neuropatologias. Em adição, inúmeros estudos vêm demonstrando que a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode afetar a permeabilidade da BHE por diferentes maneiras, e.g. via modulação das proteínas pertencentes as junções oclusivas (Pun et al., 2009; Lochhead et al., 2010; Enciu et al., 2013). A vasculatura cerebral parece ser importante fonte e alvo de estresse oxidativo. As mitocôndrias atuam como fontes primárias de ERO sob estresse oxidativo (Freeman e Keller, 2012; Jha et al., 2016). Tucsek e colaboradores (2013) demonstraram, em camundongos expostos à dieta rica em gorduras saturadas, que alterações metabólicas e a consequente inflamação sistêmica estão associadas a estresse oxidativo, disfunção da BHE e neuroinflamação hipocampal. Em outro estudo foi demonstrado que ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras saturadas durante doze semanas apresentaram disfunção mitocondrial cerebral, indicada pelo aumento da produção de mitocondrial de ERO e despolarização mitocondrial (Pintana et al., 2012). A hipercolesterolemia, por sua vez, causa estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em regiões cerebrais como córtex, hipocampo,

estriado e substância negra (de Oliveira et al., 2011; Paul et al., 2017b). Muitas linhas de evidência têm apontado para um ciclo oxidativo-inflamatório na vasculatura cerebral induzido pela hipercolesterolemia que poderia impactar áreas relevantes para a cognição (Thirumangalakudi et al., 2008; Evola et al., 2010).

As GNPs vêm sendo extensivamente estudadas devido suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Jeon et al., 2003; Tsai et al., 2007; Chen et al., 2013). Nesse sentido, nós avaliamos o potencial efeito neuroprotetor das GNPs nas consequências cerebrais associadas à hipercolesterolemia nos camundongos *Swiss*. Nós observamos que o tratamento em dias alternados com as GNPs na dose de 2,5 mg/kg foi capaz de prevenir a catalepsia, bem como o comportamento tipo-depressivo nos camundongos hipercolesterolêmicos. Além disso, o concomitante tratamento com as GNPs melhorou a disfunção da BHE no bulbo olfatório dos camundongos expostos aos níveis elevados de colesterol no plasma. Nossos dados estão de acordo com o recente estudo de Muller e colaboradores (2017), o qual demonstrou que o tratamento com GNPs foi capaz de atenuar o prejuízo cognitivo associado à doença de Alzheimer esporádica, e também preveniu o a indução do processo inflamatório e dano oxidativo no cérebro dos ratos. Especificamente, o tratamento com GNPs preveniu o estresse oxidativo, i.e. produção de espécies reativas e diminuição de antioxidantes celulares, assim como o aumento na expressão do fator de transcrição NFκB e da IL-1β (Muller et al., 2017). Os possíveis mecanismos de ação destas nanopartículas parecem incluir a habilidade de bloquear a função do NFκB e processos inflamatórios relacionados, e a capacidade de neutralizar, via ação *scavenger*, moléculas oxidantes. Nesse sentido, em estudo anterior de Oliveira et al (2013) foi observado que um composto antioxidante, disseleneto de difenila, também capaz de neutralizar compostos reativos oxidantes, preveniu o dano oxidativo e disfunção mitocondrial cerebral em camundongos hipercolesterolêmicos. De Souza e colaboradores (2019), por sua vez, demonstraram que o enriquecimento ambiental, uma estratégia que aumenta a atividade física, foi capaz de prevenir prejuízo de memória em camundongos *Swiss* expostos à dieta rica em colesterol. Os autores observaram que os efeitos na cognição do enriquecimento ambiental foram devido a melhora na tolerância à glicose nos animais hipercolesterolêmicos.

Em modelos experimentais de doenças metabólicas a GNPs também vem sendo apontadas como interessantes estratégias terapêuticas. Por exemplo, os efeitos antioxidantes das GNPs foram capazes de melhorar as condições de camundongos hiperglicêmicos (BarathManiKanth et al., 2010). Em camundongos expostos a uma dieta rica em gorduras, as GNPs atenuaram a intolerância à glicose, hiperlipidemia e ganho de peso. Estes efeitos

benéficos foram correlacionados com uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias no fígado e tecido adiposo nos camundongos modelos experimentais de obesidade (Chen et al., 2018a). De particular importância, Chen e coautores (2018b) observaram que o tratamento com GNPs não só previne, como também é capaz de reverter as alterações metabólicas da obesidade em camundongos expostos à dieta rica em gorduras saturadas. É importante mencionar que este foi o primeiro estudo a avaliar os efeitos das GNPs nas consequências da hipercolesterolemia.

