



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

NATHASHA MARIA CORREA PRADO LOPES

**IMPACTO DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE
CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA O RECEPTOR DE LDL**

BRASÍLIA-DF

2022

NATHASHA MARIA CORREA PRADO LOPES

**IMPACTO DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE
CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA O RECEPTOR DE LDL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia Molecular, na área de concentração de Bioquímica.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Andreza Fabro de Bem
Coorientação: Dr^ª. Paula Maria Quaglio Bellozi

BRASÍLIA-DF

2022

Com todo o meu amor e gratidão, dedico este trabalho aos meus pais, Décio Prado e Janaína Corrêa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo fôlego de vida, pela esperança n'Ele que me faz forte e pelo privilégio de exercer o que amo. Porque Dele e por Ele são todas as coisas.

Aos meus professores, Dr^a. Andreza Fabro de Bem, que mesmo distante me instruiu e me apoiou, e Dr. Jair Goulart, que sempre me proporcionou novos conhecimentos. Gostaria de registrar a minha admiração e o meu respeito por ambos, sou grata pela confiança e oportunidade em mim depositadas.

À minha coorientadora Dr^a. Paula Quaglio, que nunca me desamparou na realização de experimentos, me incentivou a desenvolver autonomia e se tornou essencial para a minha evolução profissional e acadêmica. Exponho também a minha gratidão por me auxiliar na elaboração do projeto e por tornar minhas voltas para casa menos cansativas.

Aos colegas do laboratório LabdeBeM que estiveram comigo e tornaram possível a realização deste trabalho, com certeza aprendemos e melhoramos juntos com a mesma finalidade: exercer ciência com excelência.

À minha mãe, que enfrentou comigo os dias bons e ruins, me amparou com muito amor e vibrou com as minhas conquistas alegremente. O carinho, cuidado, incentivo, suporte, a preocupação, as conversas e risadas foram minha base para que eu alcançasse o que alcancei.

Ao meu pai, que sempre acreditou no meu potencial e me deu toda a assistência necessária para que eu pudesse ir atrás dos meus sonhos. Mesmo que de longe, nunca deixou de me encorajar e de ser meu exemplo de perseverança, de me proporcionar educação e afeto.

À minha família, irmãos e agregados, que me suportaram em amor e entenderam os meus pedidos de silêncio, sou grata pela torcida e pelo suporte.

Ao meu noivo, Kainã Ribeiro, que me aconselhou e me impulsionou durante a jornada. Responsável pela minha resiliência em tempos difíceis e pelas ligações animadas durante os experimentos. Obrigada pelo apoio emocional e pelas confidências, por sonhar e viver comigo.

À CAPES, à FAPDF e ao CNPq pelo apoio financeiro.

"I would just like to take this moment to say to all the young girls out there who dream about science as a profession: Go for it. It is the greatest job in the world. And if anybody tells you can't, don't listen."

Amy Farrah Fowler – The Big Bang Theory

RESUMO

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma dislipidemia de origem genética causada pelo prejuízo funcional do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), com subsequente distúrbio no metabolismo de lipoproteínas e acúmulo de colesterol na circulação sanguínea. O alto nível de colesterol circulante presente na lipoproteína de baixa densidade (LDL) produz efeitos prejudiciais no metabolismo celular, no desenvolvimento de tecidos e na bioenergética mitocondrial. Disfunções mitocondriais em diversos tecidos biológicos já foram descritas em modelos de HF, entretanto, a grande maioria dos estudos incluiu apenas indivíduos machos nas análises. Considerando que as disfunções metabólicas são impactadas diferentemente dependendo do sexo do indivíduo, faz-se importante estudar o impacto do dimorfismo sexual nos desfechos bioenergéticos em modelo de HF. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar e comparar o efeito do dimorfismo sexual sobre a função mitocondrial de hipocampo, tecido adiposo marrom (BAT), fígado e coração em camundongos C57Bl/6 selvagens e nocautes para o LDLR (LDLR^{-/-}). Foram utilizados camundongos machos e fêmeas C57Bl/6 e LDLR^{-/-} com aproximadamente 6 meses de idade. Os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta de sangue, destinado para a análise de triglicerídeos e colesterol total. Homogenatos dos hipocampus e do BAT e mitocôndrias isoladas de fígado e coração foram utilizados para avaliação do consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução (RAR). Os camundongos machos e fêmeas LDLR^{-/-} apresentaram aumento significativo nos níveis de colesterol e triglicerídeos quando comparados com os animais selvagens do mesmo sexo. No hipocampo de camundongos machos, a deleção genética do LDLR causou uma diminuição significativa do consumo de O₂ relacionado à atividade do complexo I+II, à fosforilação oxidativa e à capacidade respiratória máxima, quando comparados aos animais selvagens. Apesar de não serem observadas diferenças nesses mesmos parâmetros hipocampais entre as fêmeas LDLR^{-/-} e C57Bl/6, os mesmos foram significativamente menores em fêmeas selvagens em relação aos machos de mesmo genótipo. No BAT de machos LDLR^{-/-} também houve diminuição significativa na respiração mitocondrial relacionada à atividade da UCP-1 e na capacidade de reserva respiratória, comparados aos selvagens. A capacidade respiratória máxima do BAT de fêmeas selvagens foi significativamente menor quando comparada aos machos selvagens. Por outro lado, as fêmeas LDLR^{-/-} apresentaram diminuição significativa no consumo de O₂ relacionado à atividade do complexo I+II no fígado, em relação às selvagens. Ambos os sexos não apresentaram diferenças significativas na bioenergética mitocondrial no coração. Os

resultados sugerem que a deleção do LDLR afeta a bioenergética mitocondrial de diversos tecidos, com maior impacto em machos do que fêmeas, reforçando a importância de estudos da HF serem realizados em ambos os sexos, já que o dimorfismo sexual é um fator que impacta os desfechos dessa doença.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia familiar, colesterol, receptor de LDL, dimorfismo sexual, função mitocondrial.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia (FH) is a dyslipidemia with a genetic origin, which is caused by a functional impairment in the low-density lipoprotein receptor (LDLR), with subsequent disturbance in lipoprotein metabolism and cholesterol accumulation in the bloodstream. The high levels of circulating cholesterol existent in the low-density lipoprotein (LDL) induces harmful effects on cellular metabolism, tissue development and mitochondrial bioenergetics. Mitochondrial dysfunctions have already been described in several biological tissues in FH models, however, the vast majority of studies analyzed only male individuals. Considering that the sex differently impacts metabolic dysfunctions, it is paramount to study the impact of sexual dimorphism on FH model bioenergetics' outcomes. Therefore, the aim of this study was to evaluate and to compare the effect of sexual dimorphism on the mitochondrial function of hippocampus, brown adipose tissue (BAT), liver and heart in C57Bl/6 wild-type (WT) and LDLR knockout (LDLR^{-/-}) mice. Male and female C57Bl/6 and LDLR^{-/-} mice approximately 6 months old were used. Animals were anesthetized and euthanized for blood collection, in which triglycerides and total cholesterol levels were measured. Hippocampi and BAT homogenates, as well as hepatic and cardiac isolated mitochondria, were used to assess oxygen consumption through high-resolution respirometry. Male and female LDLR^{-/-} mice presented a significant increase in cholesterol and triglyceride levels, when compared to WT animals of the same sex. In male mice hippocampus, the genetic deletion of LDLR provoked a significant decrease in O₂ consumption related to complex I+II activity, in oxidative phosphorylation and in maximal respiratory capacity, when compared to WT animals. Although no differences in these same hippocampal parameters were observed between LDLR^{-/-} and C57Bl/6 females, they were significantly lower in WT females, when compared to males of the same genotype. In LDLR^{-/-} males BAT, there was also a significant decrease in mitochondrial respiration related to UCP-1 activity, and in the respiratory reserve capacity, compared to WT animals. The BAT maximum respiratory capacity was significantly lower in WT females, when compared to WT males. On the other hand, LDLR^{-/-} females presented a significant decrease in the hepatic O₂ consumption related I+II complex activity, when compared to WT ones. Both sexes showed no significant differences in cardiac mitochondrial bioenergetics. The results suggest that LDLR deletion affects the mitochondrial bioenergetics of several tissues, with a greater impact on males than females, reinforcing the importance of investigating HF in both sexes, since sexual dimorphism impacts the outcomes of this disease.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, cholesterol, LDL receptor, sexual dimorphism, mitochondrial function.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transporte de LDL via LDLR e principais causas genéticas da HF.	16
Figura 2. Terapias farmacológicas para HF na reciclagem e degradação do LDLR.....	18
Figura 3. Fosforilação oxidativa, produção de superóxido e vias antioxidantes.....	24
Figura 4. Esquema representativo do protocolo experimental.	29
Figura 5. Níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos em camundongos machos e fêmeas C57Bl/6 e LDLR ^{-/-}	33
Figura 6. Efeito das variáveis genótipo e sexo em complexos do ETS em homogenato de hipocampo.	35
Figura 7. Efeito das variáveis genótipo e sexo em complexos do ETS em homogenato de BAT.	37
Figura 8. Efeito das variáveis genótipo e sexo em complexos do ETS em mitocôndrias isoladas de fígado.	39
Figura 9. Efeito das variáveis genótipo e sexo em complexos do ETS em mitocôndrias isoladas de coração.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos realizados com camundongos LDLR ^{-/-} fêmeas que envolvem a função mitocondrial.....	26
Tabela 2. Formulação de nutrientes da dieta padrão..	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AGL	Ácidos graxos livres
ANOVA	Análise de variância
ApoE ^{-/-}	Nocaut para Apolipoproteína E
ASCVD	Doença cardiovascular aterosclerótica- <i>Atherosclerotic cardiovascular disease</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BAT	Tecido adiposo marrom - <i>Brown adipose tissue</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina sérica bovina – <i>Bovine serum albumin</i>
CCCP	Cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGTA	Ácido tetraacético Trietileno diamina glicol
EIM	Espaço intermembrana
ELSA	Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETS	Sistema de Transporte de Elétrons- <i>Electron transport system</i>
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo
GDP	Guanosina difosfato
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HDL	Lipoproteína de alta densidade – <i>High-density lipoprotein</i>
HEPES	4-(2-hidroxietil) -1- ácido piperazina etanosulfônico
HF	Hipercolesterolemia familiar
HFHe	HF heterozigótica
HFHo	HF homozigótica
HFD	Dieta hiperlipídica - <i>High fat diet</i>

