

Raul Marin de Souza

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS, METABÓLICOS E
NEUROQUÍMICOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM
CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCOLESTEROLÊMICA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz
Gasnhar Moreira.

Coorientador: Prof. Dr. Aderbal Silva
Aguiar Jr.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Raul Marin de
Efeitos comportamentais, metabólicos e
neuroquímicos do enriquecimento ambiental em
camundongos alimentados com dieta
hipercolesterolêmica / Raul Marin de Souza ;
orientador, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira,
coorientador, Aderbal Silva Aguiar Junior, 2019.
85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

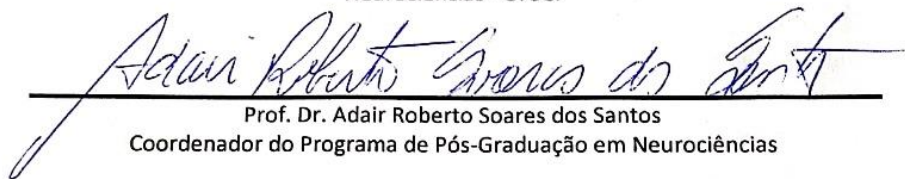
1. Neurociências. 2. Neurociência. 3.
Colesterol. 4. Memória. 5. Aprendizagem. I. Moreira,
Eduardo Luiz Gasnhar . II. Aguiar Junior, Aderbal
Silva . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
IV. Título.

"Efeitos comportamentais, metabólicos e neuroquímicos do enriquecimento ambiental em camundongos alimentados com dieta hipercolesterolêmica"

Por

Raul Marin de Souza

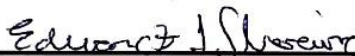
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (002/2019/PGN) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC.



Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Banca examinadora:



Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr. Rafael Mariano de Bitencourt (Universidade do Sul de Santa Catarina)



Dr. Wagner Luis Reis (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Vilmar e Shirlei, por terem me ensinado seus valores, pelo amor incondicional, por terem incentivado meus estudos e um pensamento crítico desde a infância, e por todo suporte oferecido até hoje.

A minha irmã Mônica por ter sido um exemplo de paixão pelos estudos e pela leitura, e que junto ao meu cunhado Haroldo, foram e continuam sendo meus exemplos como cientistas dentro da família. Sinto-me privilegiado por ter crescido num ambiente tão rico e cheio de estímulos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Aderbal por ter sido meu primeiro contato via e-mail com o programa, tendo incentivado a me inscrever no processo seletivo para o mestrado.

As minhas colegas de turma, Ana Cristina, Luísa, Carol, Bárbara e Gabi por todos os encontros nos bares, tendo formado meu primeiro círculo de amizade em Florianópolis.

A todos os colaboradores que fizeram possível a realização do meu projeto, em especial à Prof^a. Dr^a. Andreza e ao Prof. Dr. Adair.

Ao pessoal do LANDI por estarem sempre de portas abertas.

Ao Nivaldo por todo auxílio nas questões administrativas, e também ao Seu Carlos e aos Professores Doutores: Vander, Moacir, Eduardo e Guilherme, pelas conversas sobre futebol e por terem aguentado minhas provocações durante o desempenho impecável do meu Corinthians em 2017.

Agradeço à Bárbara por todo o companheirismo, por ter compartilhado comigo boa parte dos bons e também dos momentos difíceis que a pós-graduação nos proporcionou.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Adriano, Letícia, Giovana, Eslen, Izolene, Sara, Peter e Wellington, por terem feito parte da nossa rotina de laboratório e principalmente por nossas conversas científico-filosóficas que com certeza foram fundamentais na minha evolução intelectual.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Neurociências por todo o conhecimento transmitido e por proporcionarem grandes discussões científicas.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo por ter me oferecido uma oportunidade em seu laboratório, por ter confiado no meu trabalho, por toda a orientação durante o curso e, principalmente, por sempre demonstrar preocupação e grande respeito pelas diferenças e pela saúde física e mental de seus orientandos. Em tempos de crise e por todas as dificuldades que enfrentamos, tais qualidades foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

Aos grandes amigos que fiz nesta nova fase da minha vida, Tiago, Eslen e Prof. Andrei. Muito obrigado por todos os churrascos, cervejas e todas as conversas que me proporcionaram a experiência de viver a ciência tanto em meio profissional quanto pessoal.

“Mas é isso mesmo que nos faz senhores da terra,
é esse poder de restaurar o passado, para tocar a
instabilidade das nossas impressões e a vaidade
dos nossos afetos”

Memórias Póstumas de Brás Cubas
(Machado de Assis)

RESUMO

Embora a alimentação com alto teor de gorduras venha sendo associada com o aumento da incidência de obesidade e de doenças crônicas relacionadas, e.g., diabetes tipo 2, evidências mais recentes indicam que tais dietas, em longo prazo, também podem estar associadas à déficits no aprendizado e memória dependente do hipocampo. Nesse sentido, o ambiente enriquecido (AE) é uma técnica de alojamento de animais composta de aumento de espaço, atividade física e interações sociais, que por sua vez aumenta a estimulação sensorial, cognitiva, motora e social. O AE leva a alterações em parâmetros relacionados ao sistema nervoso central (SNC), conforme definido pelo aumento da neurogênese, diferenças no aprendizado e memória e resistência a insultos encefálicos externos. No presente estudo, os impactos do AE em camundongos *Swiss* alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica (DH; 20% de gordura e 1,5% de colesterol) foram investigados. Aqui, demonstramos que o AE, quando iniciado 4 semanas após o início da DH em camundongos, reverte os déficits na memória espacial e de reconhecimento induzida pela DH, testadas no labirinto em T e no teste de reconhecimento de objetos. Embora o AE não tenha afetado o ganho de peso ou a hipercolesterolemia induzidos pela DH, atenuou os efeitos relacionados à intolerância à glicose induzidos pela DH. Por outro lado, o AE foi incapaz de mitigar a diminuição nos níveis hipocâmpais do fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês BDNF) e da interleucina-6 (IL-6) induzidos pela DH. De modo geral, enquanto os resultados do presente estudo reforçam os efeitos positivos e neuroprotetores do AE em relação à cognição, eles não suportam a ação protetora do AE nos marcadores inflamatórios e neuroprotetores avaliados, que sofreram alterações induzidas pela DH. Como conclusão, com base em observações clínicas de que indivíduos não diabéticos com formas leves de intolerância à glicose têm um maior risco de comprometimento cognitivo, pode-se especular sobre a conexão entre os efeitos do AE na intolerância à glicose e seus efeitos sobre a cognição.

Palavras-chave: Colesterol. Aprendizagem e memória. Camundongos swiss. Enriquecimento ambiental.

ABSTRACT

While chronic high-fat feeding has long been associated with the rising incidence of obesity/type 2 diabetes, recent evidence has established that it is also associated with deficits in hippocampus-dependent memory. In this regard, environmental enrichment (EE) is an animal housing technique composed of increased space, physical activity, and social interactions, which in turn increases sensory, cognitive, motor, and social stimulation. EE leads to improved cerebral health as defined by increased neurogenesis, enhanced learning and memory and resistance to external cerebral insults. In the present study, the impacts of environmental enrichment (EE) on Swiss mice fed a high-fat, cholesterol-enriched diet (HFECd; 20% fat and 1.5% cholesterol) were investigated. Here, we demonstrated that EE, when initiated 4 weeks after the beginning of HFECd in mice, prevents HFECd induced spatial memory and object recognition impairment, which were tested in T-maze and object recognition tests. Although EE did not affect HFECd-induced weight gain or hypercholesterolemia, it attenuated the effects related to HFECd-induced glucose intolerance. On the other hand, the EE was unable to mitigate the decrease in hippocampal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and interleukin-6 (IL-6) induced by HFECd. Overall, while the results of the present study reinforce the positive and neuroprotective effects of EE on cognition, they do not support the protective action of EE on the inflammatory and neuroprotective markers evaluated, which underwent HFECd-induced changes. As a conclusion, based on clinical observations that non-diabetic individuals with mild forms of glucose intolerance have a higher risk of cognitive impairment, one can speculate on the connection between the effects of EE on glucose intolerance and its effects on cognition.

Keywords: Cholesterol. Learning and memory. Swiss mice. Environmental enrichment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pesquisadores eminentes no estudo do colesterol.....	29
Figura 2: Mudança hipotética da função cognitiva de um indivíduo durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA).....	Erro! Indicador não definido. 31
Figura 3: Influência da hipercolesterolemia na integridade da barreira hematoencefálica (BHE)	35
Figura 4: Enriquecimento ambiental e os efeitos da estimulação sensorial na melhora cognitiva e motora em diferentes áreas do ecéfalo.....	38
Figura 5: Enriquecimento ambiental para roedores em cativeiro.....	39
Figura 6: Delineamento experimental.....	46
Figura 7: Teste do labirinto em T.....	48
Figura 8: Teste de reconhecimento de objetos.....	49
Figura 9: Resultados do Teste de Alternação Forçada (T-Maze).....	52
Figura 10: Restultados do Teste de Campo Aberto.....	53
Figura 11: Resultados do Teste de Reconhecimento de Objetos.....	55
Figura 12: Análises bioquímicas.....	57
Figura 13: Análises neuroquímicas.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos em humanos: efeitos da dieta na cognição.....32

Tabela 2: Comparação entre o metabolismo do colesterol em humanos e camundongos.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Ambiente enriquecido

ALT – Alanina aminotransferase

ANOVA – Análise de variância

AP – Ambiente padrão

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *brain derived neurotrophic factor*)

BHE – Barreira hemato-encefálica

CT – Colesterol total

DA – Doença de Alzheimer

DH – Dieta hipercolesterolêmica

DP – Dieta padrão

HDL – Lipoproteína de alta densidade (do inglês *high density lipoprotein*)

HFD – Dieta alta em gorduras (do inglês *high fat diet*)

IL-1 – Interleucina – 1

IL-6 – Interleucina – 6

IL-10 – Interleucina – 10

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do inglês *Low density lipoprotein*)

SNC – Sistema nervoso central

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)

Artigo publicado relacionado à dissertação:

DE SOUZA, R. M. et al. Behavioural, metabolic and neurochemical effects of environmental enrichment in high-fat cholesterol-enriched diet-fed mice. **Behavioural Brain Research**, n. August, p. 0–1, 2018.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Hipercolesterolemia.....	27
1.2 Efeitos da hipercolesterolemia sobre o Sistema Nervoso Central	29
1.3 Enriquecimento ambiental.....	36
1.4 Modelos experimentais para o estudo da hipercolesterolemia e suas consequências sobre o metabolismo e comportamento	39
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVO GERAL	44
3.1 Objetivos específicos.....	44
3.1.2 Avaliação de parâmetros comportamentais	44
3.1.3 Avaliação de parâmetros metabólicos	44
3.1.4 Avaliação de parâmetros neuroquímicos.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Animais	45
4.2 Drogas e Químicos	45
4.3 Condições de Habitação.....	45
4.4 Desenho Experimental	46
4.5 Tarefas Comportamentais.....	47

4.5.1 Teste de alternância forçada (Labirinto em T)	47
4.5.2 Teste de reconhecimento de objetos.....	48
4.6 Análises bioquímicas	49
4.7 Análises Neuroquímicas.....	49
4.8 Análise estatística.....	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Labirinto em T	51
5.2 Teste de campo aberto.....	52
5.3 Teste de reconhecimento de objetos.....	53
5.4 Análises bioquímicas	55
5.5 Análises Neuroquímicas.....	57
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipercolesterolemia

De acordo com a Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017, a hipercolesterolemia é uma condição de aumento na concentração de colesterol plasmático indicada por uma elevação isolada de LDL (lipoproteína de baixa densidade, do inglês *low density lipoprotein*) > 160 mg/dL. Indivíduos hipercolesterolêmicos são considerados em condição de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, podendo ser enquadrados nesta categoria, indivíduos com colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade, do inglês *high density lipoprotein*) abaixo de 40mg/dL e triglicérides acima de 150 mg/dL (em jejum). Porém, a forma mais comum de se aferir uma condição de hipercolesterolemia é por meio da própria concentração de colesterol plasmático, sendo que em valores superiores à 190mg/dL o indivíduo já é considerado hipercolesterolêmico.

A hipercolesterolemia pode desenvolver-se tanto por condições dietéticas inadequadas (e.g., consumo excessivo de alimentos hipercalóricos e ricos em colesterol) como por condições genéticas em que existam mutações deletérias em genes que codificam proteínas importantes no metabolismo do lipídeo, bem como pela sinergia destes fatores (XAVIER et al., 2013). Devidos aos atuais hábitos alimentares, principalmente em países desenvolvidos, baseados principalmente no consumo de alimentos processados e hipercalóricos, observa-se, atualmente, uma epidemia de obesidade. Segundo estimativas, em torno de 35% da população norte americana adulta, e entre 15 a 20% das crianças, são obesos (MITCHELL et al., 2011). No Brasil, segundo dados publicados pelo Ministério da Saúde em 2016, a obesidade cresceu cerca de 60% em dez anos e, atualmente, 61% das pessoas entre 25 e 34 anos estão com excesso de peso. Um outro estudo publicado também em 2016 (BLOCH et al., 2016), onde mais de 17 mil adolescentes (12 – 17 anos) brasileiros de ambos os sexos foram avaliados, mostrou que 17,1% dos indivíduos encontram-se com sobrepeso e 8,4% já estão com obesidade.

O acúmulo de LDL no sangue ocasiona lesões nos tecidos das artérias, conhecidas como estrias gordurosas. Mantendo as condições lipídicas elevadas essas estrias podem, por meio da agregação de mais

LDLs, desenvolverem-se em placas ateroscleróticas. Estas placas alteram a estrutura do lúmen de diferentes artérias interrompendo, ou mesmo impedindo, o fluxo sanguíneo. Por consequência, tal condição pode induzir doenças isquêmicas, como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular encefálico (STONE et al., 2011). Anichkov, em 1920 (Fig. 1), descobriu o papel do colesterol na patogênese da aterosclerose, demonstrando os tipos celulares envolvidos no processo aterosclerótico, dentre eles células musculares lisas, macrófagos e linfócitos. A inflamação é cada vez mais reconhecida como uma característica essencial da aterosclerose e um potencial alvo para terapia. Em 1950, Gofman estabeleceu o papel determinante do colesterol no desenvolvimento de doenças cardiovasculares; portanto, tornou-se essencial determinar os mecanismos de absorção, síntese, armazenamento e transporte do colesterol (MANUEL-APOLINAR et al., 2016). Durante a década de 70, o microbiologista Akira Endo foi um dos responsáveis pelo desenvolvimento de um dos principais tratamentos para a diminuição do colesterol LDL até os dias de hoje, por meio do isolamento da lovastatina a partir de culturas de fungos *Aspergillus terreus* (ALBERTS et al., 1980). A partir do desenvolvimento da lovastatina, seguiu-se o desenvolvimento de outras estatinas pelas indústrias farmacêuticas, como a sinvastatina (derivado semissintético da lovastatina, aprovada para comercialização em 1988), a pravastatina (derivado da compactina, aprovada para comercialização em 1991), e estatinas totalmente sintéticas, como a fluvastatina (comercializada a partir de 1994), atorvastatina (1997), cerivastatina (1998) e a rosuvastatina (2003) (MOREIRA, 2013). A terapia com estatina foi aceita como terapia padrão com baixo risco. Apesar de sua capacidade de redução de LDL, tais fármacos não apresentam a mesma eficiência no aumento de HDL. Tendo em vista que o risco coronariano aumenta de 1% até 3% para cada 1% de redução no nível de colesterol HDL, estudos vêm apontando para uma terapia combinada de redução de LDL e aumento de HDL. Neste sentido, várias classes de drogas com efeitos de aumento de HDL têm sido associadas a reduções nas taxas de eventos cardiovasculares (STROES, 2005).