Estudos indicam que a absorção celular das nanopartículas é dependente de propriedades como tamanho, forma e superfície (Chithrani et al., 2006; Hyllier e Albertch, 2001). O estudo *in vivo* de Hyllier e Albertch (2001), mostrou que em camundongos as GNPs administradas oralmente aparecem em vários tecidos e que a quantidade de absorção e distribuição no corpo se correlacionava inversamente com o tamanho das partículas, portanto, quanto menor a partícula maior seu grau de permeabilidade celular. Neste trabalho o tamanho das GNPs utilizadas era de 20 nm, o qual vem sendo amplamente aplicado em estudos experimentais (Muller et al., 2017; Hauptenthal et al., 2019; Silveira et al., 2014). A dose utilizada de GNPs, 2,5 mg/kg, em estudos anteriores demonstrou não apresentar toxicidade aos animais (BarathManiKanth et al., 2010). Outro ponto importante é que as GNPs são capazes de ultrapassar a BHE (Li et al., 2015). Isto poderia explicar o fato de no nosso estudo o tratamento com GNPs ter prevenido comportamento tipo-depressivo sem ter melhorado o dano da BHE no hipocampo e bulbo dos camundongos hipercolesterolêmicos.

É importante mencionar que atualmente os tratamentos disponíveis para doença de Parkinson e depressão não são totalmente eficazes (Lauretani et al., 2014; Emamzadeh e Surgucho, 2018). Diante disto, existe uma grande necessidade de se buscarem intervenções inovadoras, inclusive voltadas a prevenção, principalmente para aqueles indivíduos com fatores de risco associadas ao desenvolvimento destas neuropatologias. Ainda tendo em vista os grandes desafios que são estimados para os próximos anos com relação à crescente prevalência de doenças neurodegenerativas, o uso de novas tecnologias, como as nanopartículas, se faz muito importante e promissor para o desenvolvimento de fármacos que proporcionem opções terapêuticas preventivas.

De particular importância, a nanotecnologia parece ser uma importante ferramenta para prevenção das consequências cerebrais causadas pela hipercolesterolemia. No entanto, mais estudos são necessários para avaliação de seu efeito em outras alterações cerebrais (e.g., prejuízos de memória e aprendizado), bem como para a investigação dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na neuroproteção induzida pelas GNPs.

6 CONCLUSÃO

A hipercolesterolemia nos camundongos foi associada às alterações características da doença de Parkinson, tais como catalepsia e comportamento tipo-depressivo. Essas modificações comportamentais nos camundongos alimentados com dieta rica em colesterol foram relacionadas ao prejuízo da BHE em estruturas cerebrais como bulbo olfatório e hipocampo. Nossos dados ainda mostraram que o tratamento com GNPs melhora as disfunções cerebrais em animais hipercolesterolêmicos, possivelmente devido à seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Por fim, este estudo promoveu evidências experimentais que apontam as GNPs como potenciais estratégias terapêuticas para prevenção das consequências da hipercolesterolemia, e do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, particularmente da doença de Parkinson (Figura 9).