HMG-CoA	Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
i.p.	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ PO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KO	Nocaute - <i>Knockout</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade – <i>Low-density lipoprotein</i>
LDLR	Receptor de LDL
LDLR ^{-/-}	Nocaute para LDLR
MA	Meio A
MB	Meio B
ME	Membrana externa
MR	Meio de reação
MI	Membrana interna
MPT	Transição de permeabilidade mitocondrial – <i>Mitochondrial permeability transition</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NNT	Nicotinamida Nucleotídeo Transidrogenase
PM	Piruvato e Malato
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OMY	Oligomicina
oxLDL	LDL oxidado
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PCSK9	Pró-proteína convertase subtilisina quexina tipo 9
Pi	Fosfato inorgânico
RAR	Respirometria de alta resolução
ROT	Rotenona
S	Succinato
SD	Dieta padrão – <i>Standard diet</i>
SEM	Erro padrão da média - <i>Standard error of the mean</i>
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase

TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico - <i>Tricarboxylic acid cycle</i>
TG	Triglicerídeos
UCP-1	Proteína desacopladora 1 - <i>Uncoupling protein 1</i>
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa – <i>Very-low density lipoprotein</i>
WAT	Tecido adiposo branco – <i>White adipose tissue</i>
WT	Selvagem - <i>Wild-type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Hipercolesterolemia Familiar</i>	15
1.2. <i>Dimorfismo sexual na hipercolesterolemia familiar</i>	18
1.3. <i>Modelo Animal de HF</i>	20
1.4. <i>Disfunção mitocondrial no modelo animal de HF</i>	22
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. <i>Objetivo Geral</i>	28
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. <i>Animais e Protocolo Experimental</i>	29
4.2. <i>Coleta de sangue e tecidos</i>	30
4.3. <i>Respirometria de Alta Resolução (RAR)</i>	30
4.3.1. <i>Respirometria do Hipocampo</i>	30
4.3.2. <i>Respirometria de BAT</i>	31
4.3.3. <i>Respirometria de fígado e coração</i>	31
4.4. <i>Análise do perfil lipídico</i>	32
4.5. <i>Análise estatística</i>	32
5. RESULTADOS	33
5.1. <i>Níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG)</i>	33
5.2. <i>O dimorfismo sexual e a ausência do LDLR causam efeitos No ETS no hipocampo</i>	33
5.3. <i>Há disfunção mitocondrial no BAT de camundongos machos LDLR^{-/-}, mas não de fêmeas</i> .	35
5.4. <i>A bioenergética mitocondrial do fígado é influenciada pelo sexo e genótipo</i>	37
5.5. <i>A atividade mitocondrial do coração não sofreu impacto do dimorfismo sexual e do genótipo</i>	39
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipercolesterolemia Familiar

O colesterol é um componente lipídico essencial na formação das membranas celulares e desempenha diversos papéis cruciais na modulação estrutural e funcional de células. O colesterol celular é adquirido principalmente por alimentos e pela síntese intracelular, predominantemente em células do fígado e do intestino (PAUKNER; LESNÁ; POLEDNE, 2022). Nos mamíferos, também é precursor de moléculas esteroides como ácidos biliares, hormônios esteroides e vitaminas. No entanto, o colesterol excessivo ou hipercolesterolemia, caracterizados por níveis elevados de colesterol presentes na lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein*, LDL), produz efeitos prejudiciais no metabolismo celular, no desenvolvimento de tecidos e na fisiologia do corpo (PAUKNER; LESNÁ; POLEDNE, 2022; YU et al., 2019).

Em 1985, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido aos pesquisadores Michael S. Brown e Joseph L. Goldstein ao caracterizarem a regulação do metabolismo do colesterol pela descoberta do receptor de LDL (LDLR), e evidenciarem que a deficiência no gene deste receptor, ou nas proteínas que regulam seu metabolismo, configura a causa subjacente da hipercolesterolemia familiar (SOKAL et al., 1978; ZETTERSTRÖM, 2009). A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma dislipidemia de origem genética, com padrão hereditário autossômico dominante, caracterizada pelo distúrbio no metabolismo de lipoproteínas, em função do prejuízo funcional do LDLR, com diminuição na absorção desta lipoproteína pelos tecidos, principalmente pelo fígado, e acúmulo de colesterol na circulação sanguínea (ALVES; TAKAO SUEHIRO JUNIOR; BRAILOWSKY PELLEGRINO, 2021; HE et al., 2019; MYTILINAIYOU et al., 2018)

O colesterol, na partícula de LDL, é captado pelo LDLR, um receptor altamente específico presente na superfície das células. O complexo ligante-receptor formado por LDL e LDLR sofre endocitose e, desse modo, o colesterol é absorvido. Os receptores internalizados são reciclados e voltam à superfície diversas vezes antes que enzimas específicas levem à degradação lisossomal (BENITO-VICENTE et al., 2018; HUFF M. W. et al., 2014; MYTILINAIYOU et al., 2018). De acordo com o banco de dados de variantes LDLR da *University College London* (UCL), foram registradas aproximadamente 2.900 variações alélicas do LDLR, sendo que a classificação das diferentes variantes patogênicas inclui:

receptores ausentes, transporte bloqueado para o aparelho de Golgi, internalização ou reciclagem defeituosa, e receptores disfuncionais (LEIGH et al., 2017).

O principal foco de triagem para HF são as variantes patogênicas do LDLR por totalizarem mais de 90% dos casos (HARTGERS; RAY; HOVINGH, 2015). A segunda mutação genética mais predominante nos casos de HF corresponde de 2 a 5% dos casos e envolve uma apolipoproteína denominada ApoB, encontrada em partículas de LDL, sendo responsável pela ligação ligante-receptor na superfície celular. Em casos de ApoB mutante, a ligação das partículas de LDL ao LDLR é prejudicada e contribui para o subsequente acúmulo de LDL na circulação sanguínea. O terceiro gene que contribui para a prevalência da HF é a pró-proteína convertase subtilisina quexina tipo 9 (*proprotein convertase subtilisin type 9*, PCSK9), cuja função é mediar a degradação do LDLR nos lisossomos. Em variantes patogênicas de PCSK9 com aumento de função, há maior degradação do LDLR e menor disponibilidade do receptor na membrana, aumentando o nível de LDL circulante (Figura 1) (MYTILINAIYOU et al., 2018; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015).

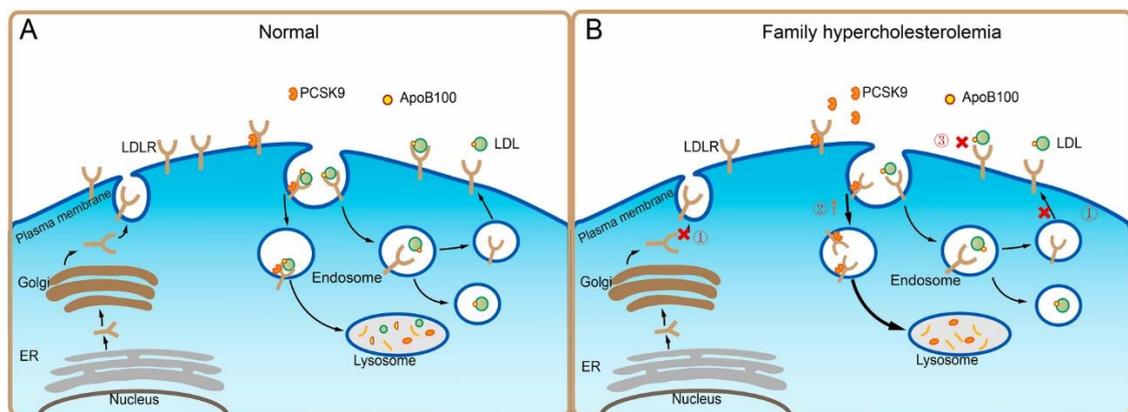


Figura 1. Transporte de LDL via LDLR e principais causas genéticas da HF. **A:** O receptor de LDL é sintetizado a partir do retículo endoplasmático (RE) e, depois, processado no complexo de Golgi para que seja transportado para a membrana celular. Na membrana, o LDLR se liga à ApoB-100 que contém partículas de colesterol e o complexo sofre endocitose. Nos endossomos, a partícula de LDL e o LDLR são dissociados, o LDL é encaminhado ao lisossomo para degradação e o LDLR reciclado para a superfície, com regulação do colesterol intracelular e da PCSK9. **B:** Na HF, as mutações mais comuns são as: ① mutações de LDLR que inibem a exposição e a reciclagem do LDLR; ② mutações na PCSK9 com ganho de função e, conseqüentemente, maior degradação do LDLR; ③ mutações em ApoB-100 que bloqueiam a interação entre LDL e LDLR, prejudicando o transporte de LDL nas células (Adaptado de LIU et al., 2021).

