

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

Sámili Wagner da Silva

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO LDL-COLESTEROL EM
LINHAGEM DE CÉLULAS MICROGLIAIS**

Porto Alegre

2024

Sámili Wagner da Silva

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO LDL-COLESTEROL EM
LINHAGEM DE CÉLULAS MICROGLIAIS**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jade de Oliveira
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil)

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Manuella P. Kaster
(Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil)

Porto Alegre

2024

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

Silva, Sâmili Wagner
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO
LDL-COLESTEROL EM LINHAGEM DE CÉLULAS MICROGLIAIS /
Sâmili Wagner Silva. -- 2024.
74 f.
Orientadora: Jade De Oliviera.

Coorientadora: Manuella Pinto Kaster.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Hipercolesterolemia. 2. Microglia. 3. Gotas
Lipídicas. 4. Fagocitose. 5. Autofagia. I. De
Oliviera, Jade, orient. II. Kaster, Manuella Pinto,
coorient. III. Título.

Sámili Wagner da Silva

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO LDL-COLESTEROL EM
LINHAGEM DE CÉLULAS MICROGLIAIS**

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

Aprovado em: 23 de fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Rachel Krolow Santos Silva Bast - UFRGS

Dr. André Quincozes dos Santos - UFRGS

Dra. Josiane Budni - UNESC

Dra. Jade de Oliveira - UFRGS

*Mãe e Pai, cada conquista minha é por vocês
e para vocês, eu nunca daria o primeiro
passo sem vocês.*

AGRADECIMENTOS

Enfim é chegado o momento de agradecer oficialmente a todos que fizeram parte deste ciclo que se encerra. Se faz fundamental expressar a minha gratidão à minha orientadora Prof. Dra. Jade de Oliveira, por abrir as portas do laboratório para uma química recém-formada do interior do RS e ter tornado real o objetivo que um dia pareceu muito distante. Profe, tu és um exemplo de profissional a ser seguido, contigo aprendi não apenas sobre ciência e pesquisa, mas sobre não desistir dos meus objetivos e buscar aquilo que é o melhor para mim, muito obrigada por todos os ensinamentos e apoio durante o mestrado.

Agradeço ao CNPq, pela bolsa de mestrado e às demais agências de fomento que foram essenciais para a execução deste trabalho. Assim como agradeço aos servidores do departamento de Bioquímica da UFRGS e do programa de pós-graduação, docentes e corpo técnico, por todo o conhecimento, auxílio e estrutura fornecidos, sem os quais não seria possível a execução desta pesquisa. E dentre estes, agradeço em especial à Prof. Dra. Fátima Guma, por todos os ensinamentos que a senhora trouxe para a minha carreira durante a nossa convivência no laboratório 21, pelas discussões científicas que envolviam a todos, e pela disponibilidade a responder todos os meus questionamentos, a levo como um grande exemplo.

É simplesmente impossível expressar a minha gratidão às meninas-mulheres do laboratório 21, a língua portuguesa não tem palavras que carreguem o significado que vocês têm para mim. Jéssica, agradeço por todos os ensinamentos sobre cultura de células, e por todo o acolhimento logo na minha chegada ao laboratório. Hémelin, obrigada por todos os ensinamentos científicos, por todos os puxões de orelha, e por ser minha irmã mais velha na pesquisa. Lílian, obrigada pela disponibilidade para realizar as citometrias, mesmo quando as células esqueciam de comparecer, pelos “tapas na cara” quando eram necessários, e por sempre estar disposta a discutir os meus resultados. Arieli, obrigada pela paciência comigo durante os PCRs infinitos, com dúvidas em horários aleatórios, e reclamações sobre pipetar uma placa de

96. Natália, obrigada por todos os ensinamentos sobre microscopia e ImageJ, e por garantir que as minhas imagens estivessem tratadas da forma correta; e pela companhia quando se fez necessário. A todas e mais, Carol, Re, Leti, Gabizinha, Luisa, obrigada pela convivência no lab, pelo apoio, pelos cafés, pela companhia, pelas conversas e desabafos, vocês todas me tornaram um ser humano melhor, como diria Taylor Swift, “*So, make the friendship bracelets, take the moment and taste it/You've got no reason to be afraid*”.

Eu não poderia deixar de agradecer as minhas ex-ICs, e hoje amigas queridas, as minhas desajustadas, Tai e Sara. Vocês estiveram comigo desde o começo, me apoiaram seja na hora de isolar LDL a fazer buscas intermináveis no PubMed, e obrigada por acreditarem em mim, e sempre estarem prontas para me escutar, vocês trouxeram luz em tempos sombrios. Assim como, as minhas amigas e colegas de apartamento, Fran e Sil, vocês me mostraram que eu conseguia viver longe de casa, garantiram que eu tivesse um lugar para chamar de lar em Porto Alegre, foram minhas companhias em momentos bons e ruins, foram meu suporte sempre que precisei, eu não tenho palavras para agradecer vocês por tudo que fizeram por mim.

E por fim, e com certeza mais importante, eu agradeço aos meus pais, Sueli e Sadi. Mãe e pai, não basta dedicar cada conquista a vocês, eu preciso deixar registrada a minha gratidão por possibilitarem a realização de mais um objetivo. Vocês permitem que eu me dedique a buscar os meus sonhos sem que as intempéries da vida tornem isso impossível, e torcem por mim todos os dias. Desculpa pelas preocupações e noites mal dormidas que restavam a vocês cada vez que eu entrava no ônibus chorando de saudades sem nem ter deixado a rodoviária. Tem uma música que diz “*Eu agradeço tuas orações por mim/Foi só por elas que eu cheguei tão longe assim/Sou resultado das tuas orações.*” e essa é a verdade, sem vocês eu não chegaria aqui, minha gratidão e amor eternos.

APRESENTAÇÃO

PARTE I

Introdução contendo uma breve revisão da literatura que fundamenta este trabalho.

Justificativa.

Objetivos do presente trabalho.

PARTE II

Materiais e métodos.

Resultados.

PARTE III

Discussão.

Conclusão e perspectivas.

REFERÊNCIAS

Referências bibliográficas citadas nas partes I, II e III.

SUMÁRIO

PARTE I	13
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. HIPERCOLESTEROLEMIA E O DESENVOLVIMENTO DE ATROSCLEROSE.	17
1.2. HIPERCOLESTEROLEMIA COMO FATOR DE RISCO PARA DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	18
1.3. HIPERCOLESTEROLEMIA CAUSA DISFUNÇÃO DA BHE E NEUROINFLAMAÇÃO.....	23
1.4. MICROGLIAS COMO CÉLULAS-ALVO DA HIPERCOLESTEROLEMIA	25
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
PARTE II	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. ISOLAMENTO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL)	34
4.2. CULTURA DE CÉLULAS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	34
4.3. VIABILIDADE CELULAR	35
4.4. DENSIDADE CELULAR	36
4.5. ENSAIO DE ADIPORED™.....	36
4.6. QUANTIFICAÇÃO DE LISOSSOMOS.....	37
4.7. ENSAIO DO LARANJA DE ACRIDINA	38
4.8. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS.....	38
4.9. EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	39
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5. RESULTADOS	41

5.1. A LDL AFETA PARÂMETROS BÁSICOS DAS CÉLULAS MICROGLIAIS?	41
5.2. EFEITOS DA LDL NOS FOSFOLÍPIDIOS DE MEMBRANA E NO ACÚMULO DE GOTAS LIPÍDICAS EM CÉLULAS BV-2.....	43
5.3. EFEITO DA LDL NOS PROCESSOS DE ENDOCITOSE E DE AUTOFAGIA EM CÉLULAS BV-2	46
5.4. A LDL NÃO AFETA A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM CÉLULAS BV-2.....	48
5.5. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA EXPOSIÇÃO À LDL NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS BV-2.....	50
PARTE III.....	52
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES	62
8. PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA — Acetil-coenzima A

AO — Laranja de Acridina (do inglês, *Acridine Orange*)

ApoB-100 — Apolipoproteína B-100

ApoE — Apolipoproteína E

ApoE^{-/-} — Nocaute para apolipoproteína E (do inglês, *Apolipoprotein E knockout*)

AR — AdipoRed™

ARM — Microglia de resposta ativada (do inglês, *Activated response microglia*)

AVO — Organela vesicular ácida (do inglês, *Acidic Vesicular Organelle*)

A β — Peptídeo β -amiloide

BHE — Barreira hematoencefálica

DA — Doença de Alzheimer

DAM — Microglia associada à doença (do inglês, *Disease-Associated Microglia*)

DMEM — Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DP — Doença de Parkinson

EDTA — Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ER — Espécie Reativa

HBSS — Solução balanceada de Hanks (do inglês, *Hanks' Balanced Salt Solution*)

HF — Hipercolesterolemia Familiar

IL-1 β — Interleucina 1 β

IL-6 — Interleucina 6

LDAM — Microglia acumuladora de gotas lipídicas (do inglês, *Lipid-droplet-accumulating microglia*)

LDL — Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density Lipoprotein*)

LDLr — Receptor da lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density Lipoprotein Receptor*)

- LDLr^{-/-} — Nocaute para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density Lipoprotein Receptor Knockout*)
- LOX-1 — Receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada (do inglês, *Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1*)
- LPL — Lipoproteína Lipase
- LPS — Lipopolissacarídeo
- LRP8 — Proteína 8 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density lipoprotein receptor-related protein 8*)
- MGnD — Fenótipo neurodegenerativo microglial (do inglês, *Microglial neurodegenerative phenotype*)
- MTT — Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
- nLDL — Lipoproteína de baixa densidade nativa (do inglês, *Native Low-density Lipoprotein*)
- NR — Vermelho Neutro (do inglês, *Neutral Red*)
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- oxLDL — Lipoproteína de baixa densidade oxidada (do inglês, *Oxidized Low-density Lipoprotein*)
- PBS — Tampão fosfato-salino (do inglês, *Phosphate buffered saline*)
- PFA — Paraformaldeído
- SN — Substância negra
- SNC — Sistema Nervoso Central
- SRB — Sulforodamina B
- TLR — Receptor do tipo Toll 4 (do inglês, *Toll-like receptor 4*)
- TNF α — Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*)
- TREM2 — Receptor desencadeado expresso nas células mielóides 2 (do inglês, *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*)
- WT — Selvagem (do inglês, *wild-type*)

PARTE I

RESUMO

Hipercolesterolemia é uma disfunção metabólica caracterizada por níveis elevados de colesterol, associado à Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), na corrente sanguínea. Essa condição afeta mais de 40% da população mundial e é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares. Nos últimos 30 anos, a hipercolesterolemia tem sido associada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, sendo observados danos a barreira hematoencefálica (BHE) e a presença de elementos periféricos no sistema nervoso central de indivíduos hipercolesterolêmicos. Frente ao aumento da permeabilidade da BHE, as células microgliais, responsáveis pela manutenção da homeostase cerebral, podem alterar sua atividade e morfologia, adequando sua resposta, de modo a proteger as demais células dos elementos extravasados da periferia. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar, *in vitro*, as alterações induzidas em resposta ao excesso de LDL em microglias. Para tanto, foi empregada a linhagem BV-2 de células microgliais murinas, as quais foram expostas ao LDL-colesterol nas concentrações de 50, 100 ou 300 µg/mL ou PBS (controle), por um período de 24 horas. Na sequência foram realizados os ensaios para avaliar viabilidade, densidade celular, acúmulo de gotas lipídicas, quantidade de lisossomos, alterações na autofagia, receptores envolvidos na endocitose da LDL e resposta inflamatória. As células BV-2 expostas à LDL, principalmente na maior concentração testada, apresentaram acúmulo de gotas lipídicas, o que foi associado a alterações no processo de digestão celular, sem que houvesse modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e geração de espécies reativas. Além disso, a exposição à LDL modificou a expressão gênica do receptor de LDL, mas não de receptores relacionados à captação de LDL oxidada ou mediadores inflamatórios. Em suma, as células BV-2 conseguem endocitar a LDL, porém, o excesso acaba por se acumular internamente na forma de gotas lipídicas, o que pode estar associado às alterações no processo de endocitose e no processo de autofagia, sendo um indício de disfunção celular *in vitro*. Indicando que células microgliais quando expostas a um excesso de LDL-colesterol podem apresentar um estado menos responsivo e funcional, o que estaria associado a um maior risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas em pacientes hipercolesterolêmicos.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia; Microglia; Gotas Lipídicas; Fagocitose; Autofagia.