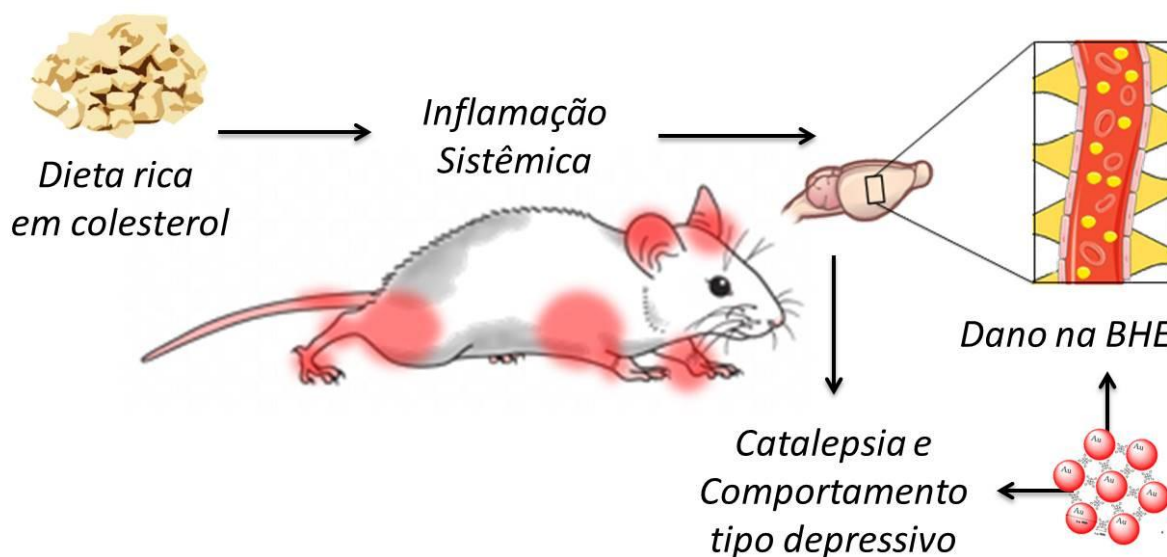


Figura 9. O tratamento com as nanopartículas de ouro (GNPs) melhoram as disfunções cerebrais induzidas pela exposição à uma dieta rica em colesterol em camundongos. Os efeitos neuroprotetores das GNPs estão possivelmente relacionados aos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, GS. The vascular depression hypothesis: 10 years later. *Biological Psychiatry*. 2006; 60: 1304–1305.
- American Heart Association. Atherosclerosis. Dallas. 2017. Disponível em: <<http://www.heart.org/en/health-topics/cholesterol/about-cholesterol/atherosclerosis>>. Acesso em: 10 out. 2018.
- Ariza, M; Cuenca, N; Mauri, M; Jurado, MA; Garolera, M. Neuropsychological performance of young familial hypercholesterolemia patients. *European Journal Of Internal Medicine*. 2016; 34: 29-31.
- Attems, J; Jellinger, K; Thal, DR; Van Nostrand, W. Review: Sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathology And Applied Neurobiology*. 2011; 37 (1): 75-93.
- Belmaker, RH. The future of depression psychopharmacology. *CNS Spectr*. 2008; 13(8): 682-687.
- Bhat, AH; Dar, KB; Anees, S. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*. 2015; 74:101-110.
- Bhattacharya, R; Mukherjee, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60 (11): 1289-1306.
- Bohara, M; Kambe, Y; Nagayama, T; Tokimura, H; Arita, K; Miyata, A. C-Type Natriuretic Peptide Modulates Permeability of the Blood–Brain Barrier. *Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014; 34 (4): 589-596.
- Brocardo, PS; Budni, J; Kaster, MP; Santos, AR; Rodrigues, AL. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology*. 2008; 54 (2): 464-473.
- Brown, MS; Goldstein, JL. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974; 71(3): 788-792.
- Brown, MS; Goldstein, JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Scientific American*. 1984; 251(5): 58-66.
- Busnelli, M; Manzini, M; Froio, A; Vargiolu, A; Cerrito, MG; Smolenski, RT; Giunti, M; Cinti, A; Zannoni, A; Leone, BE; Forni, M; Bacci, ML; Biasi, GM; Giovannoni, R; Lavitrano, M. Diet Induced Mild Hypercholesterolemia in Pigs: Local and Systemic Inflammation, Effects on Vascular Injury – Rescue by High-Dose Statin Treatment. *Plos One*. 2013; 8 (11): 1-15.
- Calabresi, P; Castrioto, A; Di Filippo, M; Picconi, B. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2013; 12 (8): 811-821.

Calpe-Berdiel, L.; Escola-Gil, JC; Blanco-Vaca, F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*. 2009; 203 (1): 18-31.

Carvey, PM; Zhao, CH; Hendey, B; Lum, H; Trachtenberg, J; Desai, BS; Snyder, J; Zhu, YG; Ling, ZD. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. *The European journal of neuroscience*. 2005; 22:1158-1168.

Cha, J; Greenberg, T; Song, I; Blair Simpson, H; Posner, J; Mujica-Parodi, LR. Abnormal hippocampal structure and function in clinical anxiety and comorbid depression. *Hippocampus*. 2016; 26 (5): 545-553.

Chen, H; Ng, JPM; Bishop, DP; Milthorpe, BK; Valenzuela, SM. Gold nanoparticles as cell regulators: beneficial effects of gold nanoparticles on the metabolic profile of mice with pre-existing obesity. *Journal Of Nanobiotechnology*. 2018; 16 (1): 1-16.

Chen, H; Ng, JPM; Tan, Y; McGrath, K; Bishop, DP; Oliver, B; Chan, YL; Cortie, MB; Milthorpe, BK; Valenzuela, SM. Gold nanoparticles improve metabolic profile of mice fed a high-fat diet. *Journal Of Nanobiotechnology*. 2018; 16 (1): 1-12.

Chen, J; Li, D; Schaefer, RF; Mehta, JL. Inhibitory Effect of Candesartan and Rosuvastatin on CD40 and MMPs Expression in Apo-E Knockout Mice. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*. 2004; 44 (4): 446-452.

Chithrani, BD; Ghazani, AA; Chan, WC. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters*. 2006; 6 (4): 662-668.

Chuang, CS; Yang, TY; Muo, CH; Su, HL; Sung, FC; Kao, CH. Hyperlipidemia, statin use and the risk of developing depression: a nationwide retrospective cohort study. *General Hospital Psychiatry*. 2014; 36 (5): 497-501.

Daniel, MC; Astruc, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Revision*. 2004; 104 (1): 293-346.

De Oliveira, J; Moreira, EL; Mancini, G; Hort, MA; Latini, A; Ribeiro-do-Valle, RM; Farina, M; Da Rocha, JB; De Bem, AF. Diphenyl Diselenide Prevents Cortico-cerebral Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Induced by Hypercholesterolemia in LDL Receptor Knockout Mice. *Neurochemical Research*. 2013; 38 (10): 2028-2036.