Indivíduos heterozigotos para a HF apresentam diminuição na capacidade de depuração sanguínea de LDL e aumento de duas a três vezes nos níveis de colesterol plasmático. Em homozigotos, a taxa de depuração de LDL atinge apenas um terço da taxa normal, o que resulta

no aumento de três a seis vezes nos níveis de colesterol plasmático, um fator de risco para a incidência de aterosclerose, doença tipificada pelo acúmulo de lipídios e elementos fibrosos nas artérias (ALVES; TAKAO SUEHIRO JUNIOR; BRAILOWSKY PELLEGRINO, 2021; MYTILINAIYOU et al., 2018). Desse modo, a HF é considerada uma doença de alto risco cardiovascular devido à alta morbimortalidade e incidência, com aproximadamente 1:200 indivíduos na forma heterozigótica e 1:300.000 na forma homozigótica no mundo. No Brasil, estima-se que há uma população de 766.000 indivíduos afetados pela HF heterozigótica e, ao assumir a prevalência mundial de homozigotos, o país deve ter cerca de 1.033 casos de HF homozigótica (HFHo) (ALVES; TAKAO SUEHIRO JUNIOR; BRAILOWSKY PELLEGRINO, 2021; BEHESHTI et al., 2020; IZAR et al., 2021).

A HF apresenta heterogeneidade significativa, com manifestação dependente do gene específico e da variação do nível de LDL plasmático (HE et al., 2019; MYTILINAIYOU et al., 2018). Os sinais físicos geralmente são mais graves e mais precoces em pacientes com HFHo do que em pacientes com HF heterozigótica (HFHe), entretanto, o risco da doença cardiovascular (DCV) prematura é aumentado em ambos os grupos (ITO; WATTS, 2015; MYTILINAIYOU et al., 2018). Além disso, a deposição de colesterol na córnea dos olhos favorece a incidência do arco corneano, enquanto sua deposição no tecido vascular e extravascular, como tendões e pele, favorece o aparecimento de xantomas. A doença arterial coronariana (DAC), calcificações na raiz da aorta, dano endotelial vascular e aterosclerose acelerada são outras patologias associadas à HF (HE et al., 2019; ITO; WATTS, 2015; MYTILINAIYOU et al., 2018).

O diagnóstico de HF pode ser confirmado com a utilização de testes genéticos, escores de diagnóstico que indicam a presença de HF como possível, provável ou definitiva, ou com critérios que consideram sinais físicos e o histórico familiar do paciente (ALVES; TAKAO SUEHIRO JUNIOR; BRAILOWSKY PELLEGRINO, 2021; ITO; WATTS, 2015; MYTILINAIYOU et al., 2018; RAAL; SANTOS, 2012). No Brasil, desde 2017 os laudos laboratoriais destacam valores de colesterol total ≥ 310 mg/dL em adultos e ≥ 230 mg/dL em crianças e adolescentes como sugestivos de HF (IZAR et al., 2021). Apesar de existirem vários sistemas de diagnósticos, a HF ainda permanece subdiagnosticada e, conseqüentemente, a implementação dos tratamentos que previnem a progressão é tardia. As terapias farmacológicas atuais são feitas com inibidores de hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase ou estatinas, além de outros hipolipemiantes, como a ezemítiba. Outras terapias potenciais incluem

inibidores de PCSK9, transplante hepático e terapias imunossupressoras (Figura 2)(MYTILINAIU et al., 2018; RAAL; SANTOS, 2012).

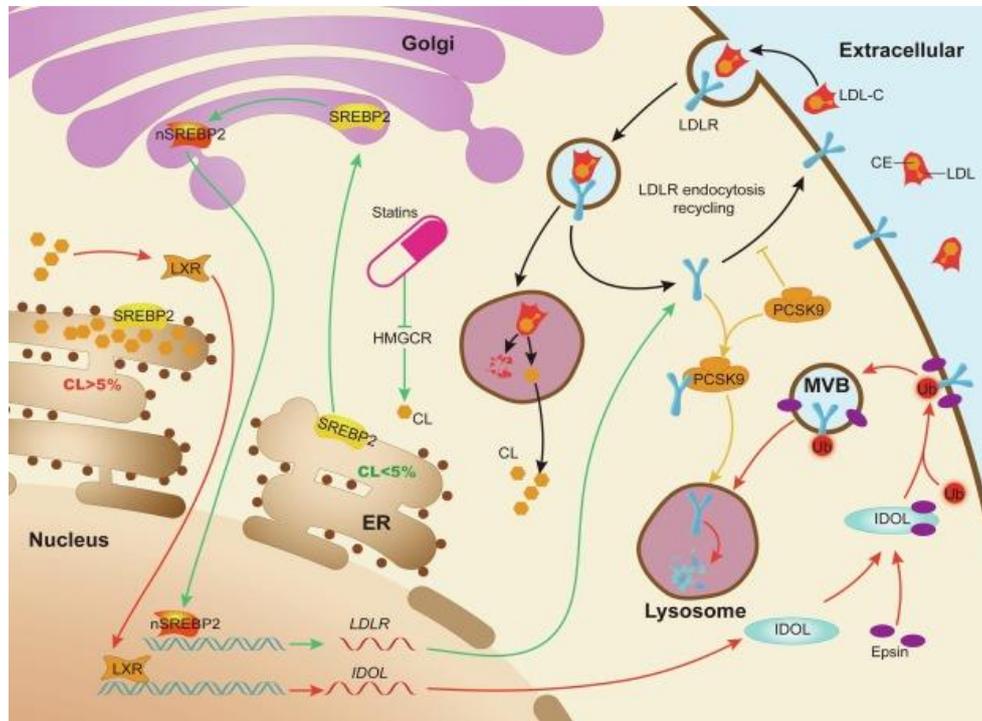


Figura 2. Terapias farmacológicas para HF na reciclagem e degradação do LDLR. A via SREBP2/LDLR (linhas verdes) é regulada pelo nível de colesterol no retículo endoplasmático (ER). As estatinas reduzem os níveis de LDL-C (<5%) por meio da inibição da atividade do H MGCR – enzima limitante na síntese de colesterol –, promovem a distribuição e reciclagem de LDLR na superfície celular pela ativação da via SREBP2/LDLR (linhas pretas) e, ao mesmo tempo, a expressão da proteína IDOL é inibida, reduzindo a ubiquitinação de LDLR por IDOL (linhas vermelhas). O acúmulo de colesterol (>5%) no ER impede a ativação do complexo SREBP2/SCAP, que diminui a síntese de LDLR e aumenta a degradação do LDLR no lisossomo. A PCSK9 atua como uma chaperona para mediar a degradação do LDLR no lisossomo (linhas laranjas), atuando na homeostase de colesterol em células mamíferas. MVB: corpo multivesicular. LXR: receptores X no fígado (Adaptado de YANG et al., 2020).

1.2. Dimorfismo sexual na hipercolesterolemia familiar

O dimorfismo sexual refere-se às diferenças fenotípicas e genotípicas entre fêmeas e machos da mesma espécie, cujo estudo pode ser relevante para a elucidação de doenças, ampliando a prevenção, o diagnóstico e o tratamento (MITTENDORFER, 2005). Na espécie humana, os indivíduos dos sexos feminino e masculino diferem metabolicamente, principalmente na cinética lipídica, o que inclui as diferenças de secreção e depuração de triglicerídeos, de taxas de liberação de ácidos graxos livres (AGL) e da distribuição da gordura

corporal, com relevante efeito dos esteroides sexuais — andrógenos nos machos e estrogênios nas fêmeas (BLOOR; SYMONDS, 2014; SANTOSA; JENSEN, 2015).

As diferenças sexuais no metabolismo lipídico e o correspondente risco de doenças metabólicas não são atribuídos somente aos efeitos dos hormônios sexuais, mas também a outros fatores, desde a herança genética, que é um fator não modificável, até os hábitos alimentares, condição modificável (LORBEEK et al., 2013; SUGIYAMA; AGELLON, 2012). Os estudos já publicados relacionados ao metabolismo foram, em grande parte, obtidos por meio de experimentos com indivíduos do sexo masculino. No entanto, as conclusões são por muitas vezes extrapoladas para ambos os sexos, podendo representar análises equivocadas sobre metabolismo de nutrientes em indivíduos do sexo feminino (SANTOSA; JENSEN, 2015; SUGIYAMA; AGELLON, 2012).