Figura 1: Pesquisadores eminentes no estudo do colesterol. Eugene Chevreul nomeou cholesterine (mais tarde chamado de colesterol) a partir de cálculos biliares. Felix Marchand, cunhou o termo aterosclerose. Adolf Windaus trabalhou na constituição de esteróis e sua conexão com vitaminas. Nikolai Anichkov descobriu o significado e o papel do colesterol na patogênese da aterosclerose. John Gofman identificou e distinguiu as três principais classes de lipoproteínas do plasma. Akira Endo desenvolveu os fármacos estatinas. Jules Hirsh estabeleceu os fundamentos biológicos da obesidade. Brown e Goldstein descobriram receptores de lipoproteínas, principalmente densidade baixa. Adaptado de (MANUEL-APOLINAR et al., 2016).

1.2 Efeitos da hipercolesterolemia sobre o Sistema Nervoso Central

Comprometimento cognitivo leve é definido com a zona de transição entre o envelhecimento saudável e a demência leve (MARIANI; MONASTERO; MECOCCI, 2007). Esta condição refere-se a indivíduos que têm algum grau de perda cognitiva quando comparados a pessoas normais da mesma faixa etária, mas que não preenchem critérios para demência, podendo representar, em alguns casos, um estágio de transição entre as alterações cognitivas que fazem parte do envelhecimento normal e os primeiros sintomas da doença de

Alzheimer (DA) (BRUSCOLI; LOVESTONE, 2004). Geralmente, esses indivíduos têm graus muito baixos de comprometimento funcional e a maioria dos clínicos tem dificuldade em distinguir esses problemas funcionais daqueles encontrados em indivíduos normais à medida que envelhecem (Fig. 2). Em um subconjunto de pessoas, em particular aquelas que estão propensas a desenvolver a DA, há um declínio na função cognitiva, que pode ser muito sutil no início. Até cerca de 80% das pessoas com comprometimento cognitivo leve podem progredir para demência dentro de 5 anos (PETERSEN, 2004).

Em um estudo publicado em 1999, de la Torre e colaboradores (DE LA TORRE, 1999) propuseram a associação entre envelhecimento e fatores de risco cardiovasculares (e.g., aterosclerose das artérias carótidas) como um gatilho primário levando à hipoperfusão cerebral, a mudanças neurodegenerativas e ao eventual início da DA. De fato, além de principal fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e, conseqüentemente, doenças arteriais coronarianas, evidências têm apontado condições hipercolesterolêmicas como fator de predisposição ao desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve e doenças neurodegenerativas, como a DA (KIVIPELTO, 2005; MURDOCK et al., 2013; RUSANEN et al., 2014).

Em especial, um estudo publicado por Kivipelto e colaboradores (KIVIPELTO et al., 2001), demonstrou que indivíduos que apresentam elevados níveis de colesterol plasmático (≥ 250 mg/dl) durante a meia-idade apresentam risco aumentado de desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve e DA em idades mais avançadas. Este estudo utilizou dados publicados em estudos anteriores (por exemplo, o Projeto Norte Karelia na Finlândia, feito na década de 1970, e que foi um grande programa de prevenção de doenças cardiovasculares), e convidou os participantes para uma reavaliação em 1998 (ao total, 1.449 indivíduos participaram do estudo). Todavia, os mecanismos moleculares pelos quais os níveis de colesterol contribuem ao desenvolvimento de prejuízos cognitivos e na patofisiologia de doenças neurodegenerativas ainda não estão totalmente elucidados (COSTA et al., 2017).

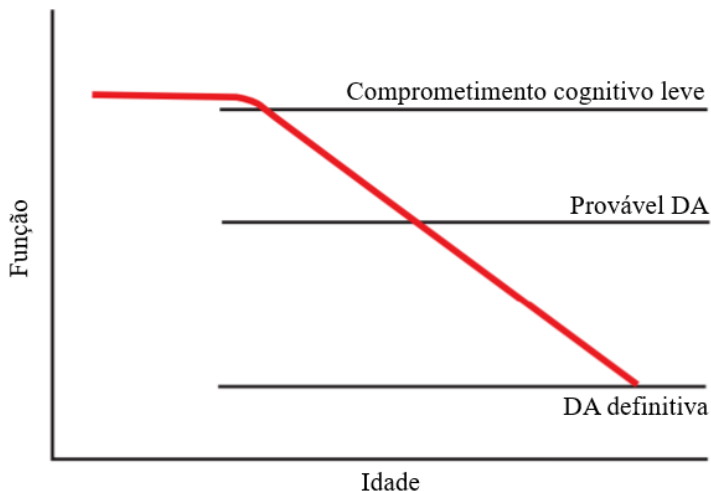


Figura 2: Mudança hipotética da função cognitiva de um indivíduo durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA). Adaptado de (PETERSEN, 2004).

Mais recentemente, Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2005) descobriram que a alta ingestão de colesterol está fortemente correlacionada com um baixo desempenho em testes cognitivos de crianças em idade escolar. Ainda, Attuquayefio e colaboradores (ATTUQUAYEFIO et al., 2017) em um estudo envolvendo jovens saudáveis e com baixo índice de gordura corporal, mostraram que mesmo um breve consumo de uma dieta estilo ocidental leva a deficiências na aprendizagem e em memórias dependentes do hipocampo. Além disso, evidências clínicas mostram que uma dieta rica em alimentos gordurosos diminui o volume do hipocampo, prejudica a função cognitiva, incluindo memória, eficiência psicomotora e atenção (Tabela 1) (JACKA et al., 2015).

Tabela 1: Estudos em humanos: efeitos da dieta na cognição

Composição da dieta	Resultados cognitivos	Mecanismos biológicos postulados	Referências
Alta ingestão de ácido linoleico	Pior desempenho no Mini Exame do Estado Mental	Estresse oxidativo	41
Dieta pobre* resultando em prejuízo na tolerância à glicose	Pior desempenho no Mini Exame do Estado Mental	Distúrbio no metabolismo de glicose	47
Baixa ingestão de gorduras monossaturadas e saturadas	Melhor desempenho no Mini Exame do Estado Mental e no Questionário de estado mental de Pfeiffer	Estresse oxidativo, falta de micronutrientes como vitamina C, B9 e zinco	41
Alta ingestão de gorduras saturadas e trans	Declínio de desempenho em: Teste Boston de memória, Mini Exame do Estado Mental e Teste Modalidade Símbolo-Dígitos	Níveis de colesterol aterogênico	42
Alta ingestão de ácidos graxos poli-insaturados n-3 e ácido docosaenoico	Risco reduzido de doença de Alzheimer	Não discutido	44
Aumento da ingestão de calorias e da ingestão de colesterol	Pior desempenho no tempo de reação simples, substituição símbolo-dígito e aprendizagem de dígito serial	Não discutido	43

*dieta que contém grandes quantidades de carne vermelha, açúcares refinados, alimentos ricos em gorduras e grãos refinados. Adaptado de (FREEMAN et al., 2014)

Consistente com estes achados clínicos, um extenso corpo de dados obtidos em estudos com animais sugere que uma dieta no estilo

ocidental, caracterizada pela alta ingestão de gorduras saturadas e açúcares adicionados, causa prejuízos rápidos na aprendizagem e memórias dependentes do hipocampo (CORDNER; TAMASHIRO, 2015; FREEMAN et al., 2014; MOREIRA, 2014; STRANAHAN et al., 2008). Em 1990, Greenwood e Winocur (GREENWOOD; WINOCUR, 1990) publicaram um dos primeiros estudos revelando os efeitos de uma dieta rica em colesterol no aprendizado e na memória em ratos. As bases biológicas das deficiências cognitivas induzidas por HFD (do inglês *high fat diet*) em roedores se sobrepõem substancialmente às condições neurodegenerativas, incluindo disfunção mitocondrial (DE OLIVEIRA et al., 2011), dano oxidativo (WU; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004), processos inflamatórios (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008), disfunção vascular (LI et al., 2010), neurogênese reduzida e perda da integridade dendrítica (STRANAHAN et al., 2008).

Contudo, não está até o momento esclarecido, como o colesterol plasmático poderia afetar as funções cerebrais, uma vez que colesterol não transpassa a barreira hemato-encefálica (DIETSCHY E STEPHEN, 2001). Neste sentido, os neurônios sintetizam o colesterol durante os períodos de desenvolvimento, contudo, neurônios maduros perdem progressivamente esta propriedade, obtendo colesterol a partir de outras células, como os astrócitos (PFRIEGER; UNGERER, 2011). De acordo com estudos *in vitro* com células cultivadas, os astrócitos sintetizam pelo menos 2 a 3 vezes mais colesterol que os neurônios e fibroblastos (BJÖRKHEM; MEANEY; FOGELMAN, 2004). O encéfalo elimina o excesso de colesterol por meio da formação e excreção na circulação de oxiesteróis, os quais apresentam um importante papel na regulação da homeostase de colesterol no SNC. Em células neuronais, o colesterol é, principalmente, convertido pela enzima colesterol 24-hidroxilase (CYP46A1) em 24-hidroxicolesterol (24-OH), o qual, ao contrário do colesterol, é capaz de transpassar a barreira hemato-encefálica (BHE), passando à corrente sanguínea (PFRIEGER; UNGERER, 2011). Por outro lado, o 27-hidroxicolesterol é capaz de transpassar a barreira hemato-encefálica (HEVERIN et al., 2005), e, devido à direta correlação entre os níveis de colesterol e de 27-hidroxicolesterol na circulação sanguínea (A. BABIKER et al., 2005), é provável que o aumento nos níveis de colesterol plasmático resulte em um aumento na captação cerebral de 27-hidroxicolesterol (SHAFATI et al., 2011).

A condição inflamatória periférica associada à hipercolesterolemia desencadeia danos à BHE levando ao extravasamento de proteínas séricas. As células do sistema imunológico periférico interagem com o endotélio cerebral ativado, induzindo

cascatas de sinalização intracelular, produção de mediadores inflamatórios e alterações nas junções oclusivas (Fig. 3) (TAKEDA; SATO; MORISHITA, 2014; XIONG et al., 2008). Além disso, citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α são exemplos de citocinas que orquestram a resposta inflamatória frente a muitos estímulos, tanto sistemicamente quanto no encéfalo. Mais importante ainda, essas citocinas também são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (FREEMAN et al., 2014), o que resulta em efeitos diretos relacionados à cognição, já que os receptores de IL-1 e IL-6 estão localizados em todo o encéfalo, mas são altamente expressos no hipocampo (PARNET et al., 2002). Em um estudo de revisão publicado em 2014, Brosseron e colaboradores (BROSSERON et al., 2014) identificaram que a IL-6 plasmática aumenta ao longo do desenvolvimento da DA, ao passo que os receptores desta mesma interleucina parecem diminuir em pacientes também com DA. A IL-6 também apresenta um comportamento interessante em estudos com roedores, mostrando-se prejudicial para a proliferação e sobrevivência de células progenitoras no encéfalo de camundongos adultos nocaute para IL-6 (KELLIE K. BOWEN, 2011). Por outro lado, camundongos que superexpressam IL-6, apresentam uma diminuição acentuada na neurogênese durante os primeiros meses de vida (VALLIÈRES et al., 2002). A homeostase dos mecanismos inflamatórios parece ser importante nestes casos, sendo que tanto a falta quanto o excesso de IL-6 parecem não ser benéficos (KELLIE K. BOWEN, 2011).

Os danos relacionados a exposição de dietas ricas em gorduras também afetam proteínas de relação direta com o crescimento e desenvolvimento neuronal, como por exemplo o fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *brain derived neurotrophic factor* BDNF). Estudos mostram que dietas podem afetar negativamente tanto a concentração (WU; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004) como a expressão gênica de BDNF (KARIMI; MOTAMEDI; RANJBAR, 2018). Além do BDNF, outros marcadores de plasticidade sináptica também podem ser alterados de acordo com a dieta, por exemplo Dingess e colaboradores (DINGESS et al., 2018) mostraram que uma dieta rica em gorduras (60% de gorduras) diminui a densidade e o tipo de espinhos dendríticos na região do córtex infra-límbico de ratos machos. Em um outro estudo, Wu e colaboradores (WU; LIU; KALAVAGUNTA, 2018) utilizando uma dieta enriquecida com colesterol (2% colesterol), observaram uma perda neuronal notável de 39,1%, 51,15% e 79,7% nas sub-regiões DG, CA1 e CA3 do hipocampo de camundongos alimentados com a dieta colesterol em comparação

com o grupo controle. A potenciação de longa duração, um dos fenômenos biológicos que contribuem para a plasticidade sináptica, também parece ser prejudicada pela exposição a uma dieta rica em gorduras (KARIMI et al., 2013).

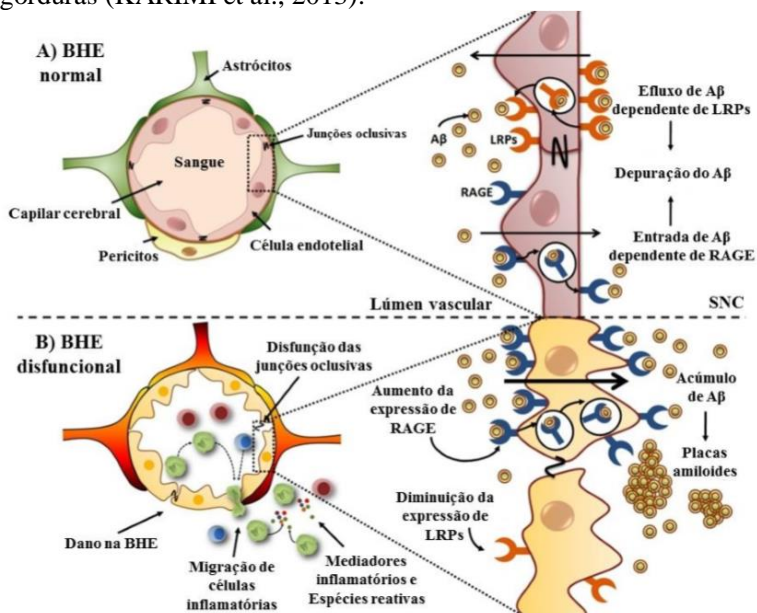


Figura 3: Influência da hipercolesterolemia na integridade da barreira hematoencefálica (BHE). A BHE é formada pelas junções oclusivas que conectam as células endoteliais aos capilares que irrigam o parênquima cerebral. Juntamente com a lâmina basal, os processos astrocíticos e os pericitos formam a unidade neurovascular. (A) Situações normais e (B) Situações patológicas, e.g., a hipercolesterolemia, onde ocorrem danos na BHE (disfunção das junções oclusivas) (OLIVEIRA, 2015) adaptado de (MOREIRA et al., 2014).