De Oliveira, J; Moreira, EL; dos Santos, DB; Piermartiri, TC; Dutra, RC; Pinton, S; Tasca, CI; Farina, M; Prediger, RD; de Bem, AF. Increased Susceptibility to Amyloid- β -Induced Neurotoxicity in Mice Lacking the Low-Density Lipoprotein Receptor. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 2014, 41 (1): 43-60.

De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia*. 2005; 48(9):1860-71.

De Souza, RM; de Souza, L; Machado, AE; de Bem Alves, AC; Rodrigues, FS; Aguiar, AS Jr; Dos Santos, ARS; de Bem, AF; Moreira ELG. Behavioural, metabolic and neurochemical

effects of environmental enrichment in high-fat cholesterol-enriched diet-fed mice. *Behavioural Brain Research*, 2019; 359: 648-656.

De Vries, HE; Kooij, G; Frenkel, D; Georgopoulos, S; Monsonogo, A; Janigro, D. Inflammatory events at blood-brain barrier in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders: Implications for clinical disease. *Epilepsia*. 2012; 53: 45-52.

Dickson, DW. Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine*. 2012; 2 (8): 9258-9265.

Dickson, DW; Braak, H; Duda, JE; Duyckaerts, C; Gasser, T; Halliday, GM; Hardy, J; Leverenz, JB; Del Tredici, K; Wszolek, ZK; Litvan, I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet Neurology*. 2009; 8 (12): 1150-1157.

Dietschy, JM; Turley, SD. Thematic review series: Brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal Of Lipid Research*. 2004; 45 (8): 1375-1397.

Doty, RL. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiology Of Disease*. 2012; 46 (3): 527-552.

Durrington, P. Dyslipidaemia. *The Lancet*. 2003; 362 (9385): 717-731.

Emamzadeh, FN.; Surguchov, A. Parkinson's Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. *Frontiers In Neuroscience*. 2018; 12: 1-14.

Enciu, AM; Gherghiceanu, M; Popescu, BO. Triggers and effectors of oxidative stress at blood-brain barrier level: relevance for brain ageing and neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 297-512

Engel, DF. Evidências experimentais da associação entre a hipercolesterolemia e a depressão: envolvimento da neurogênese hipocampal adulta. 2016. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

Erickson, M; Banks, W. Blood-Brain Barrier Dysfunction as a Cause and Consequence of Alzheimer's Disease. *Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013; 33 (10): 1500-1513.

Erickson, MA; Dohi, K; Banks, WA.. Neuroinflammation: A Common Pathway in CNS Diseases as Mediated at the Blood-Brain Barrier. *Neuroimmunomodulation*. 2012; 19 (2): 121-130.

Eskelinen, MH; Ngandu, T; Tuomilehto, J; Soininen, H; Kivipelto M. et al. Midlife Healthy-Diet Index and Late-Life Dementia and Alzheimer's Disease. *Dementia And Geriatric Cognitive Disorders Extra*. 2011; 1 (1): 103-112.

Ettcheto, M; Petrov, D; Pedrós, I; De Lemos, L; Pallàs, M; Alegret, M; Laguna, JC; Folch, J; Camins, A. Hypercholesterolemia and neurodegeneration. Comparison of hippocampal

phenotypes in LDLr knockout and APPswe/PS1dE9 mice. *Experimental Gerontology*. 2015; 65: 69-78.

Evola, M; Hall, A; Wall, T; Young, A; Grammas, P. Oxidative stress impairs learning and memory in apoE knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010; 96(2): 181-186.

Faludi, AA et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose - 2017. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2017, 109 (1),1-3.

Fernández-Checa, JC; Fernández, A; Morales, A. Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010; 9(4): 439-454.

Ferreira, ST; Clarke, JR; Bomfim, TR. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia. The journal of the Alzheimer's Association*. 2014; 10: 76-83.

Fontoura, JL; Baptista, C; Pedroso, FB; Pochapski, JA; Miyoshi, E; Ferro, MM. Depression in Parkinson's Disease: The Contribution from Animal Studies. *Parkinson's Disease*. 2017; 2017: 1-8.

Freeman, LR; Keller, JN. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(5):822-829.

Frisina, PG; Borod, JC; Foldi, NS; Tenenbaum, HR. Depression in Parkinson's disease: health risks, etiology and treatment options. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2008; 4 (1): 81-91.

Galvan, A; Wichmann, T. Pathophysiology of Parkinsonism. *Clinical Neurophysiology*. 2008; 119 (7): 1459-1474.

Glöckner, F; Meske, V; Lütjohann, D; Ohm, TG. Dietary Cholesterol and Its Effect on Tau Protein: A Study in Apolipoprotein E-Deficient and P301L Human Tau Mice. *Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2011; 70 (4); 292-301.

Goedeke L; Fernandez-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cellular And Molecular Life Sciences*. 2011; 69 (6): 915-930.

Goldstein, FC; Ashley, AV; Endeshaw, Y; Hanfelt, J; Lah, JJ; Levey, AI. Effects of Hypertension and Hypercholesterolemia on Cognitive Functioning in Patients with Alzheimer's Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disor*. 2008; 22 (4): 336-342.