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is a metabolic dysfunction characterized by high levels of cholesterol associated with low-density lipoprotein (LDL) in the bloodstream. This condition affects more than 40% of the world's population and is the main risk factor for cardiovascular diseases. Over the last 30 years, hypercholesterolemia has been associated with the development of neurodegenerative diseases, damage to the blood-brain barrier (BBB), and the presence of peripheral elements in the central nervous system of hypercholesterolemic individuals. Faced with increased permeability of the BBB, microglial cells, responsible for maintaining brain homeostasis, can change their activity and morphology, and adapt their response to protect other cells from elements extravasated from the periphery. Thus, the objective of this work was to investigate, *in vitro*, the changes induced in response to excess LDL in microglia. To this end, the BV-2 line of murine microglial cells was used, which were exposed to LDL-cholesterol at concentrations of 50, 100 or 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or PBS (control), for a period of 24 hours. Next, assays were carried out to evaluate viability, cell density, accumulation of lipid droplets, number of lysosomes, changes in autophagy, receptors involved in LDL endocytosis, and the inflammatory response. BV-2 cells exposed to LDL, especially at the highest concentration tested, showed accumulation of lipid droplets, which was associated with changes in the cellular digestion process without modulating the production of pro-inflammatory cytokines and generation of reactive species. Furthermore, exposure to LDL modified the gene expression of the LDL receptor, but not of receptors related to the uptake of oxidized LDL or inflammatory mediators. In short, BV-2 cells are able to endocytose LDL; however, the excess ends up accumulating internally in the form of lipid droplets, which may be associated with changes in the endocytosis and autophagy processes, indicating dysfunction of cells *in vitro*. Indicating that microglial cells when exposed to an excess of LDL-cholesterol may present a less responsive and functional state, which would be associated with a greater risk of developing neurodegenerative diseases in hypercholesterolemic patients.

Keywords: Hypercholesterolemia; Microglia; Lipid Droplets; Phagocytosis; Autophagy.

1. INTRODUÇÃO

O (3 β)-cholest-5-en-3-ol, ou, simplesmente, colesterol é um álcool policíclico insaturado (Nelson; Cox; Hoskins, 2022). Quanto a sua classificação bioquímica, é um lipídeo pertencente à família dos compostos esteroides, sendo essencial para a manutenção de toda a vida animal (Nelson; Cox; Hoskins, 2022). O colesterol é de suma importância para o funcionamento normal do organismo, já que é um constituinte das membranas celulares, da bainha de mielina, é precursor nos processos de síntese de ácidos biliares e de hormônios esteroides, além de apresentar papéis em processos de proliferação e sinalização celular (Dowhan; Bogdanov; Mileykovskaya, 2016; Goedeke; Fernández-Hernando, 2012; Tabas, 2002; Vance, 2012).

O processo de síntese endógena do colesterol ocorre a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) por meio de quatro etapas compostas por inúmeras reações enzimáticas que, nos mamíferos, acontecem majoritariamente no fígado (Brown; Sharpe, 2016; Martín; Pfrieger; Dotti, 2014; Vance, 2012). Uma vez que o colesterol apresenta uma característica mais apolar, em especial quando está esterificado a um ácido graxo, seu transporte pela corrente sanguínea, do tecido de origem ao tecido em que será utilizado, é mediado pelas lipoproteínas plasmáticas (Feingold, 2000; Nelson; Cox; Hoskins, 2022). As lipoproteínas são complexos esféricos, que contém uma porção hidrofóbica formada por lipídeos (colesterol e triglicerídeos) e uma porção hidrofílica (apolipoproteínas, fosfolipídeos e colesterol livre). A porção hidrofóbica concentra-se no centro, enquanto a porção hidrofílica encontra-se na superfície (Nelson; Cox; Hoskins, 2022; Schneider, 2016).

A principal lipoproteína transportadora de colesterol no plasma é a lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low-density Lipoprotein*, LDL), a qual é rica em ésteres de colesterol e colesterol no seu núcleo, e contém principalmente a apolipoproteína B-100 (apoB-100) em sua superfície (Feingold, 2000; Schneider, 2016). A captação da LDL pelas

células ocorre via endocitose mediada por receptor, processo no qual a apoB-100 é reconhecida por receptores de LDL (LDLr) presentes na membrana plasmática de tecidos como músculo, adiposo e glândulas adrenais (Feingold, 2000; Nelson; Cox; Hoskins, 2022; Schneider, 2016). A LDL que não é captada pelos tecidos extra-hepáticos retorna ao fígado, onde é reconhecida pelos LDLr dos hepatócitos (Feingold, 2000; Nelson; Cox; Hoskins, 2022; Schneider, 2016). Assim, a LDL, assim como as moléculas envolvidas em seu metabolismo, são cruciais para a homeostase do colesterol (Schneider, 2016; Vance, 2012).

Apesar de ser fundamental para o organismo, o colesterol e, mais especificamente, o colesterol presente na LDL é popularmente conhecido como um vilão para a saúde. Esse fato se deve a correlação entre disfunções no metabolismo de colesterol com o desenvolvimento de doenças, como a hipercolesterolemia (Sugiyama *et al.*, 2015).

1.1. HIPERCOLESTEROLEMIA E O DESENVOLVIMENTO DE ATEROSCLEROSE

A hipercolesterolemia é caracterizada por níveis de colesterol superiores a 200 mg/dL e possui elevada prevalência (Faludi *et al.*, 2017). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008 cerca de 39% da população mundial apresentava essa condição (World Health Organization, 2012). Atualmente sabe-se que os elevados níveis séricos de colesterol estão associados a um terço de todas as doenças cardíacas, com elevadas taxas de mortalidade (Benjamin *et al.*, 2019; World Health Organization, 2012).

A hipercolesterolemia pode ser uma condição adquirida, causada por uma alimentação rica em lipídeos e um estilo de vida sedentário, ou ter origem genética, como a Hipercolesterolemia Familiar (HF). Nesse caso, os altos níveis de LDL plasmática se devem, em particular, às mutações no LDLr, o que diminui sua captação e endocitose pelos tecidos (Benito-Vicente *et al.*, 2018). Ademais, uma vez que não há regulação da via, por meio da retroalimentação negativa sinalizada pelos LDLr, ocorre um estímulo da síntese do colesterol pelo fígado, levando seu acúmulo no plasma (Brown; Goldstein, 1984; Catar *et al.*, 2022).

Independente da origem, na hipercolesterolemia a LDL se mantém circulante no plasma por um tempo maior do que o esperado, o que pode resultar na sua oxidação por espécies reativas (ER). Como consequência, essa LDL oxidada (oxLDL) é reconhecida por outros receptores, como os presentes nos macrófagos periféricos (sequestradores - do inglês, *scavenger*) e o próprio receptor de oxLDL (LOX-1). Uma vez que não há mais uma retroalimentação negativa para regular a captação dessa oxLDL, os macrófagos acumulam lipídeos e colesterol e transformam-se em células espumosas (Huff; Daugherty; Lu, 2016). O acúmulo de células espumosas dentre outros processos está diretamente relacionado com a formação de estrias gordurosas e na sequência com a formação das placas ateroscleróticas nas paredes dos vasos sanguíneos. Esta condição é conhecida como aterosclerose, a qual é uma das principais causas de doenças cardiovasculares e consequentemente de morte da atualidade (Catar *et al.*, 2022; Huff; Daugherty; Lu, 2016; World Health Organization, 2012).

Além disso, a presença da oxLDL leva ao aumento da produção intracelular de ER nas células endoteliais (Cominacini *et al.*, 2000). Como consequência, ocorre a translocação do fator de transcrição NF- κ B, o que resulta na ativação de diferentes vias de inflamação (Cominacini *et al.*, 2000). Uma vez que pacientes hipercolesterolêmicos apresentam elevadas concentrações de LDL plasmática por um longo período, essa situação de inflamação pode se tornar crônica (Yvan-Charvet; Ivanov, 2020).

1.2. HIPERCOLESTEROLEMIA COMO FATOR DE RISCO PARA DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Apesar do metabolismo de colesterol no sistema nervoso central (SNC) ser independente do sistema periférico e, em condições normais, a barreira hematoencefálica (BHE) não permitir que lipoproteínas periféricas extravasem para o SNC; a hipercolesterolemia já foi relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA) (Alrouji *et al.*, 2023; Björkhem; Leoni; Meaney, 2010; Martín; Pfrieger; Dotti,

2014; Vance, 2012). A DA é o distúrbio neurodegenerativo progressivo mais comum, sendo caracterizada pelo declínio cognitivo e perda de memória no final da vida (Pappolla *et al.*, 2002; Vance, 2012). Indivíduos com DA apresentam depósitos extracelulares de placas β -amiloides ($A\beta$), assim como emaranhados intracelulares de tau hiperfosforilada e extensa perda sináptica e neuronal (Murphy; LeVine, 2010; Pappolla *et al.*, 2002; Vance, 2012).

Apesar da sua elevada prevalência, a DA ainda não tem sua patogênese completamente elucidada, sendo a hipótese da cascata amilóide o modelo mais empregado para explicar a progressão da doença (De Oliveira *et al.*, 2021; Hardy; Higgins, 1992; Leng; Edison, 2021; Selkoe; Hardy, 2016). No entanto, a descoberta da presença de níveis elevados de marcadores inflamatórios no cérebro de pacientes, levanta a neuroinflamação e alterações nas células microgliais como importantes eventos da patogênese da doença (Calsolaro; Edison, 2016; De Oliveira *et al.*, 2021; Dursun *et al.*, 2015; Heneka *et al.*, 2015; Jack *et al.*, 2013; Leng; Edison, 2021; Obulesu; Jhansilakshmi, 2014; Rohn, 2013; Swardfager *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Além disso, acredita-se que fatores como idade, predisposição genética, ambiente, estilo de vida e hábitos alimentares influenciam diretamente no desenvolvimento da doença (Holtzman; John; Goate, 2011; Maciejewska; Czarnecka; Szymański, 2021).