Como dito anteriormente, as estatinas oferecem uma estratégia para atenuar tais danos causados pela elevação do colesterol, já que as mesmas podem atuar inibindo a síntese de colesterol no sistema nervoso central (SNC) por meio da inibição da enzima HMG-CoA redutase (THOMPSON et al., 2016). No entanto, a segurança das estatinas não parece estar bem consolidada, sendo motivo de preocupação em questões de desempenho cognitivo, o que levou a FDA (Food and Drug Administration) a alterar o rótulo das estatinas em 2012 com o aviso:

"Perda de memória e confusão foram relatadas com o uso da estatina. Esses eventos relatados geralmente não são sérios e vão embora uma vez que a droga não é mais utilizada".

Embora abordagens farmacológicas e não farmacológicas tenham sido utilizadas com relativo sucesso no manejo da obesidade e doenças relacionadas, em um estudo anterior do nosso grupo, enfatizou-se as vantagens da atividade física em comparação com drogas hipolipemiantes no manejo de déficits cognitivos associados a um camundongo modelo de hipercolesterolemia familiar humana (MOREIRA, 2013). De fato, há um interesse crescente em estratégias não farmacológicas para o tratamento de doenças, como exercício físico, dieta ou estimulação cognitiva, não apenas para melhorar a saúde geral e a função cognitiva, mas também o bem-estar e a qualidade de vida. Na Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017, a prática de atividade física aparece como recomendação de grau I (mais elevado) como tratamento não medicamentoso.

De fato, a inatividade física e a ingestão calórica excessiva, que caracterizam o estilo de vida ocidental contemporâneo (FREESE et al., 2018; ZOBEL et al., 2016), são fatores importantes que podem induzir distúrbios metabólicos, como obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (FRANKENBERG, ANDRÉ F. REIS, 2017; JANNASCH; KRO; SCHULZE, 2017).

1.3 Enriquecimento ambiental

Devido ao aumento do consumo de dietas ricas em gordura (HFD) e os problemas de saúde relacionados (por exemplo, obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e deficiências cognitivas), o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes é de extrema importância. Neste sentido, os efeitos da estimulação física e cognitiva no encéfalo e no comportamento são modelados em roedores usando um paradigma chamado ambiente enriquecido (AE) (FRICK, KARYN M.; BENOIT, 2015). O AE (Fig. 4) consiste em uma ferramenta experimental no qual os animais são expostos a um ambiente que fornece uma variedade de estímulos cognitivos, sensoriais e motores (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Este paradigma foi primeiramente descrito, em um contexto neurocientífico, no final da

década de 40 por Donald Olding Hebb (HEBB, 1947), quando o neurocientista relatou uma melhora no comportamento dos ratos que eram criados livremente em sua casa, quando comparados com aqueles que eram mantidos em gaiolas no laboratório. Muitos estudos têm mostrado que a exposição ao ambiente enriquecido promove benefícios fisiológicos, morfológicos, bem como alterações na plasticidade neuronal incluindo: aumento da arborização dendrítica, gliogênese, neurogênese, e modificações na expressão de genes ligados à plasticidade neuronal. Em decorrência disso, a exposição ao ambiente enriquecido parece melhorar o aprendizado e a memória (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000); diminuir o estresse (LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002), a ansiedade (LAMBERT; FERNANDEZ; FRICK, 2005) e a depressão (BRENES; FORNAGUERA, 2008); atenuando danos ao cérebro (WILL et al., 2004) e diminuindo a insurgência de doenças neurodegenerativas (HANNAN, 2006). Ademais, não só alterações comportamentais estão associadas ao enriquecimento ambiental. Com o AE, os camundongos encontram novidades, interação social e atividade física (Fig. 5). Em particular, o AE tem efeitos positivos na função encefálica, incluindo arborização dendrítica, sinaptogênese e neurogênese e melhora da memória em várias tarefas de aprendizado (PRAAG et al., 2000). Os efeitos benéficos do AE estão parcialmente relacionados com mecanismos que melhoram as vias neuroprotetoras e neuromoduladoras, por exemplo, através do aumento de BDNF (WOLF et al., 2006). Além disso, o AE pode alterar as concentrações de citocinas, vários componentes do sistema imunológico e células gliais, sugerindo que este pode ser um potencial mecanismo de ação para como ele modula a função encefálica (SINGHAL et al., 2014). Diversos estudos também demonstram que esta pode ser uma importante ferramenta na resposta anti-inflamatória. Exposição a novos objetos e acessórios, em conjunto com exercício físico (roda de correr), resultam em uma menor expressão de IL-1B e TNF α no hipocampo de camundongos (SINGHAL et al., 2014). Além da diminuição destas citocinas pró-inflamatórias, também se observou um aumento nas concentrações de citocinas anti-inflamatórias, como IL-6 e IL-10.

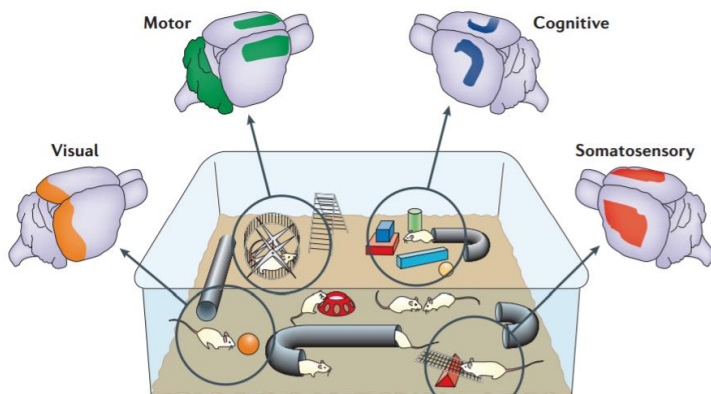


Figura 4: Enriquecimento ambiental e os efeitos da estimulação sensorial na melhora cognitiva e motora em diferentes áreas do encéfalo. O enriquecimento ambiental pode promover ativação neuronal, sinalização e plasticidade em várias regiões do encéfalo. A estimulação sensorial, incluindo somatossensorial e visual, ativa os córtices somatossensoriais (vermelho) e visual (laranja). O aumento da estimulação cognitiva por exemplo, a codificação de informações relacionadas a mapas espaciais, reconhecimento de objetos, novidade e modulação da atenção, provavelmente ativarão o hipocampo (azul) e outras áreas corticais. Além disso, a atividade motora aprimorada, como movimentos exploratórios naturais (incluindo habilidades motoras finas que diferem da roda de corrida), estimula áreas como o córtex motor e o cerebelo (verde). Adaptado de (HANNAN, 2006).

O AE também oferece estimulação física e social complexa que leva a uma melhora na saúde metabólica. Por exemplo, Cao e colaboradores (CAO et al., 2011) demonstraram que o AE diminui a adiposidade, aumenta o gasto energético, causa resistência à obesidade e induz uma transformação genética, morfológica e funcional do tecido adiposo branco ao tecido adiposo marrom. Diante de tantos efeitos benéficos, a presente dissertação teve como objetivo investigar o desempenho cognitivo e os efeitos metabólicos do AE em camundongos alimentados com dieta hipercolesterolêmica (DH).

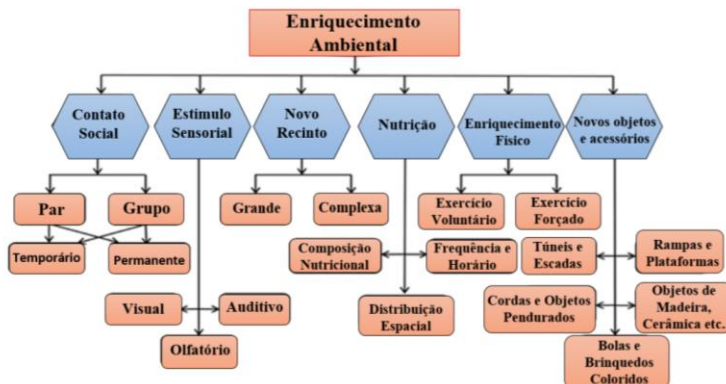


Figura 5: Enriquecimento ambiental para roedores em cativeiro pode ser obtido fornecendo contato social (par, grupo, permanente, temporário), atividade física utilizando rodinhas de corrida, recintos novos, maiores e mais complexos, objetos e acessórios novos, estímulo sensorial (visual, auditivo e olfatório), e uma melhor nutrição. Modificado de (SINGHAL et al., 2014). (PLÁCIDO, 2018).

1.4 Modelos experimentais para o estudo da hipercolesterolemia e suas consequências sobre o metabolismo e comportamento

Distúrbios metabólicos induzidos pela alimentação rica em gorduras em roedores assemelham-se às características humanas (WOODS et al., 2003). Por exemplo, vários estudos com roedores indicam que a dieta rica em gordura (HFD, do inglês *high fat diet*) diminui a sensibilidade à insulina ao passo que aumenta a concentração de colesterol no sangue e a massa corporal (BUETTNER R; SCHÖLMERICH J; BOLLHEIMER LC, 2007). Além disso, a HFD aumenta a massa de gordura visceral e os ácidos graxos livres circulantes, resultando em inflamação generalizada por meio da secreção de citocinas / adipocinas (XU et al., 2003).

De particular importância ao presente trabalho, a hipercolesterolemia tem sido associada a prejuízos de aprendizagem e memória em vários paradigmas comportamentais, incluindo o labirinto aquático e labirinto radial (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008; ULLRICH; PIRCHL; HUMPEL, 2010), memória aversiva ao contexto (HWANG et al., 2009), evasão passiva e ativa (GHODKE; TOUR;

DEVI, 2012; LEE et al., 2016), tarefa de identificação e localização de objetos (KNIGHT et al., 2014; MOREIRA et al., 2014) e teste de alternância espontânea (KNIGHT et al., 2014). Além disso, os camundongos nocaute para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLr-/-), um modelo experimental amplamente utilizado de hipercolesterolemia de origem familiar, exibem prejuízos de memória de trabalho (MULDER et al., 2004; OLIVEIRA; LUIZ; MOREIRA, 2014) e de formação de memórias de longo prazo aversivas (MOREIRA et al., 2012) e não-aversivas (MULDER et al., 2004; THIRUMANGALAKUDI et al., 2008).

Apesar das diferenças na absorção e metabolização de lipídeos (Tabela 2), roedores possuem uma proximidade filogenética e relativo baixo custo em sua manutenção, por conta disso, esse modelo animal vem sendo cada vez mais utilizado para o estudo dos efeitos da hipercolesterolemia e consequências no sistema cardiovascular (GETZ; REARDON, 2016). Para a indução de hipercolesterolemia em animais, têm-se utilizado dietas contendo colesterol, as quais variam de rações comerciais suplementadas com níveis substancialmente diferentes de colesterol (MACHADO, 2016) assim como modificações nas porções de lipídeos e carboidratos (DORNAS et al., 2009). Esta abordagem visa modelar uma condição de hipercolesterolemia ambiental, derivada da absorção de lipídeos por meio da dieta. Diversas composições de dieta podem ser observadas na literatura. Podem-se distinguir dietas enriquecidas em gordura daquelas enriquecidas com colesterol, sendo que, em geral, as primeiras apresentam altas taxas de gorduras totais (>50%) e nenhum acréscimo de colesterol (MACHADO, 2016). Por outro lado, dietas hipercolesterolêmicas são aquelas que possuem enriquecimento com colesterol, apresentando baixa adição de outros tipos de gordura (em torno de 20%), apenas o necessário para que o colesterol possa ser solubilizado e acrescentado à composição. Um dos primeiros trabalhos utilizando dieta enriquecida em colesterol em camundongos foi o trabalho de Wissler e sua equipe na década de 1960 (D. VESSELINOVITCH, 1967). Neste estudo verificou-se que camundongos alimentados com dieta enriquecida em 30% de gordura, 5% de colesterol e 2% de ácido cólico apresentavam hipercolesterolemia e estrias gordurosas em diversas regiões vasculares, porém sem indução de atividade inflamatória severa. Posteriormente, demonstrou-se que mesmo dietas com 15% de gordura total e enriquecida apenas com 1,25% de colesterol também ocasionam hipercolesterolemia em camundongos. Além de danos cardiovasculares, estudos mostram que o excesso de lipídios na dieta também causa alterações metabólicas como

diminuição na eficácia da liberação de insulina e consequente atraso no retorno dos níveis basais de glicose (AHRE; WINZELL, 2004).

Em particular, um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou prejuízo de memória espacial de referência e um aumento de cerca de 40% nos níveis de colesterol plasmático de camundongos Swiss expostos a uma dieta rica em colesterol (1,25%) por dois meses (MOREIRA et al., 2014).

Tabela 2: Comparação entre o metabolismo do colesterol em humanos e camundongos. (MACHADO, 2016).

Variável	Humanos	Camundongos
Absorção de colesterol da dieta	5 mg/dia/Kg	30 mg/dia/Kg
Total de colesterol biosintetizado	10 mg/dia/Kg	160 mg/dia/Kg
Taxa de produção de LDL	13 mg/dia/Kg	50 mg/dia/Kg
Depuração de colesterol LDL pelo fígado	70%	80%

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a inatividade física e os maus hábitos alimentares da chamada dieta ocidental são temas de grande preocupação mundial e que levam a uma série de doenças não transmissíveis, incluindo obesidade, doenças cardíacas, diabetes tipo II e até mesmo diminuição da expectativa de vida, o presente estudo procurou investigar um possível efeito protetor cognitivo e metabólico do AE em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura enriquecida com colesterol. Vários estudos mostraram importantes efeitos neuroprotetores do AE em roedores. No entanto, a grande maioria dos estudos que usam AE inicia a exposição antes ou junto com o insulto. A partir de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, sabemos que um mês de exposição à DH é suficiente para induzir déficits de aprendizado e memória, bem como várias alterações metabólicas, por exemplo, hipercolesterolemia, alterações neuroquímicas e redução da neurogênese. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar se, em uma amostra de camundongos que já estava sendo exposta à dieta hiperlipídica por 4 semanas, outro período de quatro semanas de exposição concomitante ao AE levaria a: (1) melhora memória espacial de curto prazo; (2) melhora dos parâmetros metabólicos, como níveis plasmáticos de colesterol, tolerância à glicose e ganho de peso e; (3) melhores parâmetros neuroquímicos, tais como os níveis de BDNF e citocinas inflamatórias. Especificamente, procuramos uma abordagem translacional, na qual os indivíduos ficariam expostos à inatividade física, bem como às dietas ricas em gordura, características da sociedade ocidental. A exposição ao AE começou após 4 semanas, enquanto a DH continuou a ser oferecida aos animais.

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, em camundongos *Swiss* machos, as alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas induzidas pela exposição a uma dieta enriquecida com colesterol (1,5%) e avaliar o impacto da concomitante exposição dos animais ao enriquecimento ambiental.