Os estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência de HF pode variar amplamente entre as populações por consequência da utilização de diferentes critérios diagnósticos e métodos de amostragem. Além disso, apenas 9% dos países no mundo descrevem a prevalência de HF, com análises clínicas ocorrendo principalmente da Europa, América do Norte, Ásia Oriental e Austrália (BEHESHTI et al., 2020). Os dados são subdivididos de acordo com diversos marcadores clínicos, como idade, sexo, raça ou etnia, além de algumas vezes estarem associados a fatores de risco, como hipertensão, diabetes e obesidade (BEHESHTI et al., 2020; PANG et al., 2018).

Os resultados encontrados pelo Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil), sugerem que, no Brasil, a incidência geral é estimada em um em cada 263 indivíduos, sendo maior em mulheres — uma em cada 244 —, e em negros — um caso em cada 156 (HARADA et al., 2018). Conjuntamente, diversos estudos evidenciam que há a maior prevalência de HF em mulheres, apesar de homens apresentarem maior susceptibilidade aos fatores de risco para DCV recorrente de HF e iniciarem terapia hipolipemiante em idade anterior à das mulheres (COUTINHO et al., 2021; IYEN et al., 2020; PAJAK et al., 2016; WATTS; PANG; SANTOS, 2015).

Sugere-se que o predomínio de mulheres nas populações com HF estudadas pode ter o viés de sobrevivência, uma vez que os homens hipercolesterolêmicos podem desenvolver doença cardiovascular aterosclerótica (*atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD*) mais precocemente, associada a alto risco de mortalidade (COUTINHO et al., 2021; SANTOSA; JENSEN, 2015). Por outro lado, em estudo com meninas e meninos, com idade entre 0 e 19

anos, e com HF não-tratada, houve detecção de níveis significativamente superiores aos de colesterol total e LDL nos indivíduos do sexo feminino, reafirmando a necessidade de avaliar o possível dimorfismo sexual nos níveis de colesterol plasmático (HOLVEN et al., 2018).

Ademais, as mulheres no período pré-menopausa são menos susceptíveis a DCV. Contudo, no período pós-menopausa, o risco para DCV e doenças metabólicas aumenta drasticamente, alcançando risco de morbidade e mortalidade comparável ao de homens (LORBEK et al., 2013; SANTOSA; JENSEN, 2015). Estudos anteriores também demonstraram que a incidência de colestase e de cálculos biliares de colesterol é maior em mulheres na pré-menopausa do que em homens, confirmando a necessidade de amplificar as investigações que apreciem as particularidades inerentes ao dimorfismo sexual e, além disso, ao climatério feminino (SUGIYAMA; AGELLON, 2012).

1.3. Modelo Animal de HF

Modelos animais que se assemelham com a anatomia e fisiopatologia humana são comumente utilizados em investigações pré-clínicas, a fim de se obter resultados que possam ser extrapolados para a saúde humana. Para a seleção de um modelo animal ideal é necessário considerar a facilidade de obtenção dos animais, o custo para mantê-los, além de ser indispensável que as características genéticas sejam bem definidas (EMINI VESELI et al., 2017). Para o estudo de HF e aterosclerose, os camundongos e coelhos são os modelos animais mais utilizados, seguidos por porcos e primatas não humanos. Entretanto, os camundongos apresentam um perfil lipídico diferente dos humanos, sendo necessária a manipulação genética do metabolismo lipídico desses animais para poderem ser considerados modelos de HF (EMINI VESELI et al., 2017; GODFREY S. GETZ; CATHERINE A. REARDON, 2012).

Na atualidade, o camundongo é a espécie predominante para o estudo de HF em virtude da facilidade da manipulação genética e de sua rápida reprodução. Em condições normais, os camundongos apresentam baixas concentrações de LDL e da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), sendo que a maior parte do colesterol é transportado por partículas semelhantes a lipoproteínas de alta densidade (*high-density lipoprotein*, HDL) (GODFREY S. GETZ; CATHERINE A. REARDON, 2012). Para a hipercolesterolemia familiar, os modelos de camundongos mais utilizados são os que apresentam deleção do gene que codifica o receptor de LDL (LDLR^{-/-}), ou deleção do gene responsável pela expressão da apolipoproteína E (ApoE^{-/-}).

^{-/-}), de modo que ambos modelos apresentam o aumento dos níveis plasmáticos de colesterol total (EMINI VESELI et al., 2017; JACKSON; BOND, 2011).

Em condições normais, o LDLR é suscetível à regulação e, assim, as células podem suprimir a atividade do receptor quando o estoque de colesterol é adequado, dificultando a superacumulação patológica intracelular de ésteres de colesterol (JEON; BLACKLOW, 2005). Entretanto, em indivíduos homocigotos para HF ou em animais LDLR^{-/-}, a ausência de receptor impede a ligação e a captação da LDL, portanto, há um aumento compensatório na síntese desta lipoproteína pelas células, mesmo se os níveis de LDL já estiverem elevados no plasma. Como consequência, o acúmulo de grandes quantidades de ésteres de colesterol pode resultar em toxicidade celular e lesões ateroscleróticas (GOLDSTEIN; BROWN, 1977; JEON; BLACKLOW, 2005).

No início da década de 1990, Ishibashi e colaboradores desenvolveram os camundongos LDLR^{-/-}, amplamente utilizados como modelo de HF por apresentarem semelhanças com a condição humana, causada por mutações no gene de LDLR (ISHIBASHI et al., 1993). Quando comparados aos camundongos ApoE^{-/-}, eles apresentam vantagens como modelos de HF, sendo elas: o colesterol plasmático é transportado primordialmente por partículas de LDL, semelhantemente à condição humana heterocigótica de HF; a ausência do LDLR não demonstra grande impacto nos processos inflamatórios como na deficiência de ApoE; e a gravidade da dislipidemia é intermediária, com o desenvolvimento de lesões menos severas que os camundongos ApoE^{-/-} (EMINI VESELI et al., 2017; ISHIBASHI et al., 1994; JACKSON; BOND, 2011). Pesquisas anteriores confirmam que o modelo animal, compreendendo machos e fêmeas, apresenta alterações metabólicas e morfológicas quando submetido, ou não, às dietas hiperlipídicas. Entretanto, os estudos não exploram as diferenças apresentadas entre os sexos (ISHIBASHI et al., 1994).

A maior parte dos modelos de HF, como os camundongos LDLR^{-/-}, não desenvolvem espontaneamente as complicações clínicas observadas em humanos com HF e, em geral, os modelos são submetidos à dieta tipo ocidental, ou hiperlipídica, para manifestarem lesões graves características da condição patológica humana. Não obstante, o perfil lipídico do modelo citado, mesmo alimentado com dieta padrão, também exhibe suscetibilidade aos prejuízos cardiovasculares e aos danos reportados no sistema nervoso central (SNC) oriundos da HF (DE OLIVEIRA et al., 2020; ISHIBASHI et al., 1994; JACKSON; BOND, 2011; VIANA GONÇALVES et al., 2017). Diante o exposto, as alterações fisiopatológicas dos modelos

animais em condições alimentares diversas devem ser exploradas, não excluindo a dieta padrão, ao considerar os diferentes fatores e graus de risco apresentados na HF.

Em 2005, pesquisadores identificaram a presença de uma mutação espontânea no gene *Nnt* em camundongos C57Bl/6J, que servem de background genético para diversos camundongos transgênicos, incluindo o modelo *LDLR*^{-/-} (TOYE et al., 2005). O gene *Nnt* é responsável pela codificação da enzima mitocondrial Nicotinamida Nucleotídeo Transidrogenase (NNT), envolvida no equilíbrio redox e na síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (RONCHI et al., 2013; SIMON et al., 2013). Portanto, o estudo da bioenergética mitocondrial nesses modelos deve levar em consideração o *background* genético de ambos os grupos, transgênicos e selvagens.

1.4. Disfunção mitocondrial no modelo animal de HF

A mitocôndria é uma organela celular pleomórfica altamente dinâmica, composta por duas membranas: a membrana externa (ME), que separa a mitocôndria do citoplasma, e a membrana interna (MI), que envolve uma região rica em proteínas, denominada matriz mitocondrial (LEAVER et al., 1983; UNSELD et al., 1997). As membranas mitocondriais são separadas pelo espaço intermembranar (EIM) e são funcionalmente distintas. Enquanto a membrana externa é lisa e contém proteínas (porinas) que conferem permeabilidade a solutos com massa molecular inferior a 10kD (OLIVEIRA; VERCESI, 2020; ZALMAN et al., 1980), a membrana interna é curvada e forma cristas internas, sendo amplamente impermeável a íons e moléculas polares, contendo, no entanto, alta concentração de proteínas e canais que são responsáveis pelo fluxo de íons que percorrem a matriz mitocondrial (NAKAE, 1976; ZALMAN et al., 1980).