Nesse sentido, a primeira associação entre níveis elevados de colesterol e a DA foi apresentada por Sparks e colaboradores (1990) em um estudo utilizando amostras *post-mortem*, no qual os autores observaram que indivíduos com doença arterial coronariana grave apresentavam um acúmulo de placas $A\beta$, idênticas às presentes na DA. A doença arterial coronariana é uma das doenças cardiovasculares mais relacionadas ao desenvolvimento de aterosclerose e hipercolesterolemia. O mesmo grupo de pesquisa observou que coelhos submetidos a uma dieta rica em colesterol apresentaram esse mesmo acúmulo de placas, no hipocampo e no córtex adjacente (Sparks *et al.*, 1994). Na sequência, os autores correlacionaram os elevados níveis de colesterol com aumento, acelerado e exacerbado, da

reatividade microglial em humanos com doença cardíaca e em coelhos expostos a dieta rica em colesterol, que apresentaram, além do acúmulo de placas A β , o aumento da reatividade microglial (Streit; Sparks, 1997).

Concordando com resultados em coelhos, Refolo e colaboradores (2000) demonstraram que camundongos modelos de DA (geneticamente modificados para produzirem mais placas A β) apresentavam um aumento significativo no acúmulo das placas no SNC quando expostos a uma dieta hipercolesterolêmica, evidenciando uma forte correlação com os níveis elevados de colesterol. Corroborando com experimentos em modelos animais e *post-mortem*, um estudo longitudinal com seres humanos demonstrou que a incidência da hipercolesterolemia durante a meia-idade aumenta o risco para o desenvolvimento de DA em idosos de ambos os sexos (Kivipelto *et al.*, 2001)

Uma vez estabelecida essa correlação, diferentes abordagens tentaram elucidar possíveis mecanismos que explicassem esta influência da hipercolesterolemia no cérebro. Considerando a permeabilidade seletiva da BHE, foram realizados estudos empregando oxisteróis, como o 27-hidroxicolesterol (27OHC) e o 24S-hidroxicolesterol (24OHC), os quais são metabólitos oxidados de colesterol capazes de permear a barreira (Ghribi, 2008; Heverin *et al.*, 2005). O 27OHC foi relacionado com o aumento da geração de peptídeos A β em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Prasanthi *et al.*, 2009), em células epiteliais da retina ARPE-19 (Dasari *et al.*, 2010) e no hipocampo de coelhos (Sharma *et al.*, 2008), resultando em estresse oxidativo, geração de ER e inflamação.

Outra perspectiva empregada para investigar essa questão, foi a utilização de modelos experimentais geneticamente modificados, como os camundongos nocaute para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), modelo para estudos sobre hipercolesterolemia. Estudos utilizando esses animais demonstraram que a exposição crônica a uma dieta rica em colesterol causa um aumento de reatividade de células da glia, levando a processos inflamatórios e aumentando a

expressão dos mediadores de inflamação interleucina-6 (IL-6) e caspase 1 (Crisby *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2005). A ApoE é a principal apolipoproteína presente no SNC, envolvida no transporte do colesterol sintetizado, majoritariamente, pelos astrócitos para as demais células do SNC e na homeostase da via metabólica (Björkhem; Leoni; Meaney, 2010; Vance, 2012). O alelo $\epsilon 4$ da apoE está intrinsecamente ligado com o desenvolvimento da DA, uma vez que possui alta afinidade com a A β , e é essencial para formação das placas fibrilares de amilóide, além de estar correlacionado com o aumento do colesterol plasmático e do risco de desenvolvimento de aterosclerose (Burns *et al.*, 2003; Ghribi, 2008; Kuo *et al.*, 1998).

Além disso, os camundongos nocaute para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, vêm sendo frequentemente utilizados para estudar a correlação entre hipercolesterolemia e neurodegeneração. Thirumangalakudi e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos *wild-type* (WT) submetidos a dieta aterogênica apresentaram a indução de uma resposta neuroinflamatória, caracterizada pela ativação das células gliais e aumento da expressão de citocinas e mediadores inflamatórios. Os autores observaram que camundongos LDLr^{-/-}, submetidos a dieta padrão, também parecem apresentar ativação glial e aumento da expressão de marcadores de inflamação, o que era exacerbado quando submetidos a dieta hipercolesterolêmica (Thirumangalakudi *et al.*, 2008).

Por conseguinte, Ullrich e colaboradores (2010) demonstraram que ratos expostos à dieta hipercolesterolêmica por 5 meses apresentaram redução do número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert e no nível de acetilcolina cortical, indicando disfunção do sistema colinérgico, além de aumento do processo inflamatório, de tau fosforilada e dos níveis de A β , e de déficit severo nos testes de aprendizagem espacial e memória de longo prazo. Também foi observado o aumento dos níveis de A β , de fosforilação da tau e de estresse oxidativo no hipocampo, com geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), redução da

glutationa (GSH) e aumento dos níveis de isoprostano em coelhos submetidos a uma dieta enriquecida com 2% de colesterol (Prasanthi *et al.*, 2010).

Corroborando com os resultados já citados, camundongos LDLr^{-/-} apresentaram déficits de aprendizagem e de memória, em comparação com animais WT controle, e quando submetidos a dieta hipercolesterolêmica por 4 semanas, foi observada a diminuição da função mitocondrial no córtex e depleção da GSH, com alterações nas enzimas glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR), mas sem alterar os resultados dos testes comportamentais (De Oliveira *et al.*, 2011). Resultados concordantes foram observados em camundongos LDLr^{-/-} de 14 meses que apresentaram aumento de peroxidação lipídica, do metabolismo de GSH e da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex, além de redução da sinalização colinérgica, desbalanço antioxidante, dano oxidativo e déficits cognitivos (Moreira *et al.*, 2012). O aumento da atividade da AChE no córtex pré-frontal e no hipocampo foi associado com prejuízos de aprendizado e memória em camundongos *Swiss* expostos a uma dieta rica em colesterol por oito semanas (Moreira *et al.*, 2014). Os mesmos autores observaram que células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) expostas a LDL-colesterol nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por 24 horas apresentaram aumento dependente de concentração da atividade da AChE (Moreira *et al.*, 2014).

Mais recente, foi estabelecida a correlação entre a hipercolesterolemia e o desenvolvimento da Doença de Parkinson (DP) (Alrouji *et al.*, 2023; Paul; Choudhury; Borah, 2015). A DP é o distúrbio do movimento neurodegenerativo mais comum, e ocorre devido a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN), que leva a redução dos níveis de dopamina no estriado (Alrouji *et al.*, 2023; Paul; Choudhury; Borah, 2015). Outra característica é a formação de agregados de α -sinucleína e presença de corpos de Lewy, além das alterações comportamentais motoras, como tremor, rigidez, instabilidade postural e bradicinesia (Alrouji *et al.*, 2023; Paul; Choudhury; Borah, 2015).

Dessa forma, Paul e colaboradores (2017a) relataram que camundongos modelo de DP quando submetidos a uma dieta rica em colesterol apresentaram piora no comportamento motor parkinsoniano, aumento da redução de dopamina no estriado e de neurônios dopaminérgicos na SN, além de redução da atividade de complexos mitocondriais (I e III) e aumento do estresse oxidativo na via nigroestriatal. Os já citados oxisteróis são indutores da agregação da proteína α -sinucleína, resultando em apoptose de células dopaminérgicas. Coelhos alimentados por 12 semanas com dieta enriquecida com colesterol apresentaram aumento da imunorreatividade da α -sinucleína e uma pronunciada rigidez muscular (Marwarha; Ghribi, 2015). Camundongos expostos a dieta rica em colesterol por 12 semanas apresentaram redução de dopamina e dano aos neurônios dopaminérgicos no estriado e redução de serotonina no córtex, além de déficit motor e comportamento tipo depressivo (Paul *et al.*, 2017b).

1.3. HIPERCOLESTEROLEMIA CAUSA DISFUNÇÃO DA BHE E NEUROINFLAMAÇÃO

Apesar do considerado privilégio imunológico do SNC, estudos demonstraram que a exposição a níveis elevados de colesterol plasmático altera a permeabilidade da BHE (Chen *et al.*, 2010; De Oliveira *et al.*, 2020; Löffler *et al.*, 2013; Pirchl *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2023). O rompimento da integridade da BHE é extremamente prejudicial para a manutenção da homeostase cerebral e da função neuronal, uma vez que pode permitir a passagem de elementos da periferia para o SNC. Nesse sentido, Chen e colaboradores (2010) observaram que coelhos expostos a dieta rica em colesterol apresentaram acúmulo de colesterol, contendo ApoB, nos endolisossomos de neurônios do bulbo olfatório, além de um aumento no número e tamanho dessa organela, e alterações na função. Corroborando com esses resultados, Löffler e colegas (2013) observaram acúmulo e extravasamento de ApoB-100 em vasos cerebrais de camundongos hipercolesterolêmicos. Considerando que a ApoB-100 é uma apolipoproteína

periférica, sua presença no cérebro ocorre quando há aumento de permeabilidade da BHE (Löffler *et al.*, 2013).

Na sequência, Kuo e colaboradores (2015) demonstraram que camundongos expostos a dieta rica em colesterol apresentavam uma correlação positiva entre as concentrações de colesterol no soro e no cérebro. Enquanto Paul e Borah (2017), empregando o corante Evans Blue (EBD) para avaliar a permeabilidade da BHE, demonstraram que camundongos expostos por 12 semanas a dieta rica em colesterol apresentaram um maior extravasamento de EBD para o cérebro, indicando disfunção da BHE. Corroborando com os resultados já mencionados, De Oliveira e colaboradores (2020) observaram que a hipercolesterolemia moderada, induzida por dieta rica em colesterol, causava dano na BHE em camundongos WT observado pelo extravasamento da fluoresceína sódica no hipocampo e no córtex pré-frontal. O mesmo trabalho também observou essa mesma disfunção da barreira acontecia em camundongos LDLr^{-/-} submetidos a dieta padrão, e era exacerbada quando esses animais eram alimentados com dieta rica em colesterol (De Oliveira *et al.*, 2020).

Considerando que a hipercolesterolemia induz disfunção da BHE, uma consequência direta é o extravasamento de elementos da periferia para o SNC, causando o aumento do processo inflamatório no cérebro (Hussain; Fang; Chang, 2021; Rudge, 2022). Cabe destacar que o processo neuroinflamatório é um evento primordial na fisiopatologia de diferentes doenças neurodegenerativas, e parece ser um ponto de correlação entre a hipercolesterolemia e a neurodegeneração (De Oliveira; Moreira; de Bem, 2024; Guzman-Martinez *et al.*, 2019; Perry; Newman; Cunningham, 2003; Pirchl *et al.*, 2012; Ullrich; Pirchl; Humpel, 2010). Nesse sentido, estudos utilizando modelos experimentais de hipercolesterolemia observaram o aumento de reatividade das células gliais, da expressão de citocinas e mediadores inflamatórios, desencadeando processos inflamatórios que precedem as alterações cerebrais em regiões afetadas pela DA e DP (Crisby *et al.*, 2004; de Oliveira *et al.*, 2014; De Oliveira *et al.*, 2020;

Rahman *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2021; Thirumangalakudi *et al.*, 2008; Ullrich; Pirchl; Humpel, 2010; Xue; Sparks; Streit, 2007).