3.1 Objetivos específicos

3.1.2 Avaliação de parâmetros comportamentais

- a) Memória espacial de curto prazo no labirinto em T;
- b) Locomoção e comportamentos relacionados à ansiedade no teste de campo aberto;
- c) Memória de reconhecimento de curto prazo no teste de reconhecimento de objetos;

3.1.3 Avaliação de parâmetros metabólicos

- a) Acompanhamento semanal das alterações da massa corporal e quantificação da ingestão de ração;
- b) Avaliação da ação da insulina, por meio do teste de tolerância à glicose;
- c) Mensuração da concentração plasmática de colesterol.

3.1.4 Avaliação de parâmetros neuroquímicos

- a) Quantificação da concentração de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal;
- b) Quantificação da concentração da citocina Interleucina – 6 no hipocampo e córtex pré-frontal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos swiss, machos, com 3 meses de idade ao início dos experimentos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brasil), e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências e Comportamento no Departamento de Ciências Fisiológicas. Foram mantidos em grupos de 8-9 animais por gaiola numa sala sob temperatura controlada (23 ± 1 ° C) e sujeitos a um ciclo de luz de 12 horas (luzes às 7:00 da manhã) com acesso livre a comida e água. Todos os procedimentos utilizados estão de acordo com as diretrizes preconizadas pelo do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (protocolo 1793080916).

4.2 Drogas e Químicos

D - (+) - glicose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO); Glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnostic); Kit de Colesterol (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Minas Gerais, Brasil); Solução salina tamponada com fosfato, fluoreto de fenilmetilsulfonilo, cloreto de benzetônio, tween 20, EDTA e aprotinina (Sigma Aldrich, St Louis, MO); kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

4.3 Condições de Habitação

Os camundongos do ambiente padrão (AP) foram alojados em caixas de plástico transparentes com tampas de grades metálicas (38 cm x 32 cm x 17 cm). Por outro lado, os camundongos do AE foram alojados em caixas plásticas maiores (44 cm x 32 cm x 18 cm), contendo uma variedade de estímulos, por exemplo, uma roda de corrida, tubos de plástico, escadas, bolas de borracha e um abrigo de madeira, como previamente estabelecido em nosso laboratório (MOREIRA et al., 2014). Esses itens foram alternados e/ou trocados da gaiola a cada 3-4 dias. Os animais foram mantidos 24 h por dia em grupos de 8-9 animais para as condições AP e AE desde o início e durante toda a duração dos experimentos comportamentais.

4.4 Desenho Experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n = 18 por grupo) e alimentados diariamente durante 8 semanas com duas diferentes dietas: dieta padrão (DP) para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital; Quimtia Nutrientes SA, Colombo, PR, Brasil) e (DH) dieta hipercolesterolêmica (20% de gordura e 1,5% de colesterol; Rhooster Indústria e Comércio, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). Após 4 semanas, metade dos animais de cada grupo foram expostos a um período de quatro semanas de ambiente padrão AP ou AE. Após esse período, os camundongos foram submetidos a vários testes comportamentais, incluindo teste de alternância forçada (dia 1), campo aberto (dia 2) e teste de reconhecimento de objeto (dia 3). Todos os testes comportamentais foram realizados por um experimentador cego para os grupos experimentais. Após o término dos testes comportamentais, os camundongos foram privados de alimentos por seis horas e o teste de tolerância à glicose foi realizado (dia 4). Um dia depois, os animais foram novamente privados de alimentos durante seis horas e o sangue foi coletado do coração para determinar os níveis de colesterol no plasma (dia 5). Posteriormente, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados para determinar os níveis de BDNF e de IL-6 (Fig. 6).

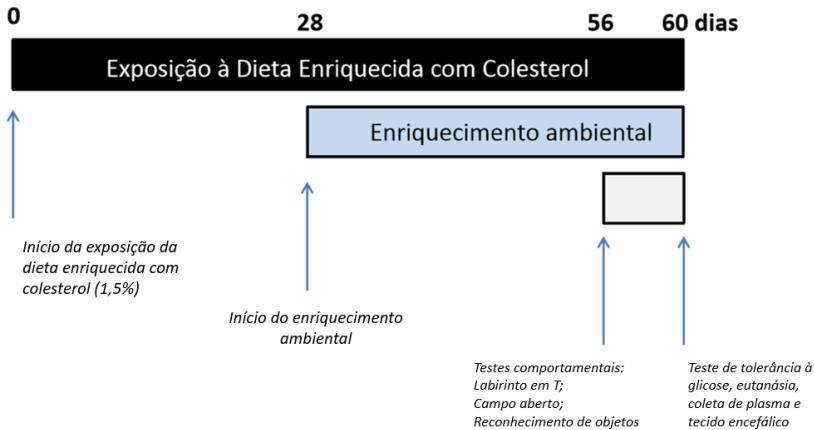


Figura 6: Delineamento experimental. (DE SOUZA et al., 2018).

4.5 Tarefas Comportamentais

4.5.1 Teste de alternância forçada (Labirinto em T)

O comportamento exploratório é um importante componente na tarefa de aprendizado, assim, o teste de alternância forçada oferece tarefas de discriminação esquerda-direita usando o labirinto em T para avaliar a memória de trabalho e de referência espacial em roedores. Nas tarefas do labirinto em T, sabe-se que os roedores podem usar diferentes estratégias para executar as tarefas, com base em pistas espaciais e não espaciais, tais como pistas fora do labirinto, configuração das pistas na sala de experimento, orientação do labirinto e assim por diante (SHOJI et al., 2012). Dessa forma é possível avaliar o aprendizado do animal de acordo com o comportamento exploratório apresentado acerca do tempo e número de entradas em cada braço do aparato.

No presente estudo, testes de alternância forçada foram conduzidos utilizando um labirinto em T simétrico, feito de madeira pintada de preto. Cada braço do labirinto em T tinha 30 cm de comprimento, 9 cm de largura e 12 cm de altura, e a parede no final de cada braço era marcada com um padrão preto e branco diferente. Para reduzir o estresse dos animais, a luz na área de teste foi reduzida para 30 ± 5 lux. O protocolo de alternância forçada foi adaptado de Wolf e colegas (WOLF et al., 2016). O teste consistiu em uma sessão de treinamento de 5 min (T1) seguido por um teste de 5 min (T2) (Fig. 7). Em T1, o camundongo foi colocado no final do braço inicial, de frente para a parede e longe do centro. O camundongo tinha disponível para explorar, dois braços do labirinto em T, enquanto a entrada no terceiro braço foi bloqueada. Após a sessão de treinamento, o camundongo foi devolvido à caixa de origem por um intervalo de 30 minutos entre os testes. Em T2, o bloqueio no braço 3 foi removido, o camundongo foi novamente colocado no braço inicial e, em seguida, permitido o acesso a todos os três braços do labirinto. Para minimizar a presença de trilhas olfativas, o labirinto foi completamente limpo com etanol a 10% após cada tentativa. O número de entradas (definido pela colocação das quatro patas em um braço) e o tempo gasto em cada braço foram registrados. Tempo no braço novo [%] foi definido como o tempo gasto no braço novo dividido pelo tempo gasto em todos os braços durante o teste T2. Alternância forçada [%] foi definida como a porcentagem de camundongos entrando primeiro no braço novo durante o T2.

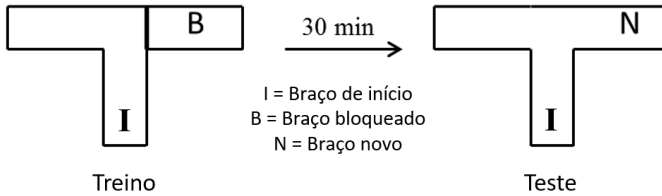


Figura 7: Teste do labirinto em T (DE SOUZA et al., 2018).

4.5.2 Teste de reconhecimento de objetos

Este tipo de teste foi derivado de um paradigma de comparação visual emparelhada amplamente utilizado tanto em humanos como em primatas não humanos, em que um estímulo familiar e um novo são emparelhados e em que o reconhecimento é inferido do olhar preferencial para o novo alvo, fazendo com que também se permita comparações interespecíficas. Tais qualidades tornaram o teste de reconhecimento de objetos muito popular em pesquisas experimentais sobre memória (LEGER et al., 2013).

O aparato experimental usado neste estudo foi uma caixa de campo aberto (50 cm de largura x 50 cm de profundidade x 40 cm de altura) feita de PVC transparente, colocada em uma sala iluminada com 30 lux e isolada por som. No dia 1 dos testes, foi realizado um experimento de habituação onde os camundongos puderam explorar a caixa de teste vazia por 5 min. Vinte e quatro horas após o experimento de habituação (dia 2), foi realizado um treinamento. No treinamento do dia 2, dois objetos de amostra iguais (por exemplo, dois cubos) foram introduzidos no campo aberto. Os camundongos foram colocados no centro do aparato com dois objetos idênticos por 5 minutos. Os objetos foram colocados a 7 cm das paredes do campo aberto. A exploração dos objetos foi registrada usando um cronômetro quando os camundongos cheiraram ou olharam os objetos a não mais de 1 cm de distância. Após a fase de treinamento, os camundongos foram removidos do aparelho por 90 minutos. Após esse intervalo entre treino e teste, o objeto antigo (mesmo da sessão de treino) e um objeto novo, de outro formato (por exemplo, um cubo e uma esfera) foram introduzidos e a interação com os objetos foi novamente registrada por 5 minutos. O tempo gasto pelos animais explorando os objetos novos e antigos foi registrado durante os

5 min. Para minimizar a presença de pistas olfativas, os objetos foram cuidadosamente limpos com 10% de etanol após cada tentativa. Para analisar o desempenho cognitivo, foi calculado um índice de localização: $(T \text{ novo} \times 100) / (T \text{ novo} + T \text{ antigo})$, onde T novo é o tempo gasto explorando o objeto novo e T antigo é o tempo gasto explorando o objeto antigo.



Figura 8: Teste de reconhecimento de objetos. Adaptado de <http://www.bris.ac.uk/synaptic/research/projects/memory/recognition-memory/memory-tasks.html>

4.6 Análises bioquímicas

A concentração de glicose foi avaliada após 6 horas de jejum calórico e após a administração de 2 g / kg de D - (+) - glicose (Sigma Aldrich, St Louis, MO) via i.p. A glicose no sangue foi medida a partir da ponta da cauda no tempo basal (imediatamente antes da administração de glicose), 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose, usando um glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnostic). Um dia depois, os camundongos foram novamente privados de comida por seis horas, sendo posteriormente anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (xilazina 10 mg/kg e cetamina 100 mg/kg, via intraperitoneal) e o sangue foi coletado por punção cardíaca, imediatamente centrifugado a $3.000 \times g$ e o plasma congelado em freezer -80°C . O colesterol total (CT) foi medido no plasma usando o kit colorimétrico enzimático de acordo com as instruções do fabricante (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Minas Gerais, Brasil).

4.7 Análises Neuroquímicas

Para a determinação dos níveis de BDNF e IL-6 no hipocampo e no córtex pré-frontal, os encéfalos foram removidos e o hipocampo e o

córtex pré-frontal foram imediatamente dissecados e homogeneizados com tampão PBS contendo Tween 20 a 0,05%, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM, cloreto de benzotônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e 20 IU de aprotinina A. Os homogenatos foram centrifugados a $3000 \times g$ durante 10 min, e os sobrenadantes foram armazenados a -80°C até serem realizados ensaios para a determinação dos níveis de IL-16 e BDNF. Os níveis de IL-6 e BDNF foram avaliados utilizando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), e os resultados são expressos em picogramas por miligrama de proteína em cada amostra. A quantidade de proteína foi avaliada pelo método de Bradford (1976). A albumina sérica bovina (Sigma) foi usada como padrão.

4.8 Análise estatística

Os dados são expressos como média + EPM. O teste de alternância forçada (labirinto em T) e a tarefa de reconhecimento de objetos foram analisados por testes “t” de student para determinar se a porcentagem de tempo gasto no braço novo ou o índice de reconhecimento diferiam do desempenho de chance (33% ou 50%, respectivamente). As outras análises estatísticas foram realizadas usando uma análise de variância de duas vias (ANOVA), com medidas repetidas quando apropriado. Após ANOVA significativa, realizaram-se comparações múltiplas utilizando o teste *post hoc* de Newman Keuls. O nível de significância aceito para todos os testes foi $P \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o pacote de software STATISTICA® (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Labirinto em T

Em primeiro lugar, a memória de referência espacial de camundongos foi avaliada usando um teste de labirinto em T modificado (Fig. 7). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos com relação ao número de cruzamentos totais ao longo dos braços do aparato na sessão de treinamento (Fig. 9a) e na sessão teste (Fig. 9b). Por outro lado, como mostrado na Fig. 9c, a exploração do braço novo no grupo de camundongos tratados com DH, mantidos no AP, foi significativamente prejudicada, uma vez que não houve diferença entre o tempo percentual gasto explorando o novo braço e a porcentagem de chance (33%) ($t = 0,70$, $df = 7$, $P = 0,51$). O AE reverteu o déficit causado pela DH na exploração do braço novo, ou seja, os animais apresentaram um aumento significativo na porcentagem de tempo gasto explorando o novo braço em comparação com a porcentagem de chance ($t = 3,65$, $df = 8$, $P < 0,01$). Para ambos os grupos controle (dieta padrão AP e dieta padrão AE), a porcentagem de tempo gasto explorando o braço novo foi significativamente maior em comparação com a chance ($t = 2,86$, $df = 8$, $P < 0,05$ e $t = 2,35$, $df = 7$, $P < 0,05$, respectivamente). Além disso, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator ambiente [$F(1, 30) = 6,53$, $p < 0,05$] na porcentagem de alternância forçada (ou seja, a porcentagem de camundongos entrando primeiro no braço novo durante o teste). No entanto, comparações *post hoc* subsequentes não revelaram diferenças significativas entre os grupos (fig. 9d).

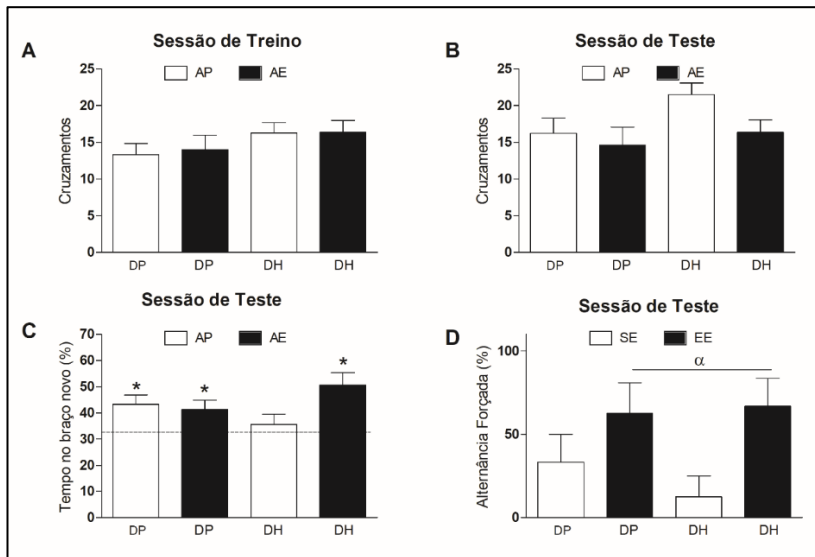


Figura 9: Teste de Alternação Forçada (Labirinto em T). (A) Total de cruzamentos durante o treinamento. (B) Cruzamentos totais durante o teste experimental. (C) Tempo (%) gasto no novo braço durante o teste. (D) Alternância forçada (%) no teste. Os dados são expressos como média + EPM. * $P < 0,05$ versus nível de chance (33% do tempo gasto explorando o novo braço no teste). Efeito ambiente ($p < 0,05$; análise de variância de duas vias). DP (dieta padrão); DH (dieta hipercolesterolêmica); AP (ambiente padrão); AE (ambiente enriquecido).