Gordon, DJ; Probstfield, JL; Garrison, RJ; Neaton, JD; Castelli, WP; Knoke, JD; Jacobs, DR; Bangdiwala, S; Tyroler, HA . High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989; 79 (1): 8-15.

Hainfeld, JF; Slatkin, DN; Focella, TM; Smilowitz, HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *The British Journal Of Radiology*. 2006; 79 (939): 248-253.

Hauptenthal, DPS; Possato, JC; Zaccaron, RP; Mendes, C; Rodrigues, MS; Nesi, RT; Pinho, RA; Feuser, PE; Avila, RAM; Silveira, PCL. Effects of chronic treatment with gold nanoparticles on inflammatory responses and oxidative stress in Mdx mice. *Journal Of Drug Targeting*. 2019: 1-27.

Hegele, RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nature Reviews Genetics*. 2009; 10 (2): 109-121.

Hillyer, JF; Albrecht, RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal Pharm Sci*. 2001; 90 (12): 1927-36.

Hobbs, HH; Brown, MS; Goldstein, JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation*. 1992; 1(6): 445-466.

Hu, G. Total Cholesterol and the Risk of Parkinson's Disease: A Review for Some New Findings. *Parkinson's Disease*. 2010: 1-6.

Hu, G; Antikainen, R; Jousilahti, P; Kivipelto, M; Tuomilehto, J. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2008; 70 (21): 1972-1979.

Ikonen, E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev*. 2006; 86(4): 1237-1261.

Innerarity, TL; Mahley, RW. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry*. 1978; 17(8): 1440-1447.

Iosifescu, DV; Clementi-Craven, N; Fraguas, R; Papakostas, GI; Petersen, T; Alpert, JE; Nierenberg, AA; Fava, M. Cardiovascular risk factors may moderate pharmacological treatment effects in major depressive disorder. *Psychosomatic Medicine*. 2005; 67: 703–706.

Isingrini, E; Camus, V; Le Guisquet, AM; Pingaud, M; Devers, S; Belzung, C. Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. *Plos One*. 2010; 5 (4): 104-114.

Jeon, H; Blacklow, SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annual Revision of Biochemisthery*. 2005; 74: 535-562.

Jeon, TI; Hwang, SG; Park, NG; Jung, YR; Shin, SI; Choi, SD; Park, DK. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*, 2003; 187 (1): 67-73.

Jha, SK; Jha, NK; Kumar, D. Linking mitochondrial dysfunction, metabolic syndrome and stress signaling in Neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 4439(16): 301-357.

Karr, S. Epidemiology and Management of hiperlidemia. *Am J Manag Care*. 2017; 23:1-10.

Kannel, WB; Castelli, WP; Gordon, T; Mcnamara, PM. Serum Cholesterol, Lipoproteins, and the Risk of Coronary Heart Disease: The Framingham Study. *Annals of Internacional Medicine*. 1971; 74 (1): 1–12.

- Kapourchali, FR. Animal models of atherosclerosis. *World Journal Of Clinical Cases*. 2014; 2 (5): 126-132.
- Khot, UN; Khot, MB; Bajzer, CT; Sapp, SK; Ohman, EM; Brener, SJ; Ellis, SG; Lincoff, AM; Topol, EJ. Prevalence of Conventional Risk Factors in Patients With Coronary Heart Disease. *Jama*. 2003; 290 (7): 898-904.
- Kivipelto, M. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj*. 2001; 322 (7300): 1447-1451.
- Kivipelto, M; Helkala, EL; Laakso, MP; Hänninen, T; Hallikainen, M; Alhainen, K. Apolipoprotein E ϵ 4 Allele, Elevated Midlife Total Cholesterol Level, and High Midlife Systolic Blood Pressure Are Independent Risk Factors for Late-Life Alzheimer Disease. *Annals Of Internal Medicine*. 2002; 137 (3): 149-155.
- Kivipelto, M; Ngandu, T; Fratiglioni, L; Viitonen, M; Kåreholt, I; Winblad, B; Helkala, EL; Tuomilehto, J; Soininen, H; Nissinen, A. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Archives of Neurology*. 2005; 62: 1556-1560.
- Konstantinov, IE.; Mejevoi, N; Anichkov, NM; Nikolai, N. Anichkov and His Theory of Atherosclerosis. *Texas Heart Institute Journal*. 2006; 33(4): 417-423.
- Kortekaas, R; Leenders, KJ; van Oostrom, JC; Vaalburg, W; Bart, J; Willemsen, AT; Hendrikse, NH. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Annals of neurology*. 2005; 57:176-179.
- La Sierra, A; Pinto, X; Guijarro, C; Miranda, JL; Callejo, D; Cuervo, J; Subira, R; Rubio, M. Prevalence, Treatment, and Control of Hypercholesterolemia in High Cardiovascular Risk Patients: Evidences from a Systematic Literature Review in Spain. *Advances In Therapy*. 2015; 32 (10): 944-961.
- Lauretani, F; Saginario, A; Ceda, GP; Galuppo, L; Ruffini, L; Nardelli, A; Maggio, M. Treatment of the motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease according to cluster symptoms presentation. *Curr Drug Targets*. 2014; 15 (10): 943-47.
- Leoni, V; Caccia, C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: A marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie*. 2013; 95 (3): 595-612.
- Lewis, GF; Rader, DJ. New Insights Into the Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circulation Research*. 2005; 96 (12): 1221-1232.
- Li, CH; Shyu, MK; Jhan, C; Stein, YW; Tsai, CH; Liu, CW; Lee, CC; Chen, RM; Kang, JJ. Gold Nanoparticles Increase Endothelial Paracellular Permeability by Altering Components of Endothelial Tight Junctions, and Increase Blood-Brain Barrier Permeability in Mice. *Toxicological Sciences*. 2015; 148 (1): 192-203.
- Libby, P; Ridker, PM; Hansson, GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011; 473 (7347): 317-325.
- Liberman, A. Depression in Parkinson's disease -- a review. *Acta Neurol Scand*. 2006; 113 (1): 1-8.