A inflamação aguda é uma defesa bem estabelecida contra lesões, infecções e toxinas, sendo um processo essencial para a sobrevivência. Todavia, quando ocorre um desequilíbrio da sinalização pró e anti-inflamatória, há uma resposta inadequada, a qual pode desencadear um processo inflamatório crônico, que acaba por exacerbar os efeitos deletérios de muitas doenças (Perry; Newman; Cunningham, 2003; Rapp *et al.*, 2008). Apesar de não serem sinônimos, o processo neuroinflamatório está intimamente relacionado com o aumento da reatividade de células gliais (Graeber *et al.*, 2011). O mais recente trabalho do nosso grupo de pesquisa demonstrou que camundongos LDLr^{-/-} além de apresentarem disfunção da BHE, dano cognitivo e disfunção cerebral, apresentam aumento de microgliose já aos três meses de idade, o que é exacerbado com o envelhecimento e acompanhado de alterações morfológicas dessas células, condições características de doenças neurodegenerativas (Rodrigues *et al.*, 2023).

1.4. MICROGLIAS COMO CÉLULAS-ALVO DA HIPERCOLESTEROLEMIA

As células microgliais foram descobertas em 1919 pelo pesquisador espanhol Pío Río-Hortega que desenvolveu um novo método de coloração de tecidos empregando carbonato de prata, tornando possível a caracterização de um novo tipo celular, que apresentava um pequeno soma e algumas ramificações (Boullerne; Feinstein, 2020; Del Río-Hortega Bereciartu, 2020; Sierra *et al.*, 2016; Tremblay *et al.*, 2015). Treze anos depois, em 1932, Río-Hortega escreveu a primeira revisão sobre essas células, que foi atualizada somente em 1988 pelo grupo do alemão Georg Kreutzberg, mesmo grupo que organizou a primeira conferência dedicada a micróglia, em 1992 (Sierra; Paolicelli; Kettenmann, 2019).

Uma característica importante sobre estas células é que elas nunca estão em repouso. As células microgliais são os macrófagos residentes do SNC e são responsáveis pela manutenção

da homeostase cerebral, respondendo a qualquer alteração no ambiente, mesmo em condições fisiológicas normais (Nimmerjahn; Kirchhoff; Helmchen, 2005). Há relatos de que pacientes com redução na quantidade de micróglia apresentam comprometimento cognitivo e motor progressivos, demência e morte precoce (Chitu; Gökhan; Stanley, 2022). Essas células estão continuamente ativas e adaptam suas funções a depender da sua localização e da interação com células e estruturas próximas, influenciando diferentes processos biológicos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). A morfologia, estrutura e perfil molecular destas células também são incrivelmente dinâmicos e maleáveis, resultando em diversos estados (Graeber; Li; Rodriguez, 2011).



Figura 1 Diferentes propriedades e funções das células microgliais. Vigilância, fagocitose e sinalização, por meio da liberação de fatores solúveis, são propriedades essenciais das células microgliais, e é por meio dessas que essas células contribuem para diversos processos biológicos essenciais, desde a inflamação até o reparo de tecidos. Adaptado de Paolicelli *et al.*, 2022.

Nesse sentido, Paolicelli e colaboradores (2022) trouxeram uma ampla revisão acerca dos diferentes fenótipos que a micróglia pode assumir. É um consenso que essas células existem, e coexistem, em diversos estados, sendo extremamente dinâmicas e capazes de adaptação às condições a que são submetidas (Paolicelli *et al.*, 2022). Definições como estado de repouso e estado ativado, ou M0 estado basal, M1 ativação pró-inflamatória e M2 ativação anti-inflamatória, são limitantes e não agregam em discussões sobre essas células. Atualmente, se torna mais interessante falar sobre as microglias abordando os contextos em que essas células respondem e características que adquirem, como micróglia associada a doenças (DAMs) (Keren-Shaul *et al.*, 2017), fenótipo neurodegenerativo microglial (MGnD) (Krasemann *et al.*, 2017), micróglia de resposta ativada (ARMs) (Sala Frigerio *et al.*, 2019), micróglia acumuladora de gotas lipídicas (LDAMs) (Marschallinger *et al.*, 2020), entre outros, a depender de sua assinatura molecular. Cabe ressaltar que avaliar simplesmente marcadores de identidade celular, ou características morfológicas de forma isolada, não fornece informações sobre o estado funcional, uma vez que mais de um estado pode coexistir, ou ainda que a micróglia ramificada pode apresentar função fagocítica, enquanto a micróglia ameboide pode apresentar redução da fagocitose em condições de doença (Paolicelli *et al.*, 2022).

As microglias são as células que possuem a maior mobilidade no SNC, monitorando constantemente o parênquima cerebral. Assim, ao ocorrer uma ruptura da BHE, as microgliais rapidamente agem para evitar um insulto ao SNC, sendo a primeira linha de defesa contra possíveis invasores (Nimmerjahn; Kirchhoff; Helmchen, 2005; Rapp *et al.*, 2008). Dessa forma, é relevante compreender o impacto do excesso de colesterol, característico da hipercolesterolemia, nessas células. Nesse sentido, cabe destacar que, o metabolismo lipídico é extremamente regulado em células microgliais durante o desenvolvimento, o dano e a doença. Microglias envelhecidas apresentam perda da habilidade de manutenção do efluxo de

colesterol, resultado no acúmulo do excesso de colesterol, atingindo um estado menos responsivo (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2018).

Apesar de um estado microglial menos responsivo, ou em repouso, ser considerado mais homeostático, quando ele ocorre em um contexto de doença, é um estado menos eficaz na resposta a danos ou sinais patológicos. E uma célula microglial menos capaz de responder ao ambiente, pode levar a disfunções no SNC e progressão de doenças (Mosher; Wyss-Coray, 2014). Outro ponto importante é a consequência do acúmulo de colesterol na forma de gotas lipídicas em células microgliais. Esse acúmulo é característico das células LDAM, e está associado com déficits de fagocitose, aumento da produção de EROs e de citocinas pró-inflamatórias, e este estado microglial está intimamente ligado à patogênese e progressão de doenças neuroinflamatórias (Khatchadourian *et al.*, 2012; Marschallinger *et al.*, 2020). Outro estado microglial importante é conhecido como DAM, essas células microgliais são altamente fagocíticas e protetivas, e tem suas funções reguladas por genes associados com o metabolismo de lipídios e lipoproteínas, como apoE, lipoproteína lipase (LPL) e receptor desencadeado expresso nas células mielóides 2 (TREM2) (Keren-Shaul *et al.*, 2017).

Assim, compreender qual o impacto direto da LDL extravasada do sistema periférico para o SNC nas células microgliais pode fornecer informações valiosas sobre o porquê de a hipercolesterolemia na meia-idade estar relacionada com um maior risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas durante o envelhecimento. Para tanto, o estudo *in vitro* é uma ferramenta bastante útil, pois possibilita a avaliação do impacto direto em uma célula específica, de modo a identificar e caracterizar mecanismos envolvidos na toxicidade de um composto (Polazzi; Monti, 2010).

Uma linhagem celular bastante utilizada para avaliar a função microglial são as células BV-2, que tem sua origem na década de 1990 na Itália (Blasi *et al.*, 1990; Bocchini *et al.*, 1992). Desde então vêm sendo empregadas em estudos funcionais *in vitro* devido a sua similaridade

de comportamento com a cultura primária de micróglia, no que diz respeito a produção de citocinas, vias de sinalização, fagocitose, produção de nitrito, apesar de ser mais resistente aos estímulos (Henn *et al.*, 2009).

As células BV-2 foram empregadas por Marschallinger e colaboradores (2020) para caracterizar o estado LDAM, com resultados concordantes aos observados *in vivo*. Enquanto Loving e colaboradores (2021) realizaram o silenciamento da expressão de LPL nas células BV-2 para caracterizar o papel da LPL no acúmulo das gotas lipídicas em células microgliais. Essas células também foram empregadas por Chausse e colaboradores (2019), que caracterizaram distintos padrões de reatividade microglial induzidos por oleato ou palmitato. Já Yu e colaboradores (2017) empregaram as células BV-2 para um estudo avaliando o impacto da fração mais eletronegativa da LDL, denominada L5, caracterizando resposta inflamatória desencadeada, vias de sinalização e receptores envolvidos na modulação das vias. Todos esses estudos demonstram a aplicabilidade das células BV-2 para estudos envolvendo o metabolismo lipídico.

Tendo em vista o acima exposto, nós hipotetizamos que em situações que levam ao dano da BHE, tais como a hipercolesterolemia, a LDL poderia extravasar para o SNC e entrar em contato direto com as células gliais e neurônios (Figura 2). Nesse sentido, neste trabalho será avaliado qual o impacto da exposição à LDL nas microglia BV-2 *in vitro*, com ênfase nos processos de autofagia e fagocitose, essenciais para o funcionamento adequado dessas células.