5.2 Teste de campo aberto

Com relação ao número de cruzamentos totais, a ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos para o fator dieta [$F(1, 30) = 4,37$, $p < 0,05$] e para o fator ambiente [$F(1, 30) = 6,76$, $p < 0,05$]. Análises *post hoc* subsequentes demonstraram um aumento significativo na atividade locomotora de camundongos tratados com DH, expostos ao AP, em comparação com camundongos tratados com DP, expostos ao AP ($P < 0,05$) (Fig. 10a). Por outro lado, nenhuma diferença foi observada entre os grupos em relação ao número de levantamentos verticais (Fig. 10b) e porcentagem de cruzamentos centrais (Fig. 10c). Em contraste, observou-se um aumento significativo no tempo gasto no centro do aparato em camundongos tratados com DH expostos ao AE

em comparação com camundongos tratados com DP e expostos ao AE ($P < 0,05$) (Fig. 10d). A ANOVA de duas vias indicou um efeito principal significativo para o fator dieta [$F(1, 30) = 10,09, p < 0,005$] no tempo gasto no centro (segundos).

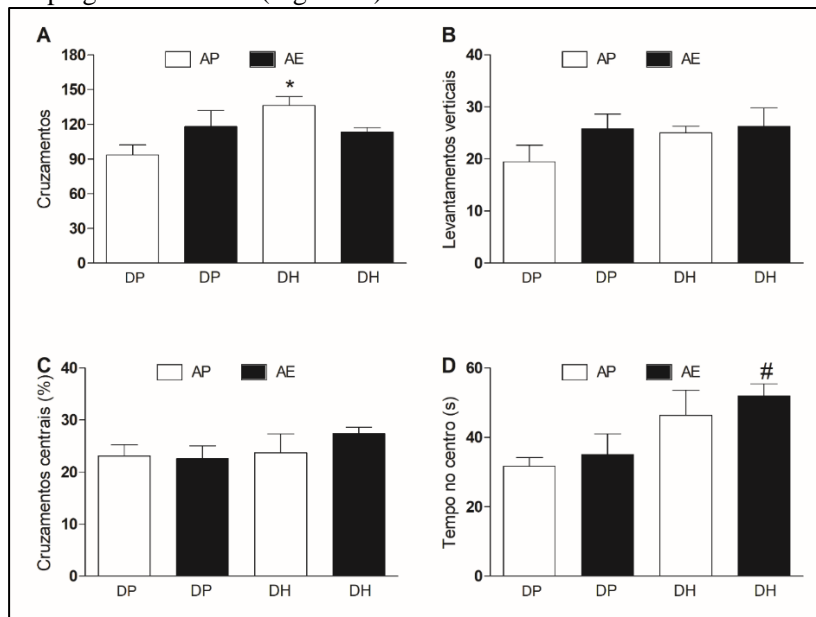


Figura 10: Teste de Campo Aberto. (A) Número total de cruzamentos. (B) Número total de levantamentos verticais. (C) Porcentagem de cruzamentos centrais. (D) Tempo total (segundos) no centro do aparato. Os dados são expressos como média + EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo DP / AP e # $p < 0,05$ vs. grupo DP / AE (análise de variância de duas vias seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls). DP (dieta padrão); DH (dieta hipercolesterolêmica); AP (ambiente padrão); AE (ambiente enriquecido).

5.3 Teste de reconhecimento de objetos

A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator dieta [$F(1, 30) = 5,73, p < 0,05$] com relação ao total de cruzamentos durante a fase de treinamento. No entanto, comparações *post hoc* subsequentes não revelaram diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 11a). Deve ser notado que nenhuma preferência inata pela posição do objeto foi exibida entre os grupos,

como indicado pela quantidade similar de tempo gasto explorando ambos os objetos durante a sessão de treinamento de 5 min (ou seja, nenhuma diferença entre o tempo gasto explorando um dos objetos e a média, 50%, pode ser observado) (Fig. 11b). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator dieta [$F(1, 30) = 15,37, p < 0,0005$] com relação ao total de cruzamentos durante a fase de teste. Comparações *post hoc* subsequentes revelaram um aumento significativo no cruzamento total de (i) camundongos tratados com DH, expostos ao AP, em comparação com camundongos tratados com DP e expostos ao AP ($P < 0,05$) e (ii) de camundongos tratados com DH expostos ao AE em comparação com camundongos tratados com DP e expostos ao AE ($P < 0,05$) (Fig. 11c). Por outro lado, como mostrado na Figura 12d, o índice de reconhecimento nos camundongos tratados com DH foi significativamente prejudicado, uma vez que não houve diferença entre o índice de reconhecimento e a chance (50%) ($t = 1,75, df = 7, P = 0,12$). Em contraste, o AE reverteu o déficit no índice de reconhecimento causado pela DH, ou seja, um aumento significativo no tempo percentual gasto explorando o novo objeto em comparação à média ($t = 6,76, df = 8, P < 0,0001$). Para ambos os grupos controle (DP+AP e DP+AE), a porcentagem de tempo gasto explorando o novo objeto foi significativamente superior ao nível de chance ($t = 3,68, df = 8, P < 0,01$ e $t = 2,85, df = 7, P < 0,05$, respectivamente).

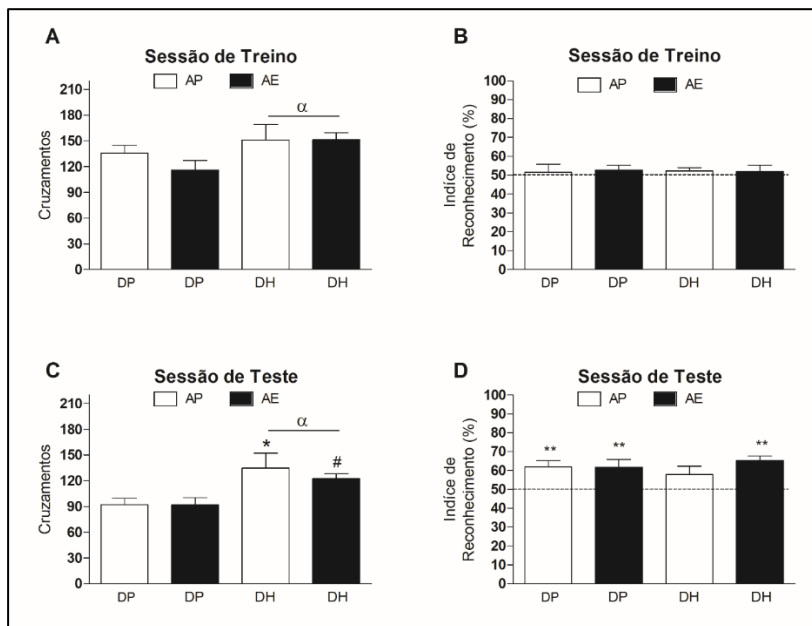


Figura 11: Teste de Reconhecimento de Objetos. (A) Total de cruzamentos durante o treino. (B) Índice de reconhecimento (%) durante o treinamento. (C) Cruzamentos totais durante o teste experimental. (D) Índice de reconhecimento (%) no teste. Os dados são expressos como média + EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo DP / AP e # $p < 0,05$ vs. grupo DP / AE (análise de variância de duas vias seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls). ** $P < 0,05$ versus nível de chance (50% do tempo gasto explorando o novo objeto no teste). Efeito do fator dieta α ($p < 0,05$; análise de variância de duas vias). DP (dieta padrão); DH (dieta hipercolesterolêmica); AP (ambiente padrão); AE (ambiente enriquecido).

5.4 Análises bioquímicas

A massa corporal dos animais aumentou significativamente entre os grupos experimentais ao longo do estudo, embora a massa corporal dos camundongos tratados com DH tenha aumentado a uma taxa significativamente maior do que nos camundongos alimentados com DP (Fig. 12a). Isso fica mais claro quando se compara a variação da massa corporal (Fig. 12b). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou efeitos significativos para o fator dieta [$F(1, 30) = 5,95$, $p < 0,05$], para o fator repetição [$F(8, 240) = 56,08$, $p < 0,00005$] e

para a interação repetição*dieta [F (8, 240) = 5,29, p <0,0005] sobre pessoa massa corporal (g). Além disso, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator dieta [F (1, 30) = 7,07, p <0,05] na variação da massa corporal. No entanto, comparações *post hoc* subsequentes não indicaram diferenças significativas entre os grupos.

Com relação a concentração de colesterol plasmático, foi observado um aumento significativo (i) em camundongos tratados com DH em comparação com camundongos expostos a DP (P <0,005) e (ii) em camundongos tratados com DH expostos ao AE em comparação ao DP+AE (P <0,005) (Fig. 12c). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator dieta [F (1, 30) = 29,02, p <0,00005] com relação à concentração plasmática de colesterol total.

Além disso, foi observado um aumento significativo na concentração de glicose no sangue de (i) camundongos tratados com DH em comparação com camundongos tratados com DP aos 15, 30 e 60 minutos após a administração de glicose (P <0,05) e (ii) camundongos tratados com DH+AE em comparação com camundongos tratados com DP expostos ao AE, 30 min após a administração de glicose (P <0,005). Além disso, verificou-se que o AE foi capaz de prevenir o aumento na concentração de glicose induzida pela DH aos 30 minutos após a administração de glicose (P <0,005) (Fig. 12d). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou efeitos significativos para o fator dieta [F (1, 30) = 18,68, p <0,0005], fator repetição [F (4, 120) = 98,54, p <0,00005], interação entre repetição*dieta [F (4, 120) = 14,01, p <0,0005], e interação dieta*ambiente*repetição [F (4, 120) = 3,24, p <0,05] na concentração plasmática de glicose (mg / dL). Além disso, foi calculada a soma de todos os pontos. Neste sentido, foi observado um aumento significativo em camundongos tratados com DH em comparação com camundongos tratados com DP e expostos ao AP (P <0,005). O AE foi capaz de prevenir a intolerância à glicose induzida pela DH (P <0,05) (Fig. 12e). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator dieta [F (1, 30) = 18,68, p <0,0005].

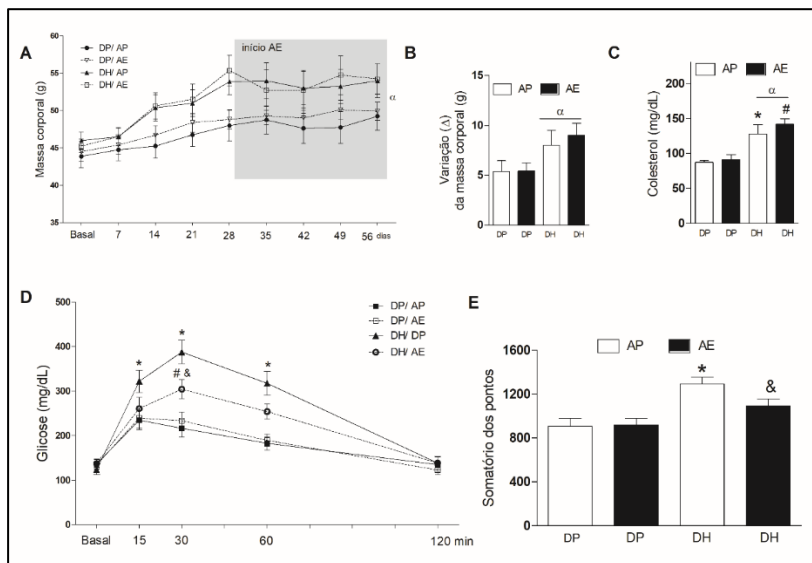


Figura 12: Análises bioquímicas. (A) Evolução do ganho de massa corporal (g) ao longo do tempo. (B) Variação da massa corporal. (C) Concentração de colesterol plasmático (mg / dl). (D) Teste de tolerância à glicose. (E) Soma de todos os pontos derivada dos dados do gráfico D. Os dados são expressos como média + EPM. Efeito da dieta α ($p < 0,05$; análise de variância de duas vias). * $p < 0,05$ vs. grupo DP / AP; # $p < 0,05$ vs. grupo DP / AE e & $p < 0,05$ vs. grupo DH / AE (análise de variância de duas vias, com medidas repetidas quando apropriado, seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls). DP (dieta padrão); DH (dieta hipercolesterolêmica); AP (ambiente padrão); AE (ambiente enriquecido).

5.5 Análises Neuroquímicas

Observou-se uma diminuição significativa nos níveis de BDNF no hipocampo de camundongos (i) tratados com DH em comparação com camundongos tratados com DP ($P < 0,05$) e (ii) de camundongos tratados com DH expostos ao AE em comparação aos camundongos tratados com DP e expostos ao AE ($P < 0,05$) (Fig. 13a). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator dieta [$F(1, 30) = 10,63$, $p < 0,005$]. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos em relação aos níveis de BDNF no córtex pré-frontal (Fig. 13b).

Além disso, observou-se uma diminuição significativa nos níveis de IL-6 no hipocampo de camundongos (i) tratados com DH em comparação com camundongos tratados com DP ($P < 0,005$) e (ii) tratados com DH expostos ao AE em comparação com camundongos expostos ao AE tratados com DP ($P < 0,05$) (Fig. 13c). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator dieta [$F(1, 30) = 18,50$, $p < 0,0005$] nos níveis de IL-6 no hipocampo. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos em relação aos níveis de IL-6 no córtex pré-frontal (Fig. 13d).

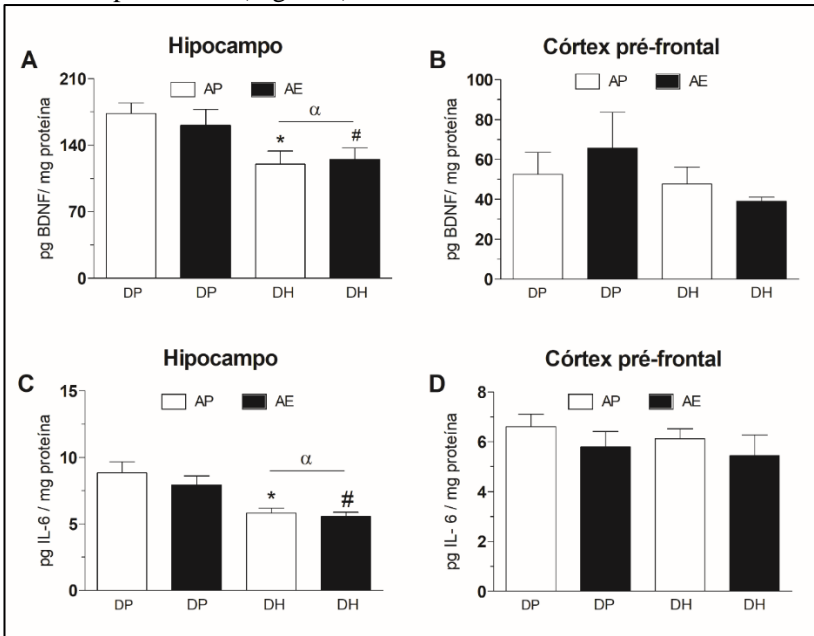


Figura 13: Análises neuroquímicas. (A) níveis de BDNF no hipocampo. (B) níveis de BDNF no córtex pré-frontal. (C) níveis de IL-6 no hipocampo. (D) níveis de IL-6 no córtex pré-frontal. Os dados são expressos como média + EPM. * $p < 0,05$ vs grupo DP / AP e # $p < 0,05$ vs. grupo DP / AE (análise de variância de duas vias, seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls). Efeito dietético α ($p < 0,05$; análise de variância de duas vias). DP (dieta padrão); DH (dieta hipercolesterolêmica); AP (ambiente padrão); AE (ambiente enriquecido).