- Liu, Q; Trotter, J; Zhang, J; Peters, MM; Cheng, H; Bao, J, Han, X; Weeber, EJ, Bu, G. Neuronal LRP1 Knockout in Adult Mice Leads to Impaired Brain Lipid Metabolism and Progressive, Age-Dependent Synapse Loss and Neurodegeneration. *Journal Of Neuroscience*. 2010; 30 (50): 17068-17078.
- Lochhead, JJ; McCaffrey, G; Quigley, CE. Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010; 30(9):1625-1636.
- Lohmann, C; Schafer, N; Von Lukowicz, T. Atherosclerotic mice exhibit systemic inflammation in periadventitial and visceral adipose tissue, liver, and pancreatic islets. *Atherosclerosis*. 2009; 207:360-367.
- López, OL; Dekosky, ST. Clinical symptoms in Alzheimer's disease. *Dementias*. 2008; 207-216.
- Marwarha, G; Rhen, T; Schommer, T; Ghribi, O. The oxysterol 27-hydroxycholesterol regulates α -synuclein and tyrosine hydroxylase expression levels in human neuroblastoma cells through modulation of liver X receptors and estrogen receptors-relevance to Parkinson's disease. *Journal Of Neurochemistry*. 2011; 119 (5): 1119-1136.
- Masters, CL; Bateman, R; Blennow, K; Rowe, CC; Sperling, RA; Cummings, JL. Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015; 1-18.
- Maxfield, FR.; Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 2005; 438(7068): 612-621.
- Mclean KJ; Hans M; Munro AW. Cholesterol, an essential molecule: diverse roles involving cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Society Transactions*. 2012; 40 (3): 587-593.
- Mcnamara, D. Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids*. 2000; 1529 (1-3): 310-320.
- Mendis, S; Puska, P; Norrving, B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization. 2011, 1-156.
- Michikawa, M. Cholesterol paradox: Is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease?. *Journal Of Neuroscience Research*. 2003; 72 (2):141-146.
- Miller, DB; O'Callaghan, JP. Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metabolism*. 2015; 64 (3): 40-46.
- Moreira, ELG; De Oliveira, J; Engel, DF; Walz, R; De Bem, AF; Farina, M; Prediger, RD. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event?. *Journal Of Neural Transmission*. 2013; 121 (4): 415-426.
- Moreira, ELG; Oliveira, J; Engel, DF; Walz, R; De Bem, AF. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. *Neuroscience Letters*. 2013; 541: 193-198.

Moura, EC; Castro, CM; Mellin, AS; Figueiredo, DB. Perfil lipídico em escolares de Campinas, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 2000; 34 (5): 499-505.

Muller, AP; Ferreira, GK; Pires, AJ; Silveira, GB; De Souza, DL; Brandolfi, JÁ; De Souza, CT; Paula, MMS; Silveira, PCL. Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Materials Science And Engineering: C*. 2017; 77: 476-483.

Mytilinaiou, M; Kyrou, I; Khan, M; Grammatopoulos, DK, Randeve, HS. Familial Hypercholesterolemia: New Horizons for Diagnosis and Effective Management. *Frontiers In Pharmacology*. 2018; 9: 1-29.

Nelson, DL; Cox, MM. *Princípios de Bioquímica Lehninger*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. Capítulo 21.4, Colesterol, esteroides e isoprenoides: biossíntese, regulação e transporte. 2014, 859-880.

Organização Pan-Americana Da Saúde. *Doenças cardiovasculares*. Brasília. 2017. Disponível em:

<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839>. Acesso em: 04 out. 2018.

Papakostas, GI; Petersen, T; Sonawalla, SB; Merens, W; Iosifescu, DV; Alpert, JE; Fava, M; Nierenberg, AA. Serum cholesterol in treatment-resistant depression. *Neuropsychobiology*. 2003; 47: 146–151.