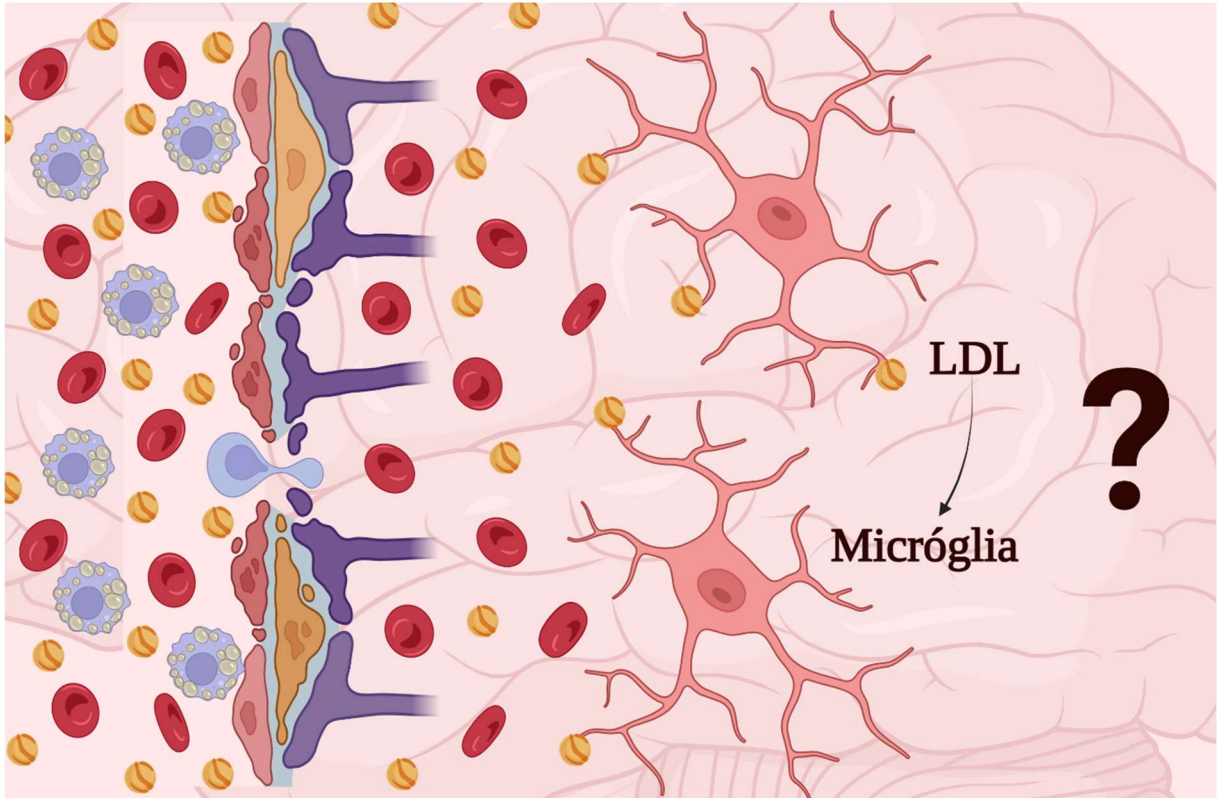


Figura 2 Esquema ilustrativo da hipótese experimental. Nossa hipótese parte do princípio de que a hipercolesterolemia induz disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e uma consequência direta é o extravasamento de elementos da periferia para o sistema nervoso central (SNC). Assim, compreender qual o impacto direto da lipoproteína de baixa densidade (LDL) extravasada do sistema periférico para o SNC nas células microgliais pode fornecer informações valiosas sobre o porquê de a hipercolesterolemia estar relacionada com um maior risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. *Fonte: autoral.*

2. JUSTIFICATIVA

A elevada prevalência da hipercolesterolemia a nível mundial, associada com a rotina da sociedade industrializada e com o aumento da expectativa de vida da população, torna fundamental a compreensão do impacto da hipercolesterolemia no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Nesse contexto, a neuroinflamação, assim como alterações na função microglial, parecem ser eventos chave da relação entre a hipercolesterolemia e as alterações cerebrais.

Além disso, em condições em que há disfunção da BHE elementos presentes na periferia podem extravasar para o SNC, dentre eles a LDL. Nesse sentido, já foi demonstrado em modelos animais de hipercolesterolemia a presença da LDL no parênquima cerebral. Tendo isso em vista, compreender como o excesso de colesterol-LDL está relacionado com a patogênese e progressão das DA e DP, e como isso acontece em nível molecular, é vital para elucidar os mecanismos que ligam essas condições, tornando possível considerar novas intervenções farmacêuticas, de modo a melhorar a qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o impacto direto da LDL-colesterol nativa em células BV-2, de modo a compreender as possíveis alterações que as células microgliais sofrem em resposta ao excesso de LDL.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos da LDL nativa nas células BV-2:

- em parâmetros de viabilidade e densidade celular;
- sobre o acúmulo de gotas lipídicas;
- nos processos de fagocitose e autofagia;
- na expressão gênica de LDLr em células BV-2;
- sobre marcadores modulação na função microglial, como produção de espécies reativas e citocinas.

PARTE III

6. DISCUSSÃO

Níveis plasmáticos elevados de colesterol são considerados um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como as DA e DP (Alrouji *et al.*, 2023; Björkhem; Leoni; Meaney, 2010; Kivipelto *et al.*, 2001; Zambón *et al.*, 2010). Um fator que é comum e parece correlacionar a hipercolesterolemia com a neurodegeneração é a modulação microglial. Nosso grupo de pesquisa recentemente demonstrou que camundongos LDL^{r-/-} além de apresentarem disfunção da BHE, dano cognitivo e disfunção cerebral, apresentam aumento de microgliose já aos três meses de idade, o que é exacerbado com o envelhecimento e acompanhado de alterações morfológicas dessas células, condições características de doenças neurodegenerativas (Rodrigues *et al.*, 2023).

As células microgliais são responsáveis pela manutenção da homeostase cerebral, sendo as células imunes do sistema nervoso. Elas desempenham papel central no desenvolvimento e degeneração, na poda sináptica, na regulação do fluxo sanguíneo cerebral e do acoplamento neurovascular (Lopez-Ortiz; Eyo, 2023). Assim, nosso principal objetivo nesta dissertação foi compreender como as células microgliais respondem quando expostas a um excesso de LDL nativa isolada de plasma humano. Nossos resultados indicaram que a LDL não altera parâmetros como viabilidade celular, produção de ERs e de citocinas pró-inflamatórias, mas altera o acúmulo de gotas lipídicas e a quantidade de lisossomos, reduz o processo autofágico e fagocítico, indicando uma possível perda de função celular.

Inicialmente, o ensaio de viabilidade celular foi realizado, a fim de avaliar os impactos das diferentes concentrações de LDL que seriam empregadas nos experimentos subsequentes. Não observamos alterações neste parâmetro para nenhuma das concentrações de LDL utilizadas, indicando que a LDL não altera a viabilidade celular. Esse resultado era esperado, uma vez que na literatura são observadas alterações de viabilidade celular em células BV-2 apenas quando empregadas frações mais oxidadas ou eletronegativas de LDL (Yu *et al.*, 2017).

Já nos animais hipercolesterolêmicos LDLr^{-/-} foi demonstrado uma exacerbação da apoptose neuronal já aos três meses de idade nos neurônios, mas não das células gliais (De Oliveira *et al.*, 2020).

Na sequência avaliamos a densidade celular empregando o corante Sulforodamina B, e observamos um aumento concentração-dependente da densidade celular, com uma diferença significativa entre as células expostas a maior concentração de LDL e as células controle. O aumento de densidade celular indica que a exposição a LDL desencadeia alguma resposta intracelular nas micróglia. É importante mencionar que em situações de injúria ocorre um aumento da densidade de células microglia, tais como nas doenças neurodegenerativa (Thirumangalakudi *et al.*, 2008). Ademais, nós recentemente demonstramos, como já mencionado, que nos animais LDLr^{-/-} é observado o aumento da densidade microglial no hipocampo (Rodrigues *et al.*, 2023).

Além disso, os ensaios de citometria de fluxo possibilitaram a avaliação da complexidade e do tamanho da superfície celular sem necessidade de marcação suplementar. Não foram observadas diferenças significativas nesses parâmetros, porém foi observada uma tendência de aumento na complexidade celular concentração-dependente. As células microgliais são altamente adaptativas, e uma alteração clássica é a alteração morfológica em resposta a um insulto. Apesar de não fornecer informações em termos funcionais, essas mudanças morfológicas podem ser consideradas como uma sugestão para uma investigação mais aprofundada sobre a função microglial (Paolicelli *et al.*, 2022). No nosso trabalho *in vivo* mais recente, demonstramos que as microgliais de camundongos LDL^{-/-} apresentaram alterações morfológicas em com o controle (Rodrigues *et al.*, 2023). No entanto, avaliar morfologia em linhagem celular é uma tarefa bastante complicada, principalmente pela perda de características de morfologia durante a imortalização das células, que faz com que as células não apresentem as mesmas características que *in vivo* (Butovsky *et al.*, 2014). Nesse sentido,

Broome e colaboradores (2022) tentaram avaliar a morfologia de células BV-2 e dividir em categorias, porém poucas diferenças são observadas entre as categorias propostas pelos autores, e a morfologia é discordante do comportamento dessas células *in vivo*.

Na sequência, ainda utilizando a citometria de fluxo, foi avaliado o impacto da LDL nos fosfolípidios de membrana empregando a marcação com AdipoRed, não sendo observadas alterações nesse parâmetro. Células BV-2 expostas ao oleato também não apresentaram alterações em fosfolípidios de membrana, enquanto essas mesmas células expostas ao palmitato, apresentaram aumento desse parâmetro, indicando que diferentes lipídios, desencadeiam respostas completamente diferentes nas mesmas células (Chausse *et al.*, 2019). Tomados em conjunto os resultados para densidade, complexidade, tamanho celular e fosfolípidios de membrana, se tem indícios de que a LDL desencadeia alterações celulares, aumentando a complexidade e densidade celular, sem que cause alterações de tamanho e da superfície celular, com os resultados concordando entre si.

Também utilizando o corante AdipoRed avaliamos o acúmulo de gotas lipídicas nas células após a exposição à LDL. De particular importância, alterações na composição lipídica das células afeta a fisiologia celular e o funcionamento adequado do SNC, e estão associadas ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Farmer *et al.*, 2020). As gotas lipídicas (do inglês *Lipid Droplets*, LD) são organelas intracelulares esféricas altamente dinâmicas, especializadas no armazenamento intracelular de energia na forma de lipídios neutros, como triglicerídeos de ésteres de esterois (Farmer *et al.*, 2020; Olzmann; Carvalho, 2019; Welte; Gould, 2017). Apesar de todas as células do SNC acumularem LD, as microglias são as principais acumuladoras de LD. O seu acúmulo é desencadeado naturalmente durante o processo normal de envelhecimento, estando diretamente correlacionado com o processo inflamatório, que pode ser tanto causa quanto consequência das LD (Farmer *et al.*, 2020). As LD são reservas de combustível celular, marcadores de inflamação, centros de sinalização,

reservatórios protetores de resíduos para neurônios hiperativos, produtos de desregulação lisossomal e marcas da idade (Farmer *et al.*, 2020; Khatchadourian *et al.*, 2012; Marschallinger *et al.*, 2020; Olzmann; Carvalho, 2019; Welte; Gould, 2017). Elas são geradas pelo estresse celular que pode ser desencadeado pelo excesso de ácidos graxos livres, prevenindo a lipotoxicidade e o estresse oxidativo, uma vez que englobam quantidades celulares de lipídeos potencialmente tóxicos (Olzmann; Carvalho, 2019; Welte; Gould, 2017). As gotas lipídicas respondem ao equilíbrio celular entre lipogênese e lipólise, desempenhando um papel fundamental na homeostase energética, o qual é essencial para a manutenção da função celular e do organismo normal, e fica prejudicado em diversas patologias (Olzmann; Carvalho, 2019; Welte; Gould, 2017).

Nossos resultados apontaram acúmulo de gotas lipídicas e observamos uma tendência de acúmulo concentração-dependente para gotas lipídicas, com uma diferença significativa entre as células expostas a 300 µg/mL de LDL em comparação com o controle. Marschallinger e colaboradores (2020) caracterizaram o estado microglial que acumula LDs em resposta a condições inflamatórias, expondo células BV-2 ao LPS, indicando que esse processo é consequência do estresse. Um aumento no acúmulo de gotas lipídicas foi observado também por Loving e colaboradores (2021) em células microgliais, tanto de cultura primária, quanto BV-2, quando a lipoproteína lipase (LPL), enzima responsável pela hidrólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, estava silenciada. Assim, o acúmulo das gotas pode ser um indício do mau funcionamento dessa enzima, podendo estar associado com disfunções lisossomais.