6 DISCUSSÃO

Há muito tempo o consumo de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas vem sendo associado ao desenvolvimento de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (LOVEJOY, 2002; NELSON, 2013). Na última década, no entanto, tem se observado um crescente interesse científico acerca dos efeitos da nutrição sobre a função encefálica (FREEMAN et al., 2014). A alimentação crônica rica em gorduras (pelo menos 20% do peso em dietas com alto teor de gordura em comparação com 5% na ração padrão de laboratório) tem sido associada ao desenvolvimento de prejuízos cognitivos em roedores (CORDNER; TAMASHIRO, 2015). Além disso, há evidências de que condições de vida empobrecidas também podem afetar o comportamento do animal, levando a prejuízos cognitivos paralelos a mudanças anatômicas e moleculares no encéfalo (NARDUCCI et al., 2018). É importante notar que, em humanos, a dieta inadequada e a inatividade física frequentemente coexistem (AL-NAKEEB et al., 2012). Portanto, poder-se-ia supor um efeito sinérgico da nutrição rica em gordura e o empobrecimento ambiental no desempenho cognitivo. Sendo assim, o AE poderia mitigar os impactos negativos da negligência alimentar nas funções encefálicas (WINOCUR; GREENWOOD, 1999).

Portanto, o presente estudo buscou investigar os desfechos comportamentais, metabólicos e neuroquímicos do AE em camundongos alimentados com uma DH (20% de gordura e 1,5% de colesterol). Nas condições de AE, os camundongos são mantidos em gaiolas maiores com uma combinação de diferentes objetos (por exemplo, brinquedos, rodas de corrida) e estimulação social, proporcionando assim mais estímulos físicos e neurológicos em comparação com condições laboratoriais padrão (SIMPSON; KELLY, 2011; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Numerosos estudos clínicos e experimentais demonstraram que muitos fatores ambientais podem afetar tanto as funções fisiológicas do sistema nervoso central quanto sua capacidade de neutralizar alterações patológicas. Tem sido demonstrado que a experiência molda nossos circuitos neurais, tornando-os mais funcionais, mantendo-os “jovens” (MANDOLESI et al., 2017). As alterações observadas após o AE são frequentemente descritas como dependentes da experiência, indicando que resultam da interação ativa entre o animal e as possibilidades disponíveis no ambiente. Segundo Stern (STERN, 2002, 2009), dois

tipos de reservas encefálicas são reconhecidos: reserva encefálica e reserva cognitiva. A reserva encefálica baseia-se no potencial protetor das características anatômicas, como tamanho do encéfalo, densidade neuronal e conectividade sináptica. Em contraste, a reserva cognitiva postula as diferenças nos processos cognitivos como uma função das atividades intelectuais ao longo da vida e outros fatores ambientais, que explicam a relação não-linear entre a gravidade do dano cerebral dos pacientes e os sintomas clínicos correspondentes. A reserva cognitiva sugere que o encéfalo lida ativamente com danos encefálicos usando os processos cognitivos pré-existentes ou recrutando mecanismos compensatórios. Assim, a reserva cognitiva representa uma reserva funcional porque tem como base a eficiência dos circuitos neurais (MANDOLESI et al., 2017; STERN, 2009). No entanto, o mecanismo detalhado de como o AE reverteu os prejuízos cognitivos induzidos por dieta hipercolesterolêmica não foi totalmente determinado em nosso estudo. Podemos apenas especular sobre a conexão entre os efeitos do AE na reserva cognitiva (como descrito acima), ou os efeitos do AE na intolerância à glicose e seus efeitos sobre a cognição.

Nossas análises estatísticas indicaram um efeito significativo para o fator dieta acerca do tempo gasto no centro do campo aberto. Por outro lado, as análises estatísticas também indicaram um efeito significativo para o fator dieta no total de cruzamentos no campo aberto. A esse respeito, nossas medidas de comportamentos relacionados à ansiedade no campo aberto não podem ser adequadamente dissociadas de simples mudanças na atividade locomotora (ou seja, hiperatividade apresentada pelos camundongos tratados com DH), o que pode confundir a interpretação dos presentes resultados. Portanto, é difícil determinar se as mudanças na exploração da área central refletem a modulação desses comportamentos tipo-ansioso ou de alguma outra consequência comportamental não específica, como a excitação geral ou uma maior motivação para explorar. Sabe-se que camundongos nocaute para o receptor LDL apresentam uma hiperlocomação em testes como campo aberto, por exemplo. Elder e colaboradores (ELDER et al., 2008) mostraram que camundongos LDL^{-/-} apresentaram mais tempo em movimento e maior distância percorrida em dois dias de teste no campo aberto. Em outro estudo, a cafeína foi capaz de mitigar os efeitos de hiperlocomação em camundongos LDL^{-/-} de meia-idade, mas não em camundongos jovens (SZCZEPANIK et al., 2016). Vale ressaltar que nosso grupo, previamente, mostrou que o comprometimento cognitivo em camundongos hipercolesterolêmicos (camundongos Swiss machos;

1,25% colesterol por 8 semanas) não está relacionado com alterações locomotoras ou comportamento emocional (MOREIRA et al., 2014).

Os resultados também demonstram que o AE, quando iniciado quatro semanas após o início da DH em camundongos, impediu o comprometimento da memória espacial e do reconhecimento de objetos induzidos pela DH, que foram testados no teste de labirinto em T e no de reconhecimento de objetos. O teste de memória espacial do labirinto em T é altamente validado e depende da função do hipocampo (SANTOS et al., 2017; SIMPSON; KELLY, 2011), enquanto a memória de reconhecimento é amplamente dependente do córtex perirrinal, mas com um componente hipocampal (KIM et al., 2016). A relação dos prejuízos cognitivos com dietas já vem sendo estudada há bastante tempo, sendo que diferentes estratégias para induzir o consumo excessivo de gorduras são utilizadas com sucesso em relação aos danos cognitivos, desde dietas a base de banhas (GREENWOOD; WINOCUR, 1990) até dietas especificamente enriquecidas com colesterol (KHORRAMI et al., 2015). Com relação aos mecanismos neurobiológicos subjacentes associados aos efeitos de uma dieta rica em gordura no hipocampo, os resultados variam desde influências negativas no comprimento de neurônios da prole de ratas alimentadas com dieta 45% de gorduras (JANTHAKHIN et al., 2017) até reduções significativas de neurotransmissores como GABA em regiões do córtex frontal e hipocampo (SANDOVAL-SALAZAR et al., 2016). Além disso, um corpo crescente de evidências aponta para um papel de desregulação da via de sinalização da insulina e hiperlipidemia (STRANAHAN et al., 2008), inflamação encefálica (SPENCER et al., 2017) e plasticidade neuronal prejudicada (MOLTENI et al., 2002).

Aqui, observa-se que a DH foi associada a uma diminuição específica nos níveis de BDNF no hipocampo de camundongos. Em um estudo anterior, Park e colaboradores (PARK et al., 2010) mostraram que o comprometimento da neurogênese hipocampal induzido por HFD é mediado, pelo menos em parte, pela diminuição da produção de BDNF. Stranahan e colegas (STRANAHAN et al., 2008) apresentaram evidências de que a HFD reduz a densidade de espinhos dendríticos e os níveis de sinaptofisina, um marcador sináptico, no hipocampo. Além disso, Molteni e colaboradores (MOLTENI et al., 2002) mostraram que as diminuições induzidas pela HFD na expressão do BDNF no hipocampo foram paralelas por reduções nas moléculas envolvidas com o crescimento neuronal e a função sináptica. De acordo com os nossos dados, Molteni e colegas (MOLTENI et al., 2002) observaram uma associação entre o consumo de HFD e reduções na expressão de mRNA

do BDNF no hipocampo, mas não no córtex. De acordo com Pugazhenthí e colaboradores (PUGAZHENTHI et al., 2006), os produtos de peroxidação lipídica diminuem a atividade promotora do BDNF dependente de CREB em neurônios do hipocampo de ratos. Vale ressaltar que espécies reativas de oxigênio (EROs) podem iniciar vias pró-inflamatórias (LIU et al., 2017), perpetuando ainda mais o ambiente deletério para populações neuronais vulneráveis. Portanto, pode-se apontar para o estresse oxidativo como o desencadeador das alterações neuroquímicas observadas após exposição à dieta hiperlipídica. Por outro lado, o AE é conhecido por aumentar a neurogênese do hipocampo e resultar em um aumento no número de sinapses por neurônio (HU et al., 2010). Especificamente, aumentando os estímulos sociais e sensoriais, o AE melhora a conectividade funcional e a plasticidade encefálica (BAYAT; DAVOOD; HAGHANI, 2015). Os mecanismos moleculares subjacentes resultantes da exposição ao AE são atribuídos, pelo menos em parte, ao papel das neurotrofinas, como o BDNF (VAZQUEZ-SANROMAN et al., 2013). O BDNF e as outras neurotrofinas são sintetizadas no retículo endoplasmático, como pré-pró-neurotrofinas. O Pré-pró-BDNF é então convertido em pró-BDNF pela remoção de um peptídeo sinalizador e posteriormente clivado para gerar a forma madura da neurotrofina (LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017). Em um estudo com camundongos *knockdown* para BDNF, Novkovic e colaboradores (NOVKOVIC; MITTMANN; MANAHAN-VAUGHAN, 2015) mostraram que o AE, por um período de 4 semanas, foi suficiente para aumentar os níveis de BDNF, mas não os de pró-BDNF. Entretanto, neste estudo os animais foram expostos ao AE com 3 semanas de idade, logo após o desmame. Com isso, os pesquisadores concluem que as alterações na expressão do BDNF, como resultado do AE, derivam do efeito direto na própria proteína, e não no seu precursor. No entanto, no presente trabalho os resultados mostraram que o AE não foi capaz de mitigar os efeitos da DH nos níveis de BDNF. Com relação aos estudos que relataram aumento do BDNF após o AE, pode-se especular que o período de exposição ao AE, aqui empregado, foi insuficiente, uma vez que os animais já haviam sido expostos à dieta quatro semanas antes. A este respeito, Molteni e colegas (MOLTENI et al., 2004) mostraram que o exercício neutralizou completamente a redução nos níveis de proteínas do BDNF do hipocampo produzidas por uma HFD (oito semanas de exposição). No entanto, em seu estudo, exercício e dieta começaram concomitantemente. Por outro lado, Gualtieri e colegas (GUALTIERI et al., 2017) não observaram nenhum efeito na imunoreatividade do BDNF após oito dias de exposição ao

AE. Além disso, Stein e colaboradores (STEIN et al., 2016) não encontraram nenhuma alteração significativa nos níveis de BDNF após três semanas de exposição ao AE (três horas de exposição por dia). Portanto, pode-se especular que camundongos mantidos sob dietas ricas em gordura podem exigir períodos mais longos de AE para aumentar a expressão do BDNF. Um dos mecanismos neurobiológicos conhecidos para a modulação de BDNF, é por sua interação com os receptores de adenosina. A adenosina é um neuromodulador e regulador na homeostase do encéfalo e seus efeitos são mediados por 4 receptores: A1, A2a, A2b e A3 (TEBANO et al., 2010). Em um estudo de 2012, Vicente e colaboradores mostraram uma possível relação entre BDNF e IL-6 através da modulação de receptores A1. Dois anos mais tarde, o mesmo grupo avaliou o comportamento da IL-6 e BDNF através da ação de receptores A1 e A2a com tratamentos em diferentes intervalos de tempo (45min, 24h e 48h). Os autores propõem uma inter-relação entre IL-6 e BDNF, onde o aumento de BDNF coincide com a presença extracelular de IL-6 e que o BDNF libera IL-6, ao passo que a IL-6 modula os níveis de BDNF por meio da regulação da expressão de receptores de adenosina A1 e A2a (PERÍGOLO-VICENTE et al., 2014; PERÍGOLO-VICENTE et al., 2012).