Pappolla, MA; Bryant-Thomas, TK; Herbert, D. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology*. 2003; 61 (2): 199-205.

Paul, R; Choudhury, A; Chandra Boruah, D; Devi, R; Bhattacharya, P; Choudhury, MD; Borah, A. Hypercholesterolemia causes psychomotor abnormalities in mice and alterations in cortico-striatal biogenic amine neurotransmitters: Relevance to Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 2017 (A); 108: 15-26.

Paul, R; Choudhury, A; Kumar, S; Giri, A; Sandhir, R; Borah, A. Cholesterol contributes to dopamine-neuronal loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of mitochondrial dysfunctions and oxidative stress. *Plos One*, 2017 (B); 12 (2): 1-22.

Pintana, H; Apaijai, N; Pratchayasakul, W. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sci*. 2012; 91(11-12):409-414.

Poirier, P; Giles, TD; Bray, GA; Hong, Y; Stern, JS; Pi-Sunyer, FX, Eckel, RH. Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Circulation*. 2006; 113 (6): 898-918.

Powell, TR; Fernandes, C; Schalkwyk, LC. Depression-related behavioral tests. *Current Protocols in Mouse Biology*. 2012; 2: 119-127.

Prut, L; Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463 (2): 3-33.

Pun, PB; Lu, J; Moolchala, S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res.* 2009; 43(4):348-364

Rani, V; Deep, G; Singh, RK. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016; 148:183-193.

Reeve, A; Simcox, E; Turnbull, D. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor?. *Ageing Research Reviews.* 2014; 14: 19-30.

Refolo, LM; Malester, B; LaFrancois, J; Bryant-Thomas, T; Wang, R; Tint, GS; Sambamurti, K; Duff, K; Pappolla, MA. Hypercholesterolemia Accelerates the Alzheimer's Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model. *Neurobiology Of Disease*, 2000, 7 (4), 321-331.

Saher, G; Brügger, B; Lappe-Siefke, C; Möbius, W; Tozawa, R; Wehr, MC; Wieland, F; Ishibashi, S; Nave, KA. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nature Neuroscience.* 2005; 8 (4): 468-475.

Santos, L. Educação em saúde como estratégia de cuidado aos portadores de hipercolesterolemia: uma revisão de literatura. Monografia - Curso de Enfermagem, Faculdade São Lucas, 2015; 1: 7-25.

Scheidt-Nave, C; Du, Y; Knopf, H; Schienkiewitz, A; Ziese, T; Nowossadeck, E; Gobwald, A; Bush, M. Verbreitung von Fettstoffwechselstörungen bei Erwachsenen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz.* 2013; 56 (5-6): 661-667.

Sela, H; Cohen, H; Elia, P; Zach, R; Karpas, Z; Zeiri, Y. Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). *Journal Of Nanobiotechnology*, 2015; 13 (1): 1-9.

Shiozaki, S; Ichikawa, S; Nakamura, J; Kitamura, S; Yamada, K; Kuwana, Y. Actions of adenosine A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. *Psychopharmacology.* 1999; 147: 90-95.

Silveira, PCL; Victor, EG; Notoya Fde, S; Scheffer Dda, L; Silva, Ld; Cantú, RB; Martínez, VH; de Pinho ,RA; Paula, MM. Effects of phonophoresis with gold nanoparticles on oxidative stress parameters in a traumatic muscle injury model. *Drug Delivery*; 2014; 23 (3): 916-922.

Simons, M; Keller, P; De Strooper, B; Beyreuther, K; Dotti, CG; Simons, K. et al. Cholesterol depletion inhibits the generation of b-amyloid in hippocampal neurons. *Neurology.* 1998; 95: 6460-6464.

Sociedade brasileira de cardiologia. V Diretrizes Brasileira de Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2017; 109.