Para que ocorra a decomposição dos lipídeos armazenados nas LDs é essencial o bom funcionamento do processo autofágico de modo a garantir que ocorra a lipofagia (Welte; Gould, 2017). A lipofagia é um processo que envolve a lipase ácida lisossomal agindo sobre as LDs entregues aos autolisossomos via autofagia (Olzmann; Carvalho, 2019; Welte; Gould, 2017). Neste estudo, nós utilizamos o corante Laranja de Acridina para a avaliação da autofagia, e o

que se observou foi uma redução inversamente proporcional com o aumento da concentração de LDL a qual as células foram expostas. A autofagia é um processo catabólico que ocorre em todas as células eucarióticas, no qual constituintes do citoplasma, como organelas e macromoléculas, são sequestrados em uma estrutura de membrana dupla denominada autofagossomos (Klionsky, 2005; Tooze; Yoshimori, 2010). Essa estrutura se funde com o lisossomo entregando o seu conteúdo no lúmen do compartimento digestivo, e a subsequente quebra da membrana permite a degradação de sua carga e a reciclagem de aminoácidos (Klionsky, 2005; Tooze; Yoshimori, 2010). A autofagia é um processo dúbio a depender do momento em que ocorre, em geral é uma resposta ao estresse, mas também possui funções homeostáticas e biossintéticas, sendo essencial para a manutenção da saúde celular (Klionsky, 2005; Tooze; Yoshimori, 2010). Problemas no processo autofágico podem levar a alterações no crescimento celular, danificar as células e levar a morte celular (Klionsky, 2005; Tooze; Yoshimori, 2010).

Sabendo que a LDL leva ao acúmulo de gotas lipídicas e a redução da autofagia, avaliamos o funcionamento lisossomal empregando o corante vermelho neutro. Esse ensaio indicou um comportamento semelhante ao observado para densidade celular e acúmulo de gotas lipídicas, com um aumento concentração-dependente da quantidade de lisossomos, sendo significativa a diferença entre as células expostas a maior concentração e as células controle. A função lisossomal é fundamental para a manutenção da homeostase celular, sendo que alterações lisossômicas são características da doença de Alzheimer. Os lisossomos são pontos finais de degradação, possuem função catabólica mediada por diversas enzimas, as quais requerem um pH ácido para atuarem (Lawrence; Zoncu, 2019). O estudo de Hui e colaboradores (2012) demonstrou que neurônios de cultura primária expostos a LDL-colesterol, contendo apoB, apresentaram acúmulo de colesterol nos endolisossomos, além de aumento de tamanho e de pH da organela, indicando um processo de disfunção. O acúmulo de colesterol pode estar

associado com o limite da capacidade dos endolisossomos de liberar o colesterol, uma vez que o aumento de pH da organela leva a redução da atividade enzimática, reduzindo a capacidade da organela de digerir a lipoproteína e liberar o colesterol (Hui; Chen; Geiger, 2012).

A função lisossômica-autofágica está associada com a manutenção do cérebro, uma vez que seja prejudicada, as funções degradativas são comprometidas, e sendo associadas com a patogênese e progressão de doenças neurodegenerativas (Lawrence; Zoncu, 2019). Uma redução da autofagia, associada com um aumento da quantidade de lisossomos, pode indicar que esses lisossomos estão disfuncionais, e que pode haver uma menor depuração de componentes tóxicos (Lawrence; Zoncu, 2019; Yim; Mizushima, 2020). Cabe ressaltar que, a disfunção da autofagia é em geral causada por uma atividade lisossômica defeituosa (Yim; Mizushima, 2020).

Na sequência buscamos compreender quais receptores poderiam estar envolvidos na mediação da endocitose da LDL pelas células microgliais. Apesar do metabolismo do colesterol encefálico ser independente do metabolismo periférico, os receptores de LDL também são moléculas presentes nas células do SNC (Lane-Donovan; Philips; Herz, 2014; Sun *et al.*, 2020). Ao avaliar a expressão gênica do receptor de LDL, observamos uma diferença significativa entre as células expostas a 100 µg/mL e as células expostas a 300 µg/mL, a concentração intermediária apresenta um aumento na expressão do receptor, enquanto a concentração máxima apresentou uma redução na expressão. Em macrófagos periféricos a exposição por 24hs a 100 µg/mL de LDL nativa, levou a um aumento da abundância da proteína LDLR, porém quando empregada a LDL oxidada nas mesmas condições, o que se observou foi uma redução da abundância (Catar *et al.*, 2022). A redução da expressão do LDLR ocorre quando os níveis de colesterol estão elevados, uma vez que a entrega do colesterol leva à redução da expressão do receptor por uma retroalimentação negativa (Feingold, 2000).

Nas células microgлияis outros receptores também são altamente relevantes de serem investigados principalmente aqueles relacionados ao processo inflamatório. Quanto ao TLR4, não foram observadas diferenças significativas, e o mesmo aconteceu para a expressão do LRP8, sem uma modulação do gene pela exposição a LDL. Yu e colaboradores (2017) observaram que a endocitose da fração L5 de LDL é mediada pelo TLR4, enquanto a fração L1 é mediada pelo LDLR, já a oxLDL é mediada via LOX-1, indicando que cada fração de LDL pode ter sua entrada na célula mediada por um receptor diferente, o que conseqüentemente desencadeia vias de sinalização diferentes.

Por sua vez, o CD68, uma proteína transmembrana relacionada com a atividade fagocítica, apresentou a redução de sua expressão em células expostas à maior concentração de LDL, indicando redução da atividade fagocítica. Camundongos idosos apresentam microgлияs com danos no processo de fagocitose, o que está relacionado com o acúmulo excessivo de colesterol intracelular, sendo que essa situação pode contribuir para a progressão de doenças neurodegenerativas (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2018). A redução na expressão de CD68 em nosso estudo contrasta com os dados do trabalho de Chen e colaboradores (2018), no qual os autores observaram um aumento na expressão de CD68 em camundongos de 16 meses submetidos a dieta rica em colesterol por 8 semanas. Cabe destacar que em nosso recente estudo utilizando camundongos LDLr^{-/-} hipercolesterolêmicos também não observamos modificações nas quantidades de CD68 nas microgлияs tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal (Rodrigues *et al.*, 2023). A microgлия altamente fagocítica é característica do estado microglial associada à doença, porém a redução da fagocitose é comum ao estado microglial acumulador de lipídios.

Uma característica importante de células microgлияis que se encontrem em estado pró-inflamatório é a produção excessiva de citocinas (Marschallinger *et al.*, 2020). Em nosso trabalho, as interleucinas pró-inflamatórias não apresentaram modulações significativas nas

microglias após a incubação com a LDL, porém, observa-se uma tendência à redução da expressão gênica das mesmas quando as células são expostas à LDL. Apesar de o aumento na liberação de TNF α e de IL-1 β ser considerado uma resposta canônica quando células microgliais estão reativas, Chausse e colaboradores (2019) demonstraram que células BV-2 quando expostas ao palmitato ou ao oleato, apresentaram um perfil disfuncional diferente, no qual a produção de TNF α e de IL-1 β não são alteradas. A IL-1 β é uma importante citocina pró-inflamatória que é gerada em resposta a infecção, contribuindo para a lesão (Madry *et al.*, 2018). A sua produção é dependente da formação de complexos de inflamassoma, o qual depende da estimulação por um agonista do receptor toll-like (TLR), seguido da queda de potencial intracelular para ser formado (Madry *et al.*, 2018). Uma vez que não observamos alterações na expressão do TLR, essa é uma possível explicação para a redução da liberação da citocina, já que não ocorre o estímulo para a formação do inflamassoma. O estudo de Chen e colaboradores (2018) com camundongos de 16 meses submetidos a dieta rica em colesterol por 8 semanas observou a ativação do inflamassoma NLRP3, e o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α , porém, os autores também observaram o aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, demonstrando o papel dúbio que o colesterol pode desempenhar no organismo. Já o nosso grupo de pesquisa, quando investigou a expressão gênica destes mediadores inflamatórios nos camundongos LDLr^{-/-} não observou alterações na expressão de IL-1 β , porém observou uma redução significativa da expressão de IL-6 (De Oliveira *et al.*, 2020).

Outro marcador considerado clássico para a “modulação” da atividade e função microglial é o aumento da produção de ER, em resposta a algum insulto. O que observamos foi que imediatamente após serem expostas a LDL, essas células apresentam um aumento na produção de EROs, porém, não há diferença significativa entre os grupos. Lénárt e colaboradores (2015) demonstraram que em cultura primária de células gliais de camundongos

a exposição a 200 µg/mL de LDL nativa não causou dano oxidativo, que foi observado apenas quando as células foram expostas a LDL oxidada. O estudo de Yu e colaboradores (2017) demonstrou que a produção de ER é aumentada apenas quando as células BV-2 são expostas a frações modificadas de LDL, seja mais eletronegativa ou oxidada, e que frações menos alteradas não causam resposta oxidativa. Enquanto células BV-2 expostas a oleato apresentaram uma maior razão GSH/GSSG, indicando proteção contra desbalanços oxidativos, e não apresentaram alterações na produção de nitrito (Chausse *et al.*, 2019). Outro estudo empregando células BV-2, avaliou a capacidade de um mimético de apoE de reverter os impactos causados pela exposição ao LPS, e foi observada a redução na produção de nitrito, reduzindo a resposta inflamatória (Pocivavsek; Burns; Rebeck, 2009). Já em linhagens neuronais a exposição à LDL causou um aumento na produção de ER (Engel *et al.*, 2016).

As diferenças encontradas entre o nosso estudo com BV-2, uma linhagem celular, com estudos *in vivo* podem estar associadas ao fato de que linhagens celulares não expressam a assinatura molecular da micróglia adulta, portanto podem não apresentar a mesma resposta da célula *in vivo* (Butovsky *et al.*, 2014). Além disso, diversos estudos apresentam respostas contraditórias das células BV-2 quando expostas a diferentes ácidos graxos, como palmitato e oleato (Chausse *et al.*, 2019), e diferentes tipos de colesterol e LDL, como L1, L5, LDL oxidada (Yu *et al.*, 2017). Nesse sentido, o emprego da LDL nativa, sem nenhuma alteração proposital de sua composição, pode resultar em observações do efeito sinérgico ou antagônico entre diferentes frações que estão presentes, com diferentes eletronegatividades e estágios da oxidação, situação que se assemelha ao organismo vivo, uma vez que todas estão presentes em conjunto.

7. CONCLUSÕES

As células BV2 expostas à LDL, principalmente na concentração mais alta, apresentaram acúmulo de gotas lipídicas, o que foi associado a alterações no processo de digestão celular, mas não com modulação na produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 11). Por fim, a incubação com LDL modificou a expressão gênica do receptor de LDL, mas não de receptor relacionados a captação de LDL oxidada ou inflamatórios.

Dessa forma, o presente trabalho elucidou que as células microgliciais quando expostas à LDL nativa, que não passou por nenhum processo de oxidação ou separação proposital, apresentam uma resposta bastante diferente da observada para a LDL oxidada, ou para ativadores clássicos. O que se observa é uma tendência a redução de sinalização, uma vez que a resposta não envolve produção de espécies reativas e de citocinas pró-inflamatórias. As células endocitam a LDL presente no meio, até um limite, uma vez que se observa a redução da expressão do receptor, e ao mesmo tempo em que aumentam a quantidade de lisossomos, reduzem o processo autofágico.