Os prejuízos neurais induzidos por dieta rica em gorduras, estão geralmente associados a um aumento nas citocinas inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6 e TNF- α (DUTHEIL et al., 2016). A IL-6 está fortemente associada com estados inflamatórios crônicos, incluindo inflamação de baixo grau associada à obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Curiosamente, a IL-6 plasmática aumenta dramaticamente durante o exercício (por exemplo, em roda de corrida) durante a contração muscular (BENRICK; WALLENIUS; ASTERHOLM, 2012). De fato, Steensberg et al. (STEENBERG et al., 2000) descreveram um aumento na liberação de IL-6 durante o exercício em músculos esqueléticos em humanos. Este achado levou recentemente vários autores a sugerir que a IL-6 trabalha de maneira semelhante à liberação hormonal durante o exercício e que ela pode desempenhar um papel fundamental na regulação da homeostase da glicose e lipólise do tecido adiposo (STEENBERG et al., 2000). No entanto, nossos dados mostram que DH diminuiu significativamente a expressão de IL-6 no hipocampo dos camundongos. A este respeito, embora a IL-6 seja principalmente considerada uma citocina pró-inflamatória, propriedades de sinalização alternativas da IL-6 também podem induzir efeitos anti-inflamatórios (sinalização clássica ao invés de trans-sinalização da IL-6), tornando a IL-6 uma citocina

pleiotrópica (SCHELLER et al., 2011). Em condições fisiológicas, a IL-6 tem um papel notório durante a neurogênese adulta, plasticidade neural, potenciação de longo prazo e memória (EYRE; BAUNE, 2012). Em 2011, Kellie e colaboradores (KELLIE K. BOWEN, 2011) mostraram que camundongos nocaute para a IL-6 apresentaram neurogênese reduzida no hipocampo e zona subventricular, sendo que os pesquisadores também concluem que citocinas, como a IL-6, podem ser essenciais em níveis fisiológicos para a manutenção da neurogênese no cérebro do roedor adulto. Já em 2013, Gallagher e colaboradores (GALLAGHER et al., 2013) mostraram que a IL-6 materna é um requisito essencial para o desenvolvimento apropriado do *pool* de células-tronco neurais no sistema prosencefálico e olfativo na fase adulta, com uma auto-renovação de células-tronco neurais dependente da sinalização de IL-6. Além disso, a IL-6 pode exercer ações completamente opostas desencadeando a sobrevivência neuronal após lesão ou produzindo degeneração neuronal e morte celular em distúrbios neurodegenerativos (GADIANT, 1997). Por exemplo, Bassett e colaboradores (BASSETT; BACH; CHAN, 2012) demonstraram que o neurotóxico metilmercúrio (MeHg) diminuiu a secreção de IL-6 em culturas de microgliais / astrócitos sem afetar a secreção de IL-1Ra, TNF- α e IL-1 β . Além disso, Macedo-Júnior e colaboradores (MACEDO-JÚNIOR et al., 2017) observaram uma diminuição nos níveis de IL-6 no cerebelo após o tratamento com MeHg. Ainda não está claro se um nível elevado de IL-6 pode melhorar significativamente a memória e os processos de aprendizagem através de seus efeitos por mecanismos nas sinapses do hipocampo. Embora a IL-6 seja um agente importante no SNC, como uma citocina inflamatória, seus efeitos nem sempre são benéficos e podem, eventualmente, contribuir para doenças neuroimunes (HEESE, 2017). Com base nos efeitos duais da IL-6 no SNC, não é possível concluir se a redução observada nos níveis de IL-6 no hipocampo apresenta consequências benéficas ou deletérias nos camundongos expostos a DH. Entretanto, em nosso protocolo experimental, o AE foi incapaz de mitigar os efeitos da DH nos níveis de IL-6. Por exemplo, Jurgens e Johnson (JURGENS; JOHNSON, 2012) avaliaram se a exposição contínua a longo prazo ao AE (ou seja, quatro meses) poderia prevenir e/ou atenuar os efeitos negativos da infecção por influenza no hipocampo e na cognição espacial. Os pesquisadores mostraram que o AE mitigou as alterações induzidas pela infecção por influenza na expressão hipocampal de fatores inflamatórios e imunomoduladores (i.e., aumento da expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- α no hipocampo de camundongos em ambiente padrão). Assim,

com base em todas as evidências apresentadas acima, e levando em consideração que os animais já estavam expostos à DH um mês antes do início da exposição ao AE, pode-se especular que essas quatro semanas de exposição ao AE foram insuficientes para compensar a cascata deletéria induzida pela dieta rica em gordura. Em outras palavras, isso pode refletir um fenômeno subjacente pelo qual a progressão da doença induzida pela dieta rica em gordura está associada a estímulos nocivos crônicos e / ou escalonantes que esgotam os mecanismos neuroprotetores do AE.

De acordo com a análise metabólica, foi observado um aumento na massa corporal, intolerância à glicose e hipercolesterolemia nos camundongos tratados com DH. Curiosamente, o AE não afetou o ganho de peso induzido por DH ou hipercolesterolemia, mas atenuou a intolerância à glicose. Os resultados estão de acordo com o estudo de Maesako et al. (MAESAKO et al., 2012), que demonstrou que o exercício voluntário não melhora a hiperinsulinemia induzida por dieta ou hipercolesterolemia, mas atenua a intolerância à glicose, bem como o comprometimento cognitivo. Assim, pode-se supor uma conexão entre os efeitos de uma HFD no metabolismo energético e seus efeitos sobre a cognição (CORDNER; TAMASHIRO, 2015). A esse respeito, alguns estudos indicaram comprometimento cognitivo em indivíduos não diabéticos com formas leves de intolerância à glicose (KAPLAN; GREENWOOD; WINOCUR, 1999; VANHANEN et al., 1997). Além disso, Convit e colegas (CONVIT et al., 2003) identificaram que entre indivíduos normais não diabéticos de meia-idade e idosos, aqueles com pior regulação da glicose periférica eram mais propensos a ter menor desempenho de memória e menores volumes hipocâmpais ajustados ao tamanho da cabeça. De fato, uma oferta adequada de glicose é um determinante para atender às demandas metabólicas dos processos cognitivos (MCNAY et al., 2002), e a ingestão calórica excessiva é prejudicial à plasticidade neuronal (MOLTENI et al., 2002). Por outro lado, o aumento do gasto energético através da corrida em roda aumenta a neurogênese do hipocampo, a plasticidade sináptica e o aprendizado (PRAAG et al., 1999). Cao e colegas (CAO et al., 2011) relataram que camundongos em um AE são mais resistentes à obesidade induzida por dieta, em parte, através do escurecimento do tecido adiposo branco. Além disso, Wei e colaboradores (WEI et al., 2015) mostraram que o AE em mães foi associado à melhoria da saúde geral, como redução do acúmulo de gordura, aumento dos parâmetros metabólicos e redução da intolerância à glicose e aumentos da sensibilidade à insulina em seus filhos. Apesar dos estudos acima mencionados, nosso resultado é

intrigante na medida em que uma intervenção de AE bastante leve por apenas quatro semanas atenuou o declínio cognitivo induzido pela DH em camundongos. No entanto, o mecanismo detalhado de como AE melhorou o déficit de memória induzido pela DH não foi totalmente determinado no presente estudo. Pode-se especular sobre a conexão entre os efeitos do AE na intolerância à glicose e seus efeitos sobre a cognição. Além disso, a extensão em que a estimulação física ou intelectual do AE são os principais contribuintes para o resultado positivo mostrado aqui permanece controversa porque o AE possuía apenas uma roda de corrida por caixa. Faherty e colegas (FAHERTY; KERLEY; JAY, 2003) sugeriram que o AE é mais eficaz para facilitar as alterações neurais do que o exercício sozinho, enquanto Lambert e colegas (LAMBERT; FERNANDEZ; FRICK, 2005) sugeriram que o exercício, mas não a estimulação cognitiva, melhora a memória espacial.

Em geral, os resultados mostraram que a disfunção cognitiva induzida por DH foi associada à intolerância à glicose e diminuição dos níveis de BDNF e IL-6 no hipocampo. Curiosamente, Krabble e colegas (KRABBE; NIELSEN, 2007) mostraram que os níveis de BDNF no plasma estavam inversamente associados com a glicemia em jejum em indivíduos diabéticos. De fato, vários estudos apoiam a hipótese de que o BDNF desempenha um papel na resistência à insulina e no balanço energético (ONO et al., 1997; TONRA et al., 1999). Além disso, há evidências de um papel da IL-6 na regulação do metabolismo de energia e glicose no nível do SNC, a infusão de insulina por via intracerebroventricular mostrou aumento da expressão de IL-6 (ROH; SONG; KIM, 2016). A esse respeito, camundongos sem expressão de IL-6 desenvolvem não apenas obesidade tardia, mas também hepatoesteatose, inflamação do fígado e prejuízos na sensibilidade à insulina por todo o corpo. Camundongos nocaute para IL-6 apresentam uma desregulação de genes associados ao ciclo do ácido tricarbóxico e redução da expressão dos complexos respiratórios II, III e IV (subunidade I) em relação ao grupo controle quando alimentados com uma dieta rica em gorduras. Juntos, esses dados sugerem que quando o metabolismo desses camundongos sofre prejuízos relacionados à dieta rica em gorduras, a deficiência de IL-6 é associada à função mitocondrial alterada e resistência à insulina no fígado, possivelmente via eliminação de espécies reativas de oxigênio (MATTHEWS et al., 2010). Considerando os estudos que relatam que o comprometimento cognitivo relacionado à HFD está associado à sinalização periférica e central de insulina prejudicada (ARNOLD et al., 2014; JEON et al., 2012), é importante avaliar os efeitos do AE no metabolismo da glicose

encefálica e na sinalização da insulina no encéfalo de camundongos tratados com dietas contendo alto teor de gordura. No geral, enquanto os resultados do presente estudo reforçam os efeitos positivos e neuroprotetores do AE na cognição, eles não suportam um papel do AE na prevenção das alterações neuroquímicas induzidas pela DH. Considerando que a maioria dos estudos que utilizam o AE inicia a exposição antes ou junto com o insulto, e no presente estudo, a estratégia terapêutica teve início apenas quatro semanas após o início da DH, destacamos a importância da estimulação física e intelectual constante para melhorar a saúde geral e a função cognitiva.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que, por um período de quatro semanas, o enriquecimento ambiental é capaz de reverter danos cognitivos causados por uma dieta rica em gorduras e enriquecida com colesterol em camundongos swiss machos e jovens. O AE foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina mesmo não tendo revertido os quadros de hipercolesterolemia induzidos pela dieta e nem apresentado diferenças significativas nos pesos dos animais, provavelmente como consequência de uma abordagem envolvendo atividade física, e não exercício forçado. Além disso, o AE não foi capaz de atenuar a diminuição dos níveis de BDNF e IL-6 induzidos pela dieta, indicando que a reversão dos danos cognitivos tem como provável causa uma melhora no metabolismo de glicose. É possível que para se observar uma melhora nos aspectos neuroquímicos avaliados no presente estudo, sejam necessárias mais do que 4 semanas de exposição ao AE. Também pode-se especular que tais danos não seriam causados caso a exposição ao AE acontecesse concomitantemente com o início da dieta.

REFERÊNCIAS

A. BABIKER, S. D. et al. Patients with atherosclerosis may have increased circulating levels of 27-hydroxycholesterol and cholestenic acid. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 65, 2005.

AHRE, B.; WINZELL, M. S. A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 237, n. 53, p. 215–219, 2004.

AL-NAKEEB, Y. et al. Obesity , Physical Activity and Sedentary Behavior Amongst British and Saudi Youth : A Cross-Cultural Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, p. 1490–1506, 2012.

ALBERTS, A. W. et al. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Biochemistry**, v. 77, n. 7, p. 3957–3961, 1980.

ARNOLD, S. E. et al. Neurobiology of Disease High fat diet produces brain insulin resistance , synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. **Neurobiology of Disease**, v. 67, p. 79–87, 2014.

ATTUQUAYEFIO, T. et al. A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–21, 2017.

BASSETT, T.; BACH, P.; CHAN, H. M. NeuroToxicology Effects of methylmercury on the secretion of pro-inflammatory cytokines from primary microglial cells and astrocytes. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 2, p. 229–234, 2012.

BAYAT, M.; DAVOOD, M.; HAGHANI, M. Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. **Brain Research Bulletin**, v. 119, p. 34–40, 2015.

BENRICK, A.; WALLENIS, V.; ASTERHOLM, I. W. Interleukin-6 mediates exercise-induced increase in insulin sensitivity in mice. **Experimental Physiology**, v. 00, p. 1–12, 2012.

BJÖRKHEM, I.; MEANEY, S.; FOGELMAN, A. M. Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 5, p. 806–815, 2004.

BLOCH, K. V. et al. ERICA: Prevalences of hypertension and obesity in Brazilian adolescents. **Revista de Saude Publica**, v. 50, n. supl 1, p. 1s–12s, 2016.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J. Neuroscience Letters Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: Associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. **Neuroscience Letters** v. 436, p. 278–282, 2008.

BROSSERON, F. et al. Body Fluid Cytokine Levels in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: a Comparative Overview. **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 2, p. 534–544, 2014.

BRUSCOLI, M.; LOVESTONE, S. Is MCI really just early dementia? A systematic review of conversion studies. **International Psychogeriatrics**, p. 129–140, 2004.

BUETTNER R; SCHÖLMERICH J; BOLLHEIMER LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.

CAO, L. et al. Article White to Brown Fat Phenotypic Switch Induced by Genetic and Environmental Activation of a Hypothalamic-Adipocyte Axis. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 3, p. 324–338, 2011.

CONVIT, A. et al. Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. **PNAS**, v. 100, n. 4, p. 2019–2022, 2003.

CORDNER, Z. A.; TAMASHIRO, K. L. K. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology and Behavior**, v. 152,

p. 363–371, 2015.

COSTA, A. C. et al. Donepezil effects on cholesterol and oxysterol plasma levels of Alzheimer's disease patients. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, p. 1–7, 2017.

D. VESSELINOVITCH, R. W. W. A. J. D. FOOD CONSUMPTION AND BODY WEIGHT IN MICE. **Journal of Atherosclerosis Research**, n. 609, p. 483–495, 1967.

DE LA TORRE, J. C. Critical threshold cerebral hypoperfusion causes Alzheimer's disease? **Acta Neuropathologica**, v. 98, n. 1, p. 1–8, 1999.

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

DE SOUZA, R. M. et al. Behavioural, metabolic and neurochemical effects of environmental enrichment in high-fat cholesterol-enriched diet-fed mice. **Behavioural Brain Research**, n. August, p. 0–1, 2018.

DIETSCHY, J.; STEPHEN, D. Cholesterol metabolism in the brain. **Current Opinion in Lipidology**, 12(2):105-112, APR 2001

DINGESS, P. M. et al. Exposure to a diet high in fat attenuates dendritic spine density in the medial prefrontal cortex. **Brain Structure and Function**, 222(2), 1077–1085, 2018.

DORNAS, W. C. et al. Review Article Experimental Atherosclerosis in Rabbits. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** p. 272–278, 2009.

DUTHEIL, S. et al. High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1874–1887, 2016.

ELDER, G. A. et al. Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **Brain Behavior Research**, v. 191,

n. 2, p. 256–265, 2008.

EYRE, H.; BAUNE, B. T. Neuroplastic changes in depression : A role for the immune system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 9, p. 1397–1416, 2012.

FAHERTY, C. J.; KERLEY, D.; JAY, R. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. **Developmental Brain Research**, v. 141, p. 55–61, 2003.

FRANKENBERG, ANDRÉ F. REIS, F. G. Relationships between adiponectin levels, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes: a literature review. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, n. 8, 2017.

FREEMAN, L. R. et al. Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: A review of proposed mechanisms. **Nutritional Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 241–251, 2014.

FREESE, J. et al. The sedentary (r)evolution: Have we lost our metabolic flexibility? **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 1787, 2018.

FRICK, KARYN M.; BENOIT, J. D. Use It or Lose It: Environmental Enrichment as a Means to Promote Successful Cognitive Aging. **Scientific World Journal**, v. 10, p. 1129–1141, 2015.

GADIENT, R. A.; OTTEN, U. Interleukin-6 (il-6) a molecule with both beneficial and destructive potentials. **Progress in Neurobiology**, v. 52, pp. 379 to 390, 1997

GALLAGHER, D. et al. Transient Maternal IL-6 Mediates Long-Lasting Changes in Neural Stem Cell Pools by Deregulating an Endogenous Self-Renewal Pathway. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 5, p. 564–576, 2013.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. ApoE knockout and knockin mice: The history of their contribution to the understanding of atherogenesis. **Journal of lipid research**, 2016.

GHODKE, R. M.; TOUR, N.; DEVI, K. Effects of statins and cholesterol on memory functions in mice. **Metabolic Brain Disease**, p. 443–451, 2012.

GREENWOOD, C. E.; WINOCUR, G. Learning and memory impairment in rats fed a high saturated fat diet. **Behavioral and Neural Biology**, v. 53, n. 1, p. 74–87, 1990.

GUALTIERI, F. et al. Effects of Environmental Enrichment on Doublecortin and BDNF Expression along the Dorso-Ventral Axis of the Dentate Gyrus. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. September, p. 1–15, 2017.

HAIYAN XU, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, 2003.