- Solomon, A; Kivipelto, M; Wolozin, B; Zhou, J, Whitmer, RA. Midlife Serum Cholesterol and Increased Risk of Alzheimer's and Vascular Dementia Three Decades Later. *Dementia And Geriatric Cognitive Disorders*. 2009; 28 (1): 75-80.
- Sonawalla, SB; Papakostas, GI; Petersen, TJ; Yeung, AS; Smith, MM; Sickinger, AH; Gordon, J; Israel, JA; Tedlow, JR; Lamon-Fava, S; Fava, M. Elevated cholesterol levels associated with nonresponse to fluoxetine treatment in major depressive disorder. *Psychosomatics*. 2002; 43: 310–316.
- Sorriento, D; Pascale, AV; Finelli, R. Targeting mitochondria as therapeutic strategy for metabolic disorders. *ScientificWorldJournal*. 2014;604-685.
- Sparks, DL; Sabbagh, MN; Connor, DJ; Lopez, J; Launer, LJ; Petanceska, S; Browne, P; Wassar, D; Johnson-Traver, S; Lochhead, J; Ziolkowski, C. Atorvastatin therapy lowers circulating cholesterol but not free radical activity in advance of identifiable clinical benefit in the treatment of mild-to-moderate AD. *Neural Regeneration Research*. 2005; 7: 1344-1351.
- Sparks, DL; Hunsaker, JD; Scheff, SW; Kryscio, RJ; Henson, JL; Markesbery, WR. Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology Of Aging*. 1990; 11 (6): 601-607.
- Sparks, DL; Martin, TA; Gross, DR; Hunsaker, JC. Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: A review. *Microscopy Research And Technique*. 2000; 50 (4): 287-290.
- Sparks, DL; Scheff, SW; Liu, H; Landers, TM; Coyne, CM; Hunsaker, JC. Increased incidence of neurofibrillary tangles (NFT) in non-demented individuals with hypertension. *Journal Of The Neurological Sciences*. 1995; 131 (2): 162-169.
- Steru, L; Chermat, R; Thierry, B; Simon, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 1985; 85 (3): 367-370.
- Strekalova, T; Evans, M; Costa-Nunes, J; Bachurin, S; Yeritsyan, N; Couch, Y, Steinbusch, HM; Eleonore Köhler, S; Lesch, KP; Anthony, DC . Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. *Brain, Behavior, And Immunity*. 2015; 48: 42-47.
- Sugiyama, D; Okamura T; Watanabe, M; Higashiyama, A; Okuda, N; Nakamura, Y; Hozawa, A; Kita, Y; Kadota, A; Murakami, Y; Miyamatsu, N; Okubo, T; Hayakawa, T; Miyamoto, Y; Miura, K; Okayama, A; Ueshima, H. Risk of Hypercholesterolemia for Cardiovascular Disease and the Population Attributable Fraction in a 24-year Japanese Cohort Study. *Journal Of Atherosclerosis And Thrombosis*. 2015; 22 (1): 95-107.
- Sun, J; Yu, J; Tan, L. The Role of Cholesterol Metabolism in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*. 2014; 51 (3): 947-965.
- Takeda, S; Sato, N; Morishita, R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Front Aging Neurosci*. 2014; 6: 171.

Tall, AR.; Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2015; 15 (2): 104-116.

Thirumangalakudi, L; Prakasam, A; Zhang, R; Bimonte-Nelson, H; Sambamurti, K; Kindy, MS; Bhat, NR. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *Journal Of Neurochemistry*. 2008; 106 (1): 475-485.

Tsai, CY; Shiau, AL; Chen, SY; Chen, YH; Cheng, PC; Chang, MY; Chen, DH; Chou, CH; Wang, CR; Wu, CL. et al. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis & Rheumatism*. 2007; 56 (2): 544-554.

Tucsek, Z; Toth, P; Sosnowska, D. Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013; 69(10):1212-1226.

Turkevich J, Stevenson P. Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc*. 1951; 11: 55–60.

Vianna, MR; Alonso, M; Viola, H; Quevedo, J; De Paris, F; Furman, M; De Stein, ML; Medina, JH; Izquierdo, I. Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. *Learning & Memory*. 2000; 7 (5): 333-340.

Wolozin, B; Kellman, W; Ruosseau, P; Celesia, GG; Siegel, G. Decreased Prevalence of Alzheimer Disease Associated With 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Archives of Neurology*. 2000; 57(10):1439–1443.

World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva. 2017. Disponível em:
<<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2018.

World Health Organization. Depression. Geneva. 2018. Disponível em:
<<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>>. Acesso em: 04 out. 2018.

Xiong, H; Callaghan, D; Jones, A; Walker, DG; Lue, LF; Beach, TG; Sue, LI; Woulfe, J; Xu, H; Stanimirovic, DB; Zhang, W. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Aβ production. *Neurobiological Disease*. 2008; 29(3): 422–437.

Zambon, D; Quintana, M; Mata, P; Alonso, R; Benavent, J; Cruz-Sánchez, F; Gich, J; Pocoví, M; Civeira, F; Capurro, S; Bachman, D; Sambamurti, K; Nicholas, J; Pappolla, MA. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. *The American Journal of Medicine*. 2010; 123: 267-274.

ANEXO

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 20/11/2018.

Título do projeto	Efeito do tratamento crônico com nanopartículas de ouro nas alterações comportamentais e neuroquímicas associadas a hipercolesterolemia: um estudo pré-clínico.
Project title	Effect of the gold nanoparticles chronic treatment on behavioral and neurochemical associated to hypercholesterolemia: a preclinical study.
Número do protocolo Protocol number	007/2018-1– adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Jade de Oliveira
Pesquisadores Researchers	Gustavo de Bem Silveira, Rubya Pereira Zacaron, Laura de Roch Casagrande e Carolini Mendes .

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/01/2019 a 15/01/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/Swiss
No de animais	120
Idade/Peso	3 meses (90 dias) / 25-30g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Samira da Silva Valvassori
Samira da Silva Valvassori
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 20 de novembro de 2018.