Isso pode levar a uma hipótese futura de que, uma condição de hipercolesterolemia pode resultar no mal funcionamento das células microgliciais, o que afeta a homeostase cerebral. Assim, o indivíduo torna-se mais suscetível ao acúmulo de agregados proteicos, como A β , e as células que deveriam “proteger” o SNC encontram-se disfuncionais e não conseguem realizar suas funções. Isto resultaria por fim no maior risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas por disfunção das células microgliciais induzida pela hipercolesterolemia prévia.

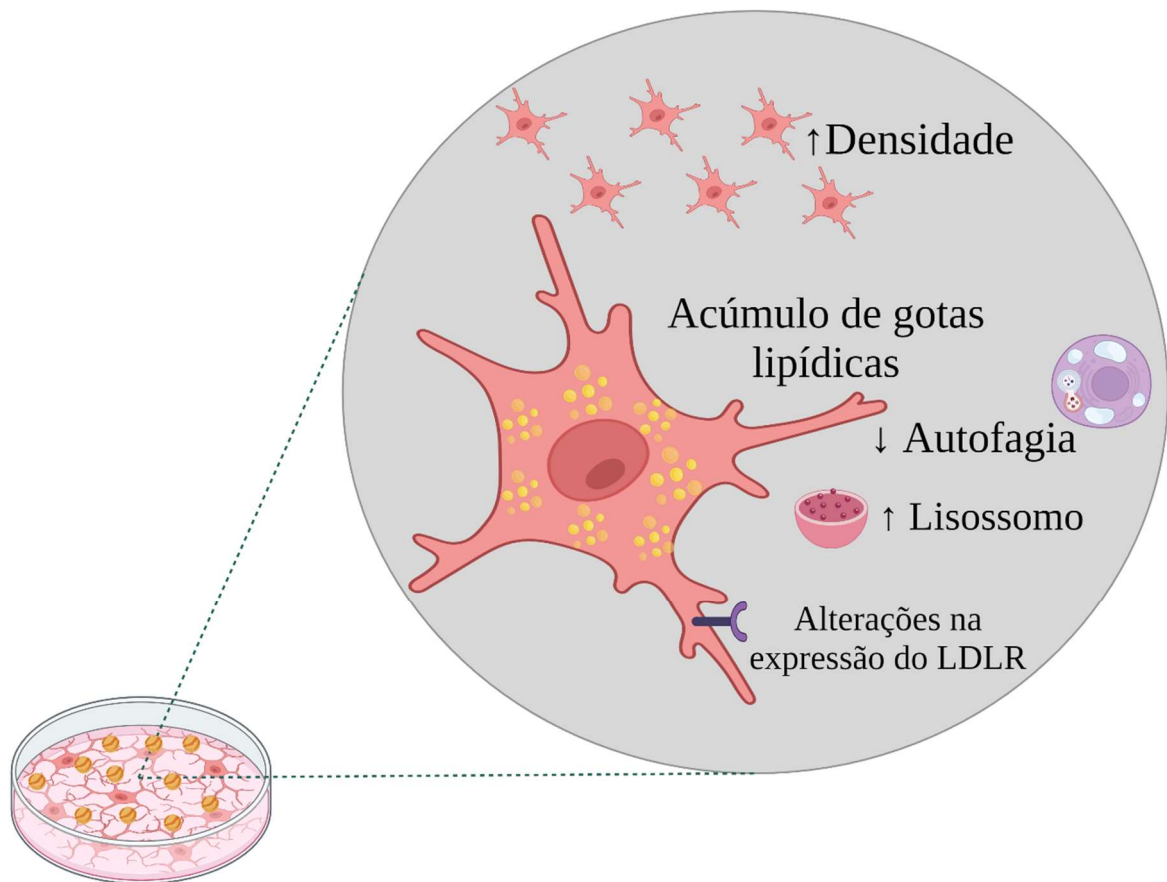


Figura 11 Impacto da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em células microglicais BV-2. As células BV2 expostas à LDL, principalmente na concentração mais alta de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apresentaram aumento de densidade e o acúmulo de gotas lipídicas, o que foi associado a alterações no processo de digestão celular, com redução de autofagia e aumento de lisossomos, mas sem modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Por fim, a incubação com LDL modificou a expressão gênica do receptor de LDL, mas não de receptor relacionados à captação de LDL oxidada ou inflamatórios. *Fonte: autoral.*

8. PERSPECTIVAS

Investigar as alterações de autofagia observadas, avaliando a expressão gênica de LC3I e LC3II, relativos a autofagossoma e autolisossoma, cuja razão LC3II/LC3I fornece informações sobre alterações na autofagia.

Avaliar os impactos da LDL na expressão dos receptores CD36 e TREM2 a fim de elucidar a interferência no processo de fagocitose, podendo ser avaliado também BECLIN 1, uma vez que é essencial para a reciclagem dos receptores citados. Há relatos de que a redução da expressão de TREM2 “prende” a célula microglial em um estado homeostático, o qual é menos responsivo a alterações ambientais, e o aumento da expressão pode representar um mecanismo compensatório para combater o dano e disfunção microglial.

Avaliar a atividade da HMGCoa Redutase, uma vez que observamos redução da expressão do receptor de LDL, é interessante compreender se o colesterol está sendo liberado na célula, avaliando a enzima envolvida na biossíntese de colesterol.

Uma vez que não observamos alterações nos considerados marcadores clássicos de reatividade microglial, realizar o ensaio de respirometria de alta resolução pode ajudar a compreender as alterações causadas pela exposição a LDL e um possível *shift* metabólico induzido pelo acúmulo de colesterol nas células.

REFERÊNCIAS

- ALROUJI, M. *et al.* The potential role of cholesterol in Parkinson's disease neuropathology: perpetrator or victim. **Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 3781–3794, 2023.
- BENITO-VICENTE, A. *et al.* Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 3426, 2018.
- BENJAMIN, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, [s. l.], v. 139, n. 10, p. e56–e528, 2019.
- BJÖRKHEM, I.; LEONI, V.; MEANEY, S. Genetic connections between neurological disorders and cholesterol metabolism. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 2489–2503, 2010.
- BLASI, E. *et al.* Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 27, n. 2–3, p. 229–237, 1990.
- BOCCHINI, V. *et al.* An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 616–621, 1992.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 24, n. 2–3, p. 119–124, 1985.
- BOULLERNE, A. I.; FEINSTEIN, D. L. History of Neuroscience I. Pío del Río-Hortega (1882-1945): The Discoverer of Microglia and Oligodendroglia. **ASN neuro**, [s. l.], v. 12, p. 1759091420953259, 2020.
- BROOME, S. T.; MUSUMECI, G.; CASTORINA, A. PACAP and VIP Mitigate Rotenone-Induced Inflammation in BV-2 Microglial Cells. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 72, n. 11, p. 2163–2175, 2022.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. **Scientific American**, [s. l.], v. 251, n. 5, p. 58–66, 1984.
- BROWN, A. J.; SHARPE, L. J. Chapter 11 - Cholesterol Synthesis. *In*: RIDGWAY, N. D.; MCLEOD, R. S. (org.). **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)**. Boston: Elsevier, 2016. p. 327–358. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444634382000110>. Acesso em: 23 jan. 2024.
- BURNS, M. P. *et al.* Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Abeta in amyloid plaques. **Brain Research. Molecular Brain Research**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 119–125, 2003.
- BUTOVSKY, O. *et al.* Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional

signature in microglia. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 131–143, 2014.

CALSOLARO, V.; EDISON, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 719–732, 2016.

CANTUTI-CASTELVETRI, L. *et al.* Defective cholesterol clearance limits remyelination in the aged central nervous system. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 359, n. 6376, p. 684–688, 2018.

CATAR, R. *et al.* Native and Oxidized Low-Density Lipoproteins Increase the Expression of the LDL Receptor and the LOX-1 Receptor, Respectively, in Arterial Endothelial Cells. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 204, 2022.

CHAUSSE, B. *et al.* Distinct metabolic patterns during microglial remodeling by oleate and palmitate. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. BSR20190072, 2019.

CHEN, X. *et al.* Endolysosome mechanisms associated with Alzheimer's disease-like pathology in rabbits ingesting cholesterol-enriched diet. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1289–1303, 2010.

CHEN, Y. *et al.* Pro- and Anti-inflammatory Effects of High Cholesterol Diet on Aged Brain. **Aging and Disease**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 374–390, 2018.

CHITU, V.; GÖKHAN, Ş.; STANLEY, E. R. Modeling CSF-1 receptor deficiency diseases – how close are we?. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 289, n. 17, p. 5049–5073, 2022.

COLLE, D. *et al.* Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 1280–1295, 2016.

COMINACINI, L. *et al.* Oxidized Low Density Lipoprotein (ox-LDL) Binding to ox-LDL Receptor-1 in Endothelial Cells Induces the Activation of NF- κ B through an Increased Production of Intracellular Reactive Oxygen Species *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 17, p. 12633–12638, 2000.

CRISBY, M. *et al.* Effects of high cholesterol diet on gliosis in apolipoprotein E knockout mice: Implications for Alzheimer's disease and stroke. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 369, n. 2, p. 87–92, 2004.

DASARI, B. *et al.* The oxysterol 27-hydroxycholesterol increases β -amyloid and oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. **BMC Ophthalmology**, [s. l.], v. 10, p. 22, 2010.

DE BEM, A. F. *et al.* Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 201, n. 1, p. 92–100, 2008.

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

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

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

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

DE OLIVEIRA, J.; MOREIRA, E. L. G.; DE BEM, A. F. Beyond cardiovascular risk: Implications of Familial hypercholesterolemia on cognition and brain function. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 93, p. 102149, 2024.

DEL RÍO-HORTEGA BERECIARTU, J. Pío del Río-Hortega: The Revolution of Glia. **Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)**, [s. l.], v. 303, n. 5, p. 1232–1241, 2020.

DOWHAN, W.; BOGDANOV, M.; MILEYKOVSKAYA, E. Chapter 1 - Functional Roles of Lipids in Membranes. *In*: RIDGWAY, N. D.; MCLEOD, R. S. (org.). **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)**. Boston: Elsevier, 2016. p. 1–40. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444634382000018>. Acesso em: 23 jan. 2024.

DURSUN, E. *et al.* The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 283, p. 50–57, 2015.

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

FALUDI, A. *et al.* ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 109, n. 1, 2017. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.20170121>. Acesso em: 18 jan. 2024.

FARMER, B. C. *et al.* Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 14, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.00742>. Acesso em: 2 fev. 2024.

FEINGOLD, K. R. Introduction to Lipids and Lipoproteins. *In*: FEINGOLD, K. R. *et al.* (org.). **Endotext**. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc., 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>. Acesso em: 16 jan. 2024.

FIGUEIRÓ, L. R. *et al.* Cellular effects of thirdhand tobacco smoke from smokers' homes. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 243–251, 2018.

GHRIBI, O. Potential Mechanisms Linking Cholesterol to Alzheimer's Disease-like Pathology in Rabbit Brain, Hippocampal Organotypic Slices, and Skeletal Muscle. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 673–684, 2008.