HANNAN, J. N. AND A. J. Enriched environments, experiencedependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, 2006.

HEBB, D. O. The effects of early experience on problem solving at maturity. **American Psychologist**, v. 2, 1947.

HEESE, K. Functional repertoire of interleukin-6 in the central nervous system – a review. **Restorative Neurology and Neuroscience**, p. 1–8, 2017.

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

HU, X. et al. Neuroscience Letters Enriched environment increases spinophilin mRNA expression and spinophilin immunoreactive dendritic spines in hippocampus and cortex. **Neuroscience Letters**, v. 476, p. 79–83, 2010.

HWANG, L. et al. Sex Differences in High-fat Diet-induced Obesity , Metabolic Alterations and Learning , and Synaptic Plasticity Deficits in Mice. **Obesity**, v. 18, n. 3, p. 463–469, 2009.

JACKA, F. N. et al. Western diet is associated with a smaller hippocampus: a longitudinal investigation. **BMC Medicine**, p. 1–8, 2015.

JANNASCH, F.; KRO, J.; SCHULZE, M. B. Dietary Patterns and Type 2 Diabetes: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. **The Journal of Nutrition**, 147(6), 1174–1182, 2017.

JANTHAKHIN, Y. et al. Maternal high-fat diet leads to hippocampal and amygdala dendritic remodeling in adult male offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 83, p. 49–57, 2017.

JEON, B. T. et al. Resveratrol Attenuates Obesity-Associated Peripheral and Central Inflammation and Improves Memory Deficit in Mice Fed a High-Fat Diet. **Diabetes**, p. 1–11, 2012.

JURGENS, H. A.; JOHNSON, R. W. Brain , Behavior , and Immunity Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. **Brain Behavior and Immunity**, v. 26, n. 6, p. 1006–1016, 2012.

KAPLAN, R. J.; GREENWOOD, C. E.; WINOCUR, G. Cognitive performance is associated with glucose regulation in healthy elderly persons and can be enhanced with glucose and can be enhanced with glucose and dietary carbohydrates. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 825-836 n. April, 2000.

KARIMI, S. A. et al. Effect of high-fat diet and antioxidants on hippocampal long-term potentiation in rats: An in vivo study. **Brain Research**, 1539, 1–6, 2013.

KARIMI, I.; MOTAMEDI, S.; RANJBAR, F. A high-fat diet induced NMRI mouse model of metabolic syndrome: focus on brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 5, p. 1635–1640, 2018.

KELLIE K. BOWEN, R. J. D. AND R. V. Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis. **NeuroReport**, v. 22,

2011.

KHORRAMI, A. et al. Investigation of the memory impairment in rats fed with oxidized-cholesterol-rich diet employing passive avoidance test. **Drug Research**, v. 65, n. 5, p. 231–237, 2015.

KIM, H.; HOON, J. Evidences of the role of the rodent hippocampus in the non-spatial recognition memory. **Elsevier B.V.**, 2016.

KIVIPELTO, M. et al. Later life : longitudinal , population based study. **BMJ**, June, p. 1447–1451, 2001.

KIVIPELTO, M. ET AL. Obesity and Vascular Risk Factors at Midlife and the Risk of Dementia and Alzheimer Disease. **American Medical Association**, v. 62, 2005.

KNIGHT, E. M. et al. Neurobiology of Aging High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer ' s disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology q. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 8, p. 1821–1832, 2014.

KRABBE, K. S.; NIELSEN, A. R. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, p. 431–438, 2007.

LAMBERT, T. J.; FERNANDEZ, S. M.; FRICK, K. M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, p. 206–216, 2005.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs impoverished housed rats. Pharmacology, **Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 193–207, 2002.

LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitamins and Hormones**, 1. ed. v. 104 [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

LEE, J. et al. Comparison of the behavioral effects of exercise

and high fat diet on cognitive function in adolescent rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 12, n. 6, p. 520–525, 2016.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013.

LI, W. et al. The effect of combination therapy of allicin and fenofibrate on high fat diet-induced vascular endothelium dysfunction and liver damage in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 1–7, 2010.

LIU, Z. et al. Review Article Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases : From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

LOVEJOY, J. C. The Influence of Dietary Fat on Insulin Resistance. **Current Diabetes Reports**, v. 2, p. 435–440, 2002.

MACEDO-JÚNIOR, S. J. et al. Methylmercury exposure for 14 days (short-term) produces behavioral and biochemical changes in mouse cerebellum , liver , and serum. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 19–21, p. 1145–1155, 2017.

MACHADO, A. **Hipercolesterolemia, induzida por dieta ou genótipo, impacta negativamente na formação de memórias aversivas contextuais em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis 2016.

MAESAKO, M. et al. Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced AB deposition and memory deficit in APP transgenic mice. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 5, p. 1011.e11-1011.e23, 2012.

MANDOLESI, L. et al. Review Article Environmental Factors Promoting Neural Plasticity : Insights from Animal and Human Studies. **Neural Plasticity**, v. 2017, 2017.

MANUEL-APOLINAR, L. et al. Hypercholesterolemia As a Risk Factor for Cardiovascular Disease : Current Controversial Therapeutic

Management. **Archives of Medical Research**, v. 47, p. 491–495, 2016.

MARIANI, E.; MONASTERO, R.; MECOCCHI, P. Mild Cognitive Impairment : A Systematic Review. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 12, p. 23–35, 2007.

MATTHEWS, V. B. et al. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. **Diabetologia**, v. 53, p. 2431–2441, 2010.

MCNAY, E. C. et al. Into the Mechanisms of Memory Modulation. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v. 1, n. 4, December 2002, p. 264-280, 2002.

MITCHELL, N. S. et al. Obesity: Overview of an Epidemic. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 717–732, 2011.

MOLTENI, R. et al. A high-fat , refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor , neuronal plasticity. **Neuroscience**, v. 112, n. 4, p. 803–814, 2002.

MOLTENI, R. et al. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, v. 123, p. 429–440, 2004.

MOREIRA, E. et al. Age-Related Cognitive Decline in Hypercholesterolemic LDL Receptor Knockout Mice (LDLr - / -): Evidence of Antioxidant Imbalance and Increased Acetylcholinesterase Activity in the Prefrontal Cortex. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 32, p. 495–511, 2012.

MOREIRA, E. L. G. **A hipercolesterolemia como um fator de risco para o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve: evidências obtidas em modelos experimentais**. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 160, 2013.

MOREIRA, E. 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, 121(4), 415–426, 2014

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

MURDOCK, D. G. et al. A coronary artery disease associated gene, is a candidate gene for late onset Alzheimer disease in APOE carriers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–9, 2013.

NARDUCCI, R. et al. Early impoverished environment delays the maturation of cerebral cortex. **Scientific Reports**, n. December 2017, p. 1–15, 2018.

NELSON, R. H. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. **Primary Care Clinics in Office Practice**, v. 40, n. 1, p. 195–211, 2013.

NOVKOVIC, T.; MITTMANN, T.; MANAHAN-VAUGHAN, D. BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment. **Hippocampus**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2015.

OLIVEIRA, J.; MOREIRA, E. Increased Susceptibility to Amyloid- β -Induced Neurotoxicity in Mice Lacking the Low-Density Lipoprotein Receptor. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 41, p. 43–60, 2014.

OLIVEIRA, J. **Mecanismos moleculares que relacionam a hipercolesterolemia familiar à doença de Alzheimer**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 150, 2015.

ONO, M. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Reduces Blood Glucose Level in Obese Diabetic Mice but Not in Normal Mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 637, n. 238, p. 633–637, 1997.

PARNET, P. et al. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior.

Journal of Neuroimmunology, v. 125, 2002.

PERÍGOLO-VICENTE, R. et al. IL-6, A1 and A2aR: A crosstalk that modulates BDNF and induces neuroprotection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 449, n. 4, p. 477–482, 2014.

PETERSEN, R. C. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. **Journal of Internal Medicine**, v. 256, n. 3, p. 183–194, 2004.

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

PLÁCIDO, E. **Efeitos do ambiente enriquecido na neuroplasticidade hipocampal no modelo animal yac128 da doença de huntington**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2018.

PRAAG, H. VAN et al. Running enhances neurogenesis , learning , and long-term potentiation in mice. **PNAS**, v. 96, n. 23, p. 13427–13431, 1999.

PRAAG, H. VAN et al. Neural consequences of enviromental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, 1(3), 191–198, 2000.

PUGAZHENTHI, S. et al. Differential regulation of c-jun and CREB by acrolein and 4-hydroxynonenal. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 21–34, 2006.

RA, H. et al. Neuroscience Letters A high-fat diet impairs neurogenesis : Involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience Letters**, v. 482, n. 3, p. 235–239, 2010.

RAFAEL PERÍGOLO-VICENTE, KAREN RITT, MARIANA RODRIGUES PEREIRA, P. M. M. T.; ROBERTO PAES-DE-CARVALHO, E. G.-A. IL-6 treatment increases the survival of retinal ganglion cells in vitro: The role of adenosine A1 receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, 2012.

ROH, E.; SONG, D. K.; KIM, M. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. e216-12, 2016.

RUSANEN, M. et al. Heart Diseases and Long-Term Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Population-Based CAIDE Study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 42, n. 1, p. 183–191, 2014.

SANDOVAL-SALAZAR, C. et al. A high-fat diet decreases GABA concentration in the frontal cortex and hippocampus of rats. **Biological Research**, v. 49, n. 1, p. 1–6, 2016.

SANTOS, V. V et al. Acyl ghrelin improves cognition, synaptic plasticity deficits and neuroinflammation following amyloid beta. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, 42–49, 2017.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878–888, 2011.

SEYED ASAAD KARIMI, IRAJ SALEHI, ALIREZA KOMAKI, A. S.; MOHAMMAD ZAREI, S. S. Effect of high-fat diet and antioxidants on hippocampal long-term potentiation in rats: An in vivo study. **brain research**, 2013.

SHAFATI, M. et al. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. **Journal of Lipid Research**, v. 52, n. 5, p. 1004–1010, 2011.

SHOJI, H. et al. T-maze Forced Alternation and Left-right Discrimination Tasks for Assessing Working and Reference Memory in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 60, p. 3–9, 2012.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats — Behavioural and neurochemical aspects &. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 246–264, 2011.

SINGHAL, G. et al. Cellular and molecular mechanisms of

immunomodulation in the brain through environmental enrichment. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. April, p. 1–29, 2014.

SPENCER, S. J. et al. High-fat diet and aging interact to produce neuroinflammation and impair hippocampal- and amygdalar-dependent memory. **Neurobiology of Aging**, v. 58, p. 88–101, 2017.

STEENBERG, A. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **Journal of Physiology**, v. 529.1, p. 237–242, 2000.

STEIN, L. R. et al. Short-term environmental enrichment enhances synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. **Neuroscience**, v. 329, p. 294–305, 2016.

STERN, Y. What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. **Journal of the International Neuropsychological Society**, p. 448–460, 2002.

STERN, Y. Cognitive reserve. **Neuropsychologia**, v. 47, n. 2009, p. 2015–2028, 2009.

STONE, G. W. et al. A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 3, p. 226–235, 2011.

STRANAHAN, A. M. et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. **Hippocampus**, v. 18, n. 11, p. 1085–1088, 2008.

STROES, E. S. G. Efficacy and Safety of High-Density Lipoprotein Cholesterol-Increasing Compounds A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 45, n. 2, p. 185–197, 2005.

SZCZEPANIK, J. C. et al. Caffeine Mitigates the Locomotor Hyperactivity in Middle-aged Low-density Lipoprotein Receptor (LDLr) -Knockout Mice. **Neuroscience & Therapeutics**, v. 22, p. 420–422, 2016.

TAKEDA, S.; SATO, N.; MORISHITA, R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive / non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. July, p. 1–8, 2014.

TEBANO, M. T. et al. Role of Adenosine A_{2A} Receptors in Modulating Synaptic Functions and Brain Levels of BDNF: a Possible Key Mechanism in the Pathophysiology of Huntington's Disease. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 1768–1782, 2010

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

THOMPSON, P. D. et al. Statin-associated side effects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 20, p. 2395–2410, 2016.

TONRA, J. R. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Blood Glucose Control and Alleviates Fasting Hyperglycemia in C57BLKS-Lepr. **Diabetes**, v. 48, n. 86, 1999.

TURLEY, J. M. D. AND S. D. Current Opinion in Lipidology. **Current Opinion in Lipidology**, v. 12, 2001.

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

VALLIÈRES, L. et al. Reduced Hippocampal Neurogenesis in Adult Transgenic Mice with Chronic Astrocytic Production of Interleukin-6. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 486–492, 2002.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191–198, 2000.

VANHANEN, M. et al. Risk for non-insulin-dependent diabetes

in the normoglycaemic elderly is associated with impaired cognitive function. **Cognitive Neuroscience and Neuropsychology NeuroReport**, v. 8, n. 6, p. 1527–1530, 1997.

VAZQUEZ-SANROMAN, D. et al. The effects of enriched environment on BDNF expression in the mouse cerebellum depending on the length of exposure. **Behavioural Brain Research**, v. 243, p. 118–128, 2013.

WEI, Y. et al. Enriched environment-induced maternal weight loss reprograms metabolic gene expression in mouse offspring. **Journal of biological chemistry**, v. 209, p. 4604-4619, 2015

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation , stress , and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2005.

WILL, B. et al. Recovery from brain injury in animals : relative efficacy of environmental enrichment , physical exercise or formal training (1990 – 2002). **Progress in Neurobiology**, v. 72, p. 167–182, 2004.

WINOCUR, G.; GREENWOOD, C. E. The effects of high fat diets and environmental influences on cognitive performance in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 101, p. 153–161, 1999

WOLF, A. et al. A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6 / Tg2576 Mice. **Plos One**, p. 1–23, 2016.

WOLF, S. A. et al. Cognitive and Physical Activity Differently Modulate Disease Progression in the Amyloid Precursor Protein (APP) -23 Model of Alzheimer’s Disease. **Biological Psychiatry**, n. Mdc, 2006.

WOODS, S. C. et al. A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1081–1087, 2003.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the

outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 1699–1707, 2004.

WU, H.; LIU, Q.; KALAVAGUNTA, P. K. Normal diet Vs High fat diet - A comparative study: Behavioral and neuroimmunological changes in adolescent male mice. **Metabolic Brain Disease**, p. 177–190, 2018.

XAVIER, H. et al. V Brazilian Guidelines of dyslipidemias prevention of atherosclerosis. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 1–22, 2013.

XIONG, H. et al. Cholesterol retention in Alzheimer ' s brain is responsible for high β - and γ -secretase activities and A β production. **Neurobiology of Disease**, v. 29, p. 422–437, 2008.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, 112(12), 1821–1830, 2003.

ZHANG, J.; HEBERT, J.; MULDOON, M. Dietary Fat Intake Is Associated with Psychosocial and Cognitive Functioning of School-Aged Children in the United States. **Nutritional Epidemiology**, 135(8), p. 1967-1973, 2005

ZOBEL, E. H. et al. Global Changes in Food Supply and the Obesity Epidemic. **Current Obesity Reports**, v. 5, n. 4, p. 449–455, 2016.