Além do papel crucial na síntese de adenosina trifosfato (ATP), pela fosforilação oxidativa (Mitochondrial Oxidative Phosphorylation system, OXPHOS), as mitocôndrias estão envolvidas em diversos processos metabólicos, como a biossíntese de aminoácidos, via da β -oxidação de ácidos graxos, cetogênese, termogênese (no tecido adiposo marrom — *brown adipose tissue*, BAT), gliconeogênese, o ciclo do ácido tricarbóxico (*tricarboxylic acid cycle*, TCA), o metabolismo do metal, sintetizando aglomerados heme e Fe-S, e outras atividades metabólicas, como a homeostase de Ca^{2+} (KENNEDY; LEHNINGER, 1949; MITCHELL, 1975; ZALMAN et al., 1980). As mitocôndrias de mamíferos compreendem mais de 1.500 proteínas, que variam de acordo com a espécie e em resposta às necessidades celulares de

tecidos específicos e, além disso, possuem um genoma circular, o DNA mitocondrial (mtDNA), que provém de uma herança quase exclusivamente materna em animais (GOEHRING et al., 2011; LECRENIER et al., 1997; TIRANTI et al., 1997).

No citoplasma celular, as enzimas envolvidas na via glicolítica realizam a oxidação da molécula de glicose (do grego: glykýs, açúcar e lýsis, quebra) a piruvato, que entra na matriz mitocondrial, e ao ser associada ao Acil-Coa, derivado de ácidos graxos, gera os transportadores de elétrons Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) e Flavina Adenina Dinucleotídeo (FADH₂) pela via do TCA, doando elétrons para a cadeia ou sistema de transporte de elétrons (*Electron transport system*, ETS) localizada na membrana interna da mitocôndria (KENNEDY; LEHNINGER, 1949; LOGAN, 2006; STOCK et al., 1999). Os transportadores de elétrons, ou coenzimas reduzidas, são oxidados nos complexos proteicos I, II, III e IV do ETS, e os elétrons doados são transportados entre os complexos e a ubiquinona, até alcançarem o aceptor final, uma molécula de oxigênio (O₂), sendo reduzida à água. Os complexos I, III e IV geram um gradiente de prótons pelo bombeamento de prótons da matriz para o EIM e os prótons retornam para a matriz por meio da ATP sintase (ou complexo V), que conduz a conversão de adenosina difostato (ADP) + fosfato inorgânico (Pi) em ATP. Essas reações fazem com que o funcionamento do ETS esteja acoplado à oxidação do substrato e à fosforilação do ADP (JASTROCH et al., 2010; MITCHELL, 1975; NAKAE, 1976; STOCK et al., 1999).

Além da produção de ATP, o potencial eletroquímico da membrana induzido pela OXPHOS é vital para a organela e pode ser utilizado como parâmetro para avaliar a dinâmica e a função mitocondrial em resposta aos estímulos associados a doenças como a HF. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas principalmente pelas mitocôndrias e são originadas durante a redução do O₂ no ETS, gerando o ânion superóxido (O₂^{•-}) que, posteriormente, pode ser convertido em peróxido de hidrogênio por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (MITCHELL, 1961; NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; STOCK et al., 1999). Os complexos I, II e III do ETS contêm sítios onde os elétrons podem reduzir antecipadamente o oxigênio e, assim, favorecer a formação de superóxido. Nesse contexto, destaca-se o complexo III, por sua capacidade de produzir EROs na matriz mitocondrial e, também, no espaço intermembrana, facilitando a sinalização celular (Figura 3) (CHANDEL et al., 1998; HAMANAKA; CHANDEL, 2010; MITCHELL, 1975).

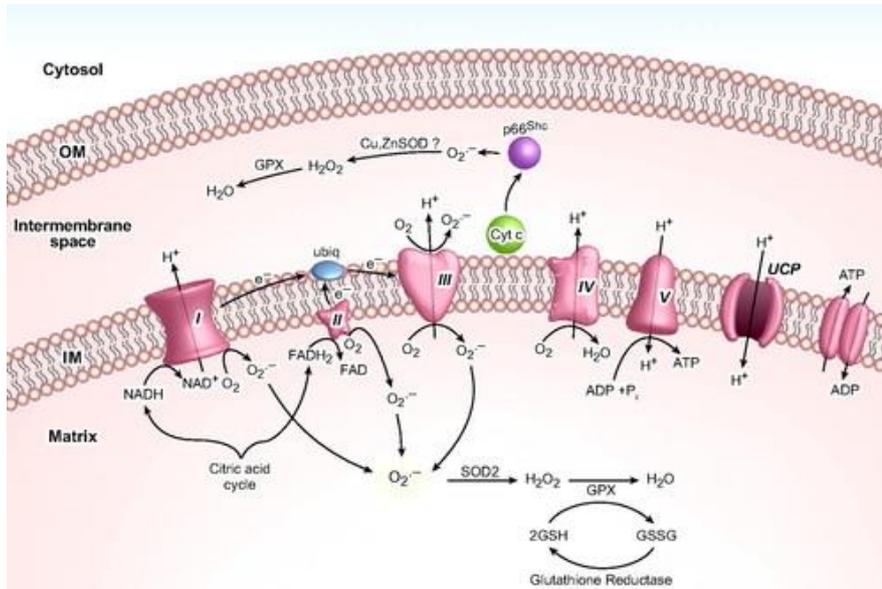


Figura 3. Fosforilação oxidativa, produção de superóxido e vias antioxidantes. Os elétrons (e^-) de NADH e $FADH_2$ transitam pelos complexos I, II e, por meio da ubiquinona (Ubiq), se direcionam ao III. O citocromo c (Cyt C) transfere elétrons do complexo III para o IV, que reduz O_2 para formar H_2O . O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons (H^+) nos complexos I, III e IV para o espaço intermembranar e os prótons, por sua vez, voltam à matriz pelo complexo V. As proteínas desacopladoras (UCPs) permitem que os prótons retornem à matriz reduzindo a formação de EROs. GPX: glutathione peroxidase. GSSG: glutathione oxidada. GSH: glutathione reduzida. GSH/GSSG: razão da glutathione oxidada pela reduzida (Adaptado de MADAMANCHI; RUNGE, 2007).

Os modelos experimentais de dislipidemia causada por alterações genéticas são úteis para investigar se o excesso de lipídios na circulação sanguínea e, conseqüentemente, no interior das células, pode afetar a função mitocondrial e desencadear complicações clínicas. Evidências experimentais mostram que em camundongos $LDLR^{-/-}$, as mitocôndrias de vários tecidos são mais suscetíveis ao desbalanço redox, à geração de oxidantes e MPT. (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA; VERCESI, 2020; VERCESI et al., 2007). O desequilíbrio redox mitocondrial no modelo animal de HF pode estar envolvido em dois eventos que contribuem com a progressão da patologia: i) produção de moléculas oxidantes que reagem com o LDL e ii) morte celular por via mitocondrial (VERCESI et al., 2007).

Em camundongos $LDLR^{-/-}$, o estresse oxidativo mitocondrial foi associado à depleção de substratos mitocondriais ligados ao NADP, parcialmente explicado pela síntese aumentada de colesterol nas células, que é uma via que consome grandes quantidades de NADPH (OLIVEIRA et al., 2005; PAIM et al., 2008). Em indivíduos hipercolesterolêmicos, já foi demonstrado que os oxidantes, principalmente oriundos da mitocôndria, estavam aumentados

em monócitos do sangue periférico, assim como os níveis de LDL oxidado (oxLDL) (VASCONCELOS et al., 2009). Além disso, o oxLDL também apresentou níveis elevados em pacientes com hipercolesterolemia e DAC (HULTHE; FAGERBERG, 2002; VASCONCELOS et al., 2009), o que impulsiona mecanismos que contribuem para o aumento do estresse oxidativo sistêmico e dos fatores de risco, tanto metabólicos quanto imunológicos, da HF.

Estudos anteriores verificaram que a disfunção mitocondrial associada ao estresse oxidativo ocorre em diversos tecidos de camundongos LDLR^{-/-} submetidos à dieta normolipídica, mesmo na ausência de complicações clínicas graves (OLIVEIRA; VERCESI, 2020). O desequilíbrio redox mitocondrial pode induzir dois desfechos que estão envolvidos na HF, como a oxidação de LDL e a ativação de morte celular, acentuando a condição patológica. No fígado, as mitocôndrias do modelo de HF apresentam maior geração de oxidantes que os controles e, também, são mais suscetíveis à transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por Ca²⁺ (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA; VERCESI, 2020).

Os camundongos LDLR^{-/-}, quando alimentados com dieta hiperlipídica por longo prazo, desenvolvem inflamação hepática, com aumento da absorção de oxLDL, apresentam esteatose hepática e fibrose hepática, morte celular por apoptose e exibem perfis inflamatórios no fígado (BIEGHS et al., 2012). A deficiência do gene do LDLR prejudica a regeneração hepática e, mesmo na ausência de estímulos patológicos ou de manipulação dietética, os camundongos apresentam um aumento de 50% nos níveis de colesterol hepático, em concordância com a disfunção mitocondrial no fígado (PAUTA et al., 2013). A disfunção no tecido cardíaco, por sua vez, está primordialmente associada à hiperglicemia sustentada, resistência à insulina e aos distúrbios metabólicos, como a inflamação e hiperlipidemia, condições conexas à HF que favorecem a morte de cardiomiócitos, infarto do miocárdio, angina pectoris e eventual fibrose tecidual (COLE et al., 2011; NORDESTGAARD et al., 2013).

Os efeitos da hipercolesterolemia não estão restritos ao sistema cardiovascular. Estudos mais recentes mostram que as células neurais e o funcionamento cerebral também são afetados pela hipercolesterolemia. Estudos anteriores de nosso grupo mostram que níveis aumentados de colesterol se correlacionaram com comprometimento cognitivo, prejuízos de memória e a disfunção mitocondrial no córtex cerebral e hipocampo de camundongos LDLR^{-/-} (DE OLIVEIRA et al., 2013). A neuroinflamação, perturbação da neurogênese e disfunção da integridade da barreira hematoencefálica (BHE), também foram associadas aos comprometimentos cognitivos evidenciados nos camundongos LDLR^{-/-} (OLIVEIRA et al., 2014, 2020; ENGEL et al., 2019). Neste sentido nossa hipótese é que a disfunção mitocondrial

em células neurais pode comprometer a bioenergética cerebral e, de alguma forma, estar associada aos desfechos inflamatórios e comportamentais.

Em níveis moderados, a formação de EROs no tecido adiposo é essencial para a transdução de sinal da insulina, mas quando em estresse oxidativo crônico, os altos níveis de EROs contribuem para o desenvolvimento de resistência à insulina, intolerância à glicose e progressão de várias doenças metabólicas (BLOOR; SYMONDS, 2014b; LEE et al., 2019; ZHENG et al., 2021). Em adipócitos de camundongos hipercolesterolêmicos, estudos relatam a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, produção anormal de adipocinas e aumento da produção de EROs (BOURNAT; BROWN, 2010; HAN et al., 2013; VICTOR et al., 2009). A regulação da atividade mitocondrial em adipócitos, em particular no BAT, deve ser explorada, uma vez que as mitocôndrias desse tecido estão envolvidas na homeostase lipídica, na regulação da sensibilidade à insulina e na termogênese corporal (LEE et al., 2019; VAMECQ et al., 2012).

Apesar das evidências supracitadas sobre as disfunções mitocondriais em tecidos periféricos, induzidas pela dieta hiperlipídica ou pela ausência do LDLR, a implicação que sexo biológico desempenha na fisiopatologia de HF ainda é muito pouco estudada (NORDESTGAARD et al., 2013; SANTOSA; JENSEN, 2015). Entretanto, em modelos animais, há poucas evidências do prejuízo da atividade mitocondrial em fêmeas (Tabela 1), pois a maioria dos estudos contempla apenas indivíduos do sexo masculino. Os estudos utilizando machos são comumente extrapolados para a aplicação em ambos sexos, não considerando o papel do dimorfismo sexual no metabolismo de colesterol, homeostase redox e resposta imune (BHUPATHY; HAINES; LEINWAND, 2010; WANG; AHN; ASMIS, 2020).

Tabela 1. Estudos realizados com camundongos LDLR^{-/-} fêmeas que envolvem a função mitocondrial.

Idade (meses)	Sexo	Dieta/Intervenção	Tecidos Avaliados	Disfunção Mitocondrial	Referência
12	Fêmeas	HFD	Coração e fígado	SIM	(HAMILTON et al., 2016)
12	Fêmeas	HFD e SD	Fígado	Não avaliaram	(BRAGA et al., 2021)
4-6	Fêmeas e Machos	SD e Cítrato	Fígado	SIM	(PAIM et al., 2008)

HFD, dieta hiperlipídica (*high fat diet*); SD, dieta padrão (*standard diet*). Dados coletados da base de dados Pubmed com a utilização das seguintes palavras-chave para a busca: *LDL receptor knockout + female mice + mitochondria* ou *LDLR^{-/-} + female mice + mitochondria*. Foram considerados todos os resultados da busca que atenderam às informações acima citadas. Data da busca: 11 de agosto de 2022.

2. JUSTIFICATIVA

A HF é considerada um problema de saúde de alta prevalência e que inclui múltiplos fenótipos, devido às diferentes etiologias moleculares e fatores genéticos adicionais. No Brasil, há estimativa de que 766.000 indivíduos sejam afetados pela HF, com a prevalência maior em mulheres (0,38%) e posteriormente em homens (0,30%). Além disso, caracteriza-se por ser uma forma grave de dislipidemia de base genética, em que cerca de 85% dos homens e 50% das mulheres podem ter um evento coronariano antes de completar os 65 anos, se não tratados adequadamente. No entanto, o diagnóstico precoce e o tratamento individualizado, conforme os aspectos genéticos, moleculares e sexuais, podem aumentar a expectativa de vida dos afetados.

Como mencionado anteriormente, homens e mulheres apresentam diferenças significativas na prevalência e na manifestação de doenças cardiovasculares, no metabolismo lipídico, na sensibilidade à insulina, na capacidade oxidativa e na termogênese (LORBEEK et al., 2013; SUGIYAMA; AGELLON, 2012). Conseqüentemente, os estudos de distúrbios metabólicos devem considerar o dimorfismo sexual ao assumir as particularidades e os riscos pertencentes ao sexo. Entretanto, a maioria das pesquisas relacionadas à HF com camundongos LDLR^{-/-}, modelo animal para HF e aterosclerose, não integram informações que identificam as alterações metabólicas entre animais machos e fêmeas.

A função mitocondrial, no que lhe concerne, se estende além dos limites da célula e influencia a fisiologia de um organismo, regulando a comunicação entre células e tecidos. Sabe-se que a HF está relacionada com o aumento do estresse oxidativo celular e que o principal mecanismo proposto para esse aumento é a disfunção mitocondrial, com a produção de EROs e alteração de vias inflamatórias e apoptóticas (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA; VERCESI, 2020; VERCESI et al., 2007). Neste sentido, o dinamismo mitocondrial é um fator-chave para a compreensão da bioenergética celular em diversos órgãos afetados pela HF. Não obstante, é importante identificar os fatores que fundamentam as diferenças metabólicas apresentadas entre homens e mulheres, principalmente na condição da HF.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Investigar o impacto da deleção genética do LDLR e a influência do dimorfismo sexual sobre a função mitocondrial em camundongos.

3.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar a função mitocondrial, por respirometria de alta resolução, em homogenato de hipocampo e BAT, e mitocôndrias isoladas de fígado e coração, de camundongos machos e fêmeas, nocautes (KO, *knockout*) e selvagens (WT, *wild-type*) para o receptor de LDL.
- Avaliar a influência do dimorfismo sexual e do genótipo (expressão ou ausência de LDLR) sobre a atividade mitocondrial nos diferentes tecidos estudados.
- Quantificar os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos em camundongos WT e LDLR^{-/-}.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e Protocolo Experimental

No presente estudo, utilizamos camundongos machos e fêmeas, C57Bl/6 WT e LDLR^{-/-} (B6.129S7- LDLR^{tm1Her/J}) com o mesmo background genético, adquiridos no Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) e criados na Universidade de Brasília (UnB, Distrito Federal, Brasil). Os animais foram mantidos em grupos de quatro a cinco por gaiola, sob temperatura controlada (23±1°C) e ciclo de luz de 12h (luzes acesas às 7h), com acesso a ração e água *ad libitum*. Os camundongos foram alimentados com uma dieta padrão para roedores (SD; 15% de gordura) da PRAGSOLUÇÕES Biociências (ver composição nutricional completa na Tabela 2). Para o protocolo experimental, foram utilizados camundongos machos e fêmeas com seis meses de idade, divididos em quatro grupos experimentais: (1) machos C57Bl/6 WT (n=10), (2) machos C57Bl/6 LDLR^{-/-} (n=8), (3) fêmeas C57Bl/6 WT (n=8) e (4) fêmeas LDLR^{-/-} (n=7), totalizando 33 animais. Os procedimentos utilizados no presente estudo seguiram as diretrizes sobre cuidados com animais do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UnB) local, que segue a publicação do NIH “Principles of Laboratory Animal Care”, tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética sob o número SEI n.º 23106.027883/2019-31.

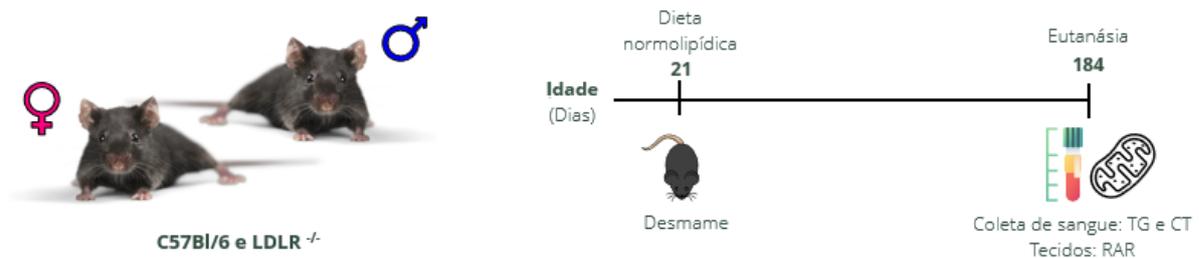


Figura 4. Esquema representativo do protocolo experimental. Camundongos C57Bl/6 e LDLR^{-/-} machos e fêmeas, com 21 dias de idade, foram submetidos à dieta normolipídica por aproximadamente 6 meses. Posteriormente, os animais foram eutanasiados e os tecidos foram coletados, juntamente com a amostra de sangue, para a análise do perfil lipídico. Nos tecidos coletados, o consumo de O₂ foi mensurado por respirometria de alta resolução (RAR).

Tabela 2. Formulação de nutrientes da dieta padrão. Quantidade de nutrientes por quilograma de alimento.

Componente	Kcal	% kcal
Amido de Milho	2118	52,95
Caseína	800	20
Sacarose	400	10
Óleo de Soja	630	15,75
Mix de vitaminas e minerais	40	1
L-cisteína	12	0,3
Banha	0	0
Colina	0	0
Fibras	0	0
TOTAL	4000	100

4.2. Coleta de sangue e tecidos

Para a dissecação de tecidos, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (80:8/mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal (i.p.) até completa analgesia e, posteriormente, foram eutanasiados por decapitação. Após a decapitação, foram coletados aproximadamente 500 μ L de volume de sangue total. Para a preparação do soro, o sangue total foi centrifugado a 3000 x g por 30 minutos, e o soro foi separado. As amostras do hipocampo, BAT, coração e fígado também foram coletados imediatamente após a eutanásia.

4.3. Respirometria de Alta Resolução (RAR)

O consumo de O₂ foi avaliado pela RAR, utilizando o *Oxygraph-2k* (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) a 37°C. O método de Bradford foi utilizado para determinar a concentração total de proteínas nas amostras.

4.3.1. Respirometria do Hipocampo

Ambos hipocampos foram coletados e homogeneizados em 300 μ L de meio de reação (MR: sacarose 125 mM, KCl 65 mM, K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM, EGTA 0,2 mM) usando um homogeneizador tipo Dounce de 5 mL, feito de vidro-teflon. As amostras (~0,200 mg/mL) foram colocadas no respirômetro contendo 2 mL de MR e, em seguida, foram adicionados alguns substratos/drogas para avaliar os estados respiratórios. Foram adicionados piruvato + malato (PM: 5 e 2,5 mM) + succinato (S: 10 mM) para avaliar o sistema de transporte de elétrons (ETS), através de substratos ligados ao complexo 1 e 2, respectivamente. O estado

fosforilante foi avaliado após a adição de ADP (500 μM) e o vazamento de prótons após a adição de oligomicina (OMY: 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A capacidade respiratória máxima foi avaliada após a titulação com cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona (CCCP), concentração final de 1-3 μM).

4.3.2. *Respirometria de BAT*

O BAT foi coletado, pesado, cortado em pedaços de aproximadamente 1 mm^3 e, em seguida, foi adicionado 10x o volume (μL) de MR correspondente ao seu peso para homogeneizar o tecido em um homogeneizador tipo Dounce de 5 mL, feito de vidro-teflon. A amostra ($\sim 0,135 \text{ mg}/\text{mL}$) foi colocada no Oroboros contendo 2 mL de MR e 0,1% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (*Bovine serum albumin fat-free*, BSA- *Fat Free*), em seguida, foram adicionados os substratos PM (5 e 2,5 mM), guanosina difosfato (GDP, 1 mM), para avaliar a atividade da proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein 1*, UCP-1), CCCP para avaliar a capacidade respiratória máxima (concentração final de 3-7 μM) μM .

4.3.3. *Respirometria de fígado e coração*

Os tecidos foram coletados e cortados em pequenos pedaços de aproximadamente 1 mm^3 , em um béquer contendo 10 mL de Meio A (MA: Sacarose 70 mM, Manitol 220 mM, MOPS 5 mM, EGTA 2 mM e BSA livre de ácidos graxos 0,2%). Lavagens sucessivas foram feitas para remover o excesso de sangue. A seguir, os tecidos foram homogeneizados em um homogeneizador tipo Dounce de 30 mL, feito de vidro-teflon e foi adicionado cerca de 10x o volume (μL) de MA de acordo com a quantidade total do tecido correspondente. Todas as etapas de centrifugação foram realizadas a 4°C por 10 minutos. Os homogenatos foram centrifugados a 800 x g, e o sobrenadante obtido da primeira centrifugação foi coletado e reservado. O sedimento foi ressuspensionado em MA e novamente centrifugado a 800 x g. Após esta etapa, o sobrenadante foi coletado, adicionado ao sobrenadante reservado da primeira etapa de centrifugação, e centrifugado a 6000 x g. Em seguida, o sedimento do fígado foi ressuspensionado em 1 mL de Meio B (MB: Sacarose 70 mM, Manitol 220 mM e MOPS 50 mM) e o do coração em 300 μL também de MB. As amostras finais (fígado $\sim 0,300 \text{ mg}/\text{mL}$ e coração $\sim 0,055 \text{ mg}/\text{mL}$) foram colocadas no Oroboros contendo 2 mL de MR. Foram adicionados PM (5 e 2,5 mM) + S (10 mM) para avaliar o ETS. O estado fosforilante foi avaliado após a adição de ADP 500

μM , e o vazamento de prótons após a adição de OMY 0,1 $\mu\text{g/mL}$. A capacidade respiratória máxima foi avaliada após a titulação de CCCP (concentração final de 1 a 5 μM).

4.4. Análise do perfil lipídico

Os níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) foram medidos no plasma por ensaios colorimétricos, através de kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante (LABTEST).

4.5. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (*standard error of the mean*, SEM) e foram analisados com o GraphPad Software Prism (Versão 8.0.2). Os *outliers* foram identificados pelo método de ROUT (Q=1%) e, em seguida, excluídos. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado em todas as amostras. Para variáveis com distribuição paramétrica, os parâmetros da respirometria mitocondrial e a análise do perfil lipídico foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, com genótipo e sexo como variáveis independentes. A ANOVA foi seguida do pós-teste de Tukey, para comparação múltipla. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG)

Os níveis de CT foram significativamente impactados pelo genótipo dos animais [F (1, 28) = 53,47; $p < 0,0001$], mas não houve influência do sexo [F (1, 28) = 0,05312; $p = 0,8194$] e da interação entre sexo e genótipo [F (1, 28) = 1,112; $p = 0,3007$] nos níveis séricos desse lipídio. Os níveis de CT foram significativamente superiores nos animais LDLR^{-/-} de ambos os sexos, quando comparado com o grupo WT (Figura 5A).

Os TG também sofreram efeito significativo do genótipo [F (1, 27) = 29,43; $p < 0,0001$], mas não do sexo [F (1, 27) = 0,7031; $p = 0,4091$] e da interação entre os fatores [F (1, 27) = 0,004448; $p = 0,9473$]. Os níveis de TG foram significativamente superiores nos animais LDLR^{-/-} de ambos os sexos, em relação aos grupos WT (Figura 5B).

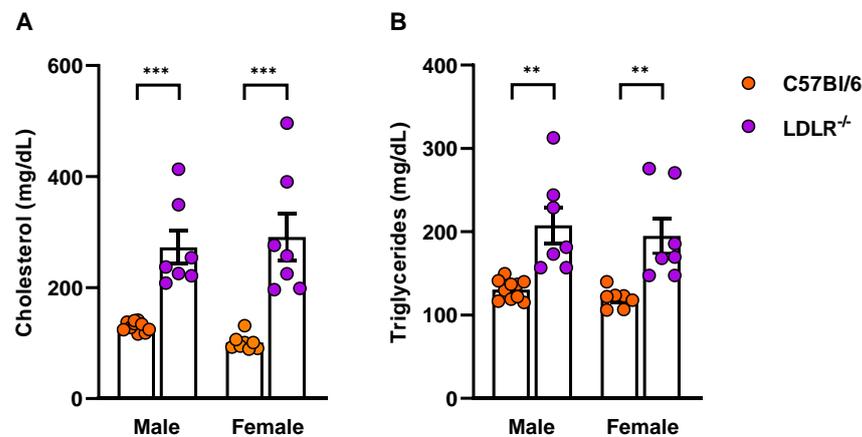


Figura 5. Níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos em camundongos machos e fêmeas C57Bl/6 e LDLR^{-/-}. **A:** CT (mg/dL). **B:** TG (mg/dL). Os valores estão representados como média \pm SEM. n=7-10/ grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, na comparação entre genótipos.

5.2. O dimorfismo sexual e a ausência do LDLR causam efeitos no ETS no hipocampo.

A atividade mitocondrial hipocampal foi caracterizada a partir do homogenato tecidual dessa região, através da RAR, uma técnica *ex vivo* que avalia a atividade da cadeia respiratória em mitocôndrias, tecidos e células. A RAR permite acompanhar, em tempo real, as alterações

no consumo de O₂ das amostras em resposta a diferentes estímulos, sendo um excelente método para avaliar a bioenergética e a função mitocondrial (HUTTER et al., 2006).

O complexo I, ou NADH desidrogenase, é a maior enzima do ETS, sendo o principal ponto de entrada de elétrons para a fosforilação oxidativa (LEIPNITZ et al., 2018). O complexo II é representado pela enzima succinato desidrogenase, caracterizada por ser a única enzima que compõe o ciclo do ácido cítrico e o ETS, sendo essencial ao metabolismo mitocondrial (HUANG; MILLAR, 2013). As figuras 6A e 6B representam o fluxo de O₂ de respirometrias de homogenato de hipocampo com a utilização de PM, para induzir a atividade do complexo I, e S, para o complexo II, respectivamente.

Houve influência significativa da interação entre genótipo e sexo [F (1, 27) = 5,414; $p=0.0277$] na atividade do ETS induzida por substratos do complexo I, entretanto, na análise *post-hoc* o efeito não foi significativo. Os fatores genótipo [F (1, 27) = 1,350; $p=0.2554$] e sexo [F (1, 27) = 1,569; $p=0.2211$] *per se* não induziram alterações na atividade do complexo I em homogenato de hipocampo (Figura 6A). A análise por ANOVA de duas vias indicou efeito do genótipo [F (1, 27) = 6,883; $p=0.0141$], do sexo [F (1, 27) = 5,857; $p=0.0225$] e da interação entre genótipo e sexo [F (1, 27) = 6,560; $p=0.0163$] na atividade do complexo II. A análise *post-hoc* de Tukey indica que os camundongos machos LDLR^{-/-} apresentam uma diminuição significativa na resposta ao estímulo do complexo II em comparação aos camundongos machos WT. Além disso, há efeito do sexo na atividade do ETS, quando comparamos camundongos machos e fêmeas WT (Figura 6B).

Para investigar o a dinâmica da bioenergética mitocondrial, o ADP foi utilizado para avaliar o estado fosforilante OXPHOS, relacionado à síntese de ATP. O CCCP foi utilizado para avaliar a capacidade respiratória máxima, desacoplada da produção de ATP. A análise por ANOVA de duas vias indicou efeito do genótipo [F (1, 27) = 4,830; $p=0.0367$], do sexo [F (1, 27) = 8,483; $p=0.0071$] e da interação entre genótipo e sexo [F (1, 27) = 5,392; $p=0.0280$] no estado fosforilante (Figura 6C). O genótipo [F (1, 27) = 4,903; $p=0.0354$] e o sexo [F (1, 27) = 5,837; $p=0.0227$] também influenciaram a capacidade respiratória máxima, mas não houve interação entre os fatores [F (1, 27) = 2,610; $p=0.1178$].

O consumo de O₂ relacionado à produção de ATP (*ATP-linked*) foi calculado pela equação [Fluxo de oxigênio (OXPHOS – vazamento de prótons)], sendo esse último dado obtido a partir da adição de OMY. Houve influência do sexo [F (1, 26) = 5,518; $p=0.267$], mas não do genótipo [F (1, 26) = 0,8102; $p=0.3763$] e da interação entre os fatores [F (1, 26) =

0,02676; $p= 0.8713$] (Figura 6E) na respiração relacionada à atividade da ATP-sintase (Figura 7E). Para avaliar a capacidade respiratória de reserva (*Spare capacity*), utiliza-se a equação [Fluxo de oxigênio (Capacidade máxima – OXPHOS)]. Não foi observado efeito do genótipo [F (1, 29) = 0,5945; $p= 0.4469$], do sexo [F (1, 29) = 0,01157; $p= 0.9151$] e da interação entre genótipo e sexo [F (1, 29) = 0,1734; $p= 0.6802$] na capacidade respiratória de reserva (Figura 6F).

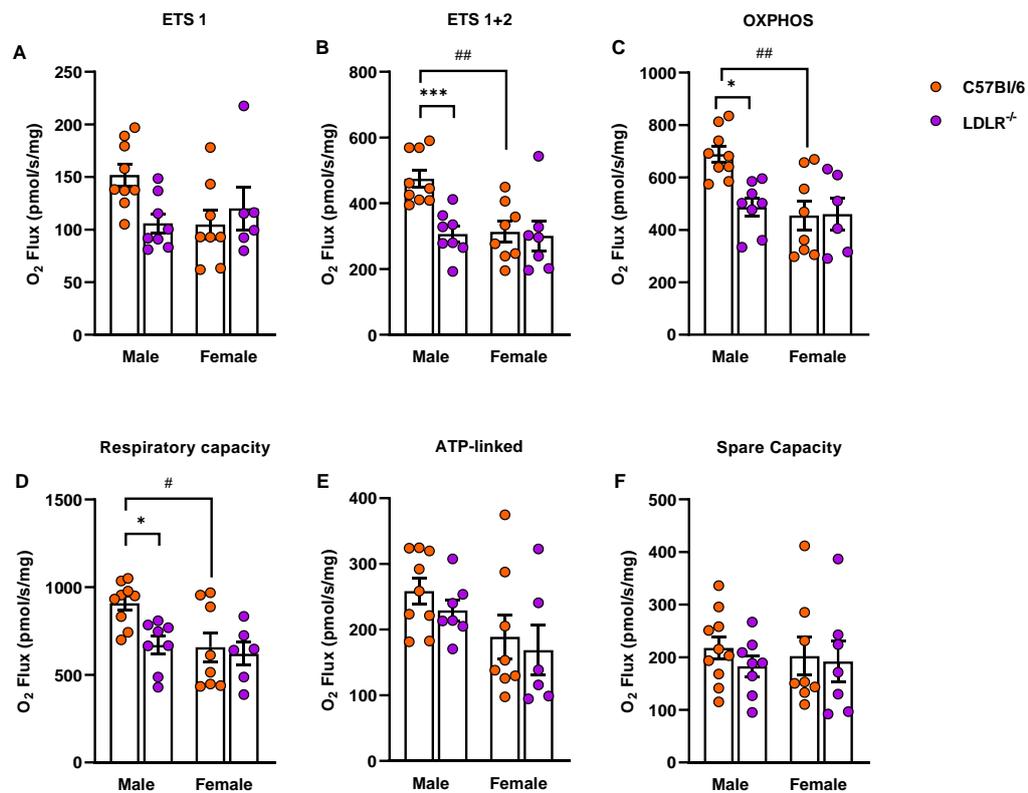


Figura 6. Efeito das variáveis genótipo e sexo em complexos do ETS em homogenato de hipocampo. A RAR foi realizada para avaliar os estados respiratórios mitocondriais (fluxo de O₂ (pmol/s) / mg de proteína): ETS I (PM), ETS I+II (PM+S), OXPHOS (ADP) e capacidade respiratória máxima (U=CCCP). **A:** substratos ligados ao complexo 1. **B:** substratos ligados aos complexos 1 e 2. **C:** OXPHOS. **D:** capacidade respiratória máxima. **E:** Consumo de oxigênio ligado à ATP-sintase. **F:** Capacidade respiratória de reserva. n= 6-9/ grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p<0.05$ e *** $p<0.001$, na comparação entre genótipos; # $p<0.5$, ## $p<0.01$, na comparação entre sexos.

5.3. Há disfunção mitocondrial no BAT de camundongos machos LDLR^{-/-}, mas não de fêmeas

Com o intuito de avaliar os efeitos do genótipo e sexo em outros tecidos relacionados ao metabolismo e gasto energético, avaliamos a fisiologia mitocondrial do homogenato de

BAT. O BAT é um tecido termogênico, relacionado ao gasto de energia e liberação de adipocinas (LEE, J. H. et al., 2019), cuja função principal é a de produzir calor pelas propriedades de desacoplamento da UCP-1, dissipando a força próton motriz e aumentando a taxa de oxidação de substratos.

A figura 7 apresenta os resultados obtidos por meio da respirometria de homogenato de BAT. Na ANOVA, mas não no pós-teste, houve efeito na respiração mitocondrial associada ao complexo I [F (1, 25) = 4,540; $p=0.0431$]. Não houve diferença significativa induzida pelo genótipo [F (1, 25) = 0,7428; $p= 0.3970$] ou pela interação entre genótipo e sexo [F (1, 25) = 0,5054; $p= 0.4837$] (Figura 7A). O GDP, inibidor da UCP-1, foi utilizado para estimar a porcentagem de inibição da UCP-1 e, conseqüentemente, avaliar a capacidade termogênica dos animais. A porcentagem de inibição da UCP-1 foi influenciada pela interação entre genótipo e sexo [F (1, 24) = 7,070; $p= 0.0137$], mas não pelo genótipo [F (1, 24) = 1,211; $p= 0.2821$] ou pelo sexo [F (1, 24) = 0,5667; $p= 0.4589$]. No *post-hoc*, houve efeito do genótipo apenas nos machos ($p<0.05$) (Figura 7B). As fêmeas, por sua vez, não tiveram diferenças significativas na porcentagem de inibição