GOEDEKE, L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 915–930, 2012.

GRAEBER, M. B.; LI, W.; RODRIGUEZ, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 585, n. 23, p. 3798–3805, 2011.

GUZMAN-MARTINEZ, L. *et al.* Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 10, p. 1008, 2019.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 256, n. 5054, p. 184–185, 1992.

HENEKA, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet. Neurology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.

HENN, A. *et al.* The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. **ALTEX**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 83–94, 2009.

HEVERIN, M. *et al.* Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1047–1052, 2005.

HOLTZMAN, D. M.; JOHN, C. M.; GOATE, A. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 3, n. 77, p. 77sr1, 2011.

HUFF, M. W.; DAUGHERTY, A.; LU, H. Chapter 18 - Atherosclerosis. *In*: RIDGWAY, N. D.; MCLEOD, R. S. (org.). **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)**. Boston: Elsevier, 2016. p. 519–548. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444634382000183>. Acesso em: 23 jan. 2024.

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

HUSSAIN, B.; FANG, C.; CHANG, J. Blood–Brain Barrier Breakdown: An Emerging Biomarker of Cognitive Impairment in Normal Aging and Dementia. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 15, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.688090>. Acesso em: 2 fev. 2024.

JACK, C. R. *et al.* Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. **The Lancet. Neurology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 207–216, 2013.

KEREN-SHAUL, H. *et al.* A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. **Cell**, [s. l.], v. 169, n. 7, p. 1276-1290.e17, 2017.

KHATCHADOURIAN, A. *et al.* Dynamics and regulation of lipid droplet formation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1821, n. 4, p. 607–617, 2012.

KIVIPELTO, M. *et al.* Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **BMJ : British Medical Journal**, [s. l.], v. 322, n. 7300, p. 1447–1451, 2001.

KLIONSKY, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 118, n. Pt 1, p. 7–18, 2005.

KRASEMANN, S. *et al.* The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Immunity**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 566-581.e9, 2017.

KUO, P.-H. *et al.* A high-cholesterol diet enriched with polyphenols from Oriental plums (*Prunus salicina*) improves cognitive function and lowers brain cholesterol levels and neurodegenerative-related protein expression in mice. **The British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 113, n. 10, p. 1550–1557, 2015.

KUO, Y. M. *et al.* Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 252, n. 3, p. 711–715, 1998.

LANE-DONOVAN, C. E.; PHILIPS, G. T.; HERZ, J. More Than Cholesterol Transporters: Lipoprotein Receptors in CNS Function and Neurodegeneration. **Neuron**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 771–787, 2014.

LAWRENCE, R. E.; ZONCU, R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 133–142, 2019.

LÉNÁRT, N. *et al.* Cultured cells of the blood–brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. **Fluids and Barriers of the CNS**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 17, 2015.

LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 157–172, 2021.

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

LOPEZ-ORTIZ, A. O.; EYO, U. B. Astrocytes and microglia in the coordination of CNS development and homeostasis. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], 2023.

LOVING, B. A. *et al.* Lipoprotein Lipase Regulates Microglial Lipid Droplet Accumulation. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 198, 2021.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

- MACIEJEWSKA, K.; CZARNECKA, K.; SZYMAŃSKI, P. A review of the mechanisms underlying selected comorbidities in Alzheimer's disease. **Pharmacological Reports**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 1565–1581, 2021.
- MADRY, C. *et al.* Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K⁺ Channel THIK-1. **Neuron**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 299–312.e6, 2018.
- MARSCHALLINGER, J. *et al.* Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 194–208, 2020.
- MARTÍN, M. G.; PFRIEGER, F.; DOTTI, C. G. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. **EMBO Reports**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 1036–1052, 2014.
- MARWARHA, G.; GHRIBI, O. Does the oxysterol 27-hydroxycholesterol underlie Alzheimer's disease-Parkinson's disease overlap? **Experimental gerontology**, [s. l.], v. 68, p. 13–18, 2015.
- MOREIRA, E. L. G. *et al.* Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 495–511, 2012.
- MOREIRA, E. L. G. *et al.* Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event?. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 415–426, 2014.
- MOSHER, K. I.; WYSS-CORAY, T. Microglial Dysfunction in Brain Aging and Alzheimer's Disease. **Biochemical pharmacology**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 594–604, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MURPHY, M. P.; LEVINE, H. Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 311, 2010.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; HOSKINS, A. A. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022.
- NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. **Science**, [s. l.], v. 308, n. 5726, p. 1314–1318, 2005.
- OBULESU, M.; JHANSILAKSHMI, M. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: an understanding of physiology and pathology. **The International Journal of Neuroscience**, [s.

l.], v. 124, n. 4, p. 227–235, 2014.

OLZMANN, J. A.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [*s. l.*], v. 20, n. 3, p. 137–155, 2019.

PAOLICELLI, R. C. *et al.* Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. **Neuron**, [*s. l.*], v. 110, n. 21, p. 3458–3483, 2022.

PAPPOLLA, M. A. *et al.* Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's disease: expanding the horizons of pathogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, [*s. l.*], v. 33, n. 2, p. 173–181, 2002.

PAUL, R. *et al.* Cholesterol contributes to dopamine-neuronal loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of mitochondrial dysfunctions and oxidative stress. **PLoS One**, [*s. l.*], v. 12, n. 2, p. e0171285, 2017a.

PAUL, R. *et al.* Hypercholesterolemia causes psychomotor abnormalities in mice and alterations in cortico-striatal biogenic amine neurotransmitters: Relevance to Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, [*s. l.*], v. 108, p. 15–26, 2017b.

PAUL, R.; BORAH, A. Global loss of acetylcholinesterase activity with mitochondrial complexes inhibition and inflammation in brain of hypercholesterolemic mice. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 17922, 2017.

PAUL, R.; CHOUDHURY, A.; BORAH, A. Cholesterol - A putative endogenous contributor towards Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, [*s. l.*], v. 90, p. 125–133, 2015.

PERRY, V. H.; NEWMAN, T. A.; CUNNINGHAM, C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [*s. l.*], v. 4, n. 2, p. 103–112, 2003.

PIRCHL, M. *et al.* Homocysteine has anti-inflammatory properties in a hypercholesterolemic rat model *in vivo*. **Molecular and Cellular Neuroscience**, [*s. l.*], v. 49, n. 4, p. 456–463, 2012.

POCIVAVSEK, A.; BURNS, M. P.; REBECK, G. W. Low Density Lipoprotein Receptors Regulate Microglial Inflammation Through C-Jun N-Terminal Kinase. **Glia**, [*s. l.*], v. 57, n. 4, p. 444–453, 2009.

POLAZZI, E.; MONTI, B. Microglia and neuroprotection: From *in vitro* studies to therapeutic applications. **Progress in Neurobiology**, [*s. l.*], v. 92, n. 3, p. 293–315, 2010.

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

PRASANTHI, J. R. *et al.* Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on β -amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Molecular Neurodegeneration**, [*s. l.*], v. 4, n. 1, p. 1, 2009.

RAHMAN, S. M. A. *et al.* High cholesterol diet results in increased expression of interleukin-6 and caspase-1 in the brain of apolipoprotein E knockout and wild type mice. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 169, n. 1, p. 59–67, 2005.

RAPP, J. H. *et al.* Microemboli composed of cholesterol crystals disrupt the blood-brain barrier and reduce cognition. **Stroke**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 2354–2361, 2008.

REFOLO, L. M. *et al.* Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 321–331, 2000.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

RODRIGUES, M. S. *et al.* Microglia contribute to cognitive decline in hypercholesterolemic LDLr^{-/-} mice. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], p. jnc.15952, 2023.

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

ROHN, T. T. The triggering receptor expressed on myeloid cells 2: “TREM-ming” the inflammatory component associated with Alzheimer's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2013, p. 860959, 2013.

RUDGE, J. D. A New Hypothesis for Alzheimer's Disease: The Lipid Invasion Model. **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 129–161, 2022.

SALA FRIGERIO, C. *et al.* The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to A β Plaques. **Cell Reports**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1293-1306.e6, 2019.

SCHNEIDER, W. J. Chapter 17 - Lipoprotein Receptors. *In*: RIDGWAY, N. D.; MCLEOD, R. S. (org.). **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)**. Boston: Elsevier, 2016. p. 489–518. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444634382000171>. Acesso em: 23 jan. 2024.

SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO molecular medicine**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 595–608, 2016.

SHARMA, S. *et al.* Hypercholesterolemia-induced A β accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling. **Neurobiology of disease**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 426–432, 2008.

SIERRA, A. *et al.* The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. **Glia**, [s. l.], v. 64, n. 11, p. 1801–1840, 2016.

SIERRA, A.; PAOLICELLI, R. C.; KETTENMANN, H. Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 42, n. 11, p. 778–

792, 2019.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

SPARKS, D. L. *et al.* Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 601–607, 1990.

SPARKS, D. L. *et al.* Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 88–94, 1994.

STREIT, W. J.; SPARKS, D. L. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 130–138, 1997.

SUGIYAMA, D. *et al.* Risk of hypercholesterolemia for cardiovascular disease and the population attributable fraction in a 24-year Japanese cohort study. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 95–107, 2015.

SUN, R. *et al.* Low-density lipoprotein receptor (LDLR) regulates NLRP3-mediated neuronal pyroptosis following cerebral ischemia/reperfusion injury. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 330, 2020.

SWARDFAGER, W. *et al.* A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 68, n. 10, p. 930–941, 2010.

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

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

THOMÉ, M. P. *et al.* Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 129, n. 24, p. 4622–4632, 2016.

TOOZE, S. A.; YOSHIMORI, T. The origin of the autophagosomal membrane. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 831–835, 2010.

TREMBLAY, M.-È. *et al.* From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. **Frontiers in Neuroanatomy**, [s. l.], v. 9, p. 45, 2015.

ULLRICH, C.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Molecular and Cellular Neurosciences**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 408–417, 2010.

VANCE, J. E. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. **Disease Models & Mechanisms**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 746–755, 2012.

WELTE, M. A.; GOULD, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1862, n. 10 Pt B, p. 1260–1272, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Raised cholesterol**. [S. l.], 2012. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/3236>. Acesso em: 18 jan. 2024.

XUE, Q.-S.; SPARKS, D. L.; STREIT, W. J. Microglial activation in the hippocampus of hypercholesterolemic rabbits occurs independent of increased amyloid production. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 20, 2007.

YIM, W. W.-Y.; MIZUSHIMA, N. Lysosome biology in autophagy. **Cell Discovery**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–12, 2020.

YU, L.-E. *et al.* Highly electronegative low-density lipoprotein L5 evokes microglial activation and creates a neuroinflammatory stress via Toll-like receptor 4 signaling. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 142, n. 2, p. 231–245, 2017.

YVAN-CHARVET, L.; IVANOV, S. Metabolic Reprogramming of Macrophages in Atherosclerosis: is it all about cholesterol?. **Journal Of Lipid And Atherosclerosis**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 231, 2020.

ZAMBÓN, D. *et al.* Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **The American journal of medicine**, [s. l.], v. 123, n. 3, p. 267–274, 2010.

ZHANG, R. *et al.* Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 256, n. 1–2, p. 38–42, 2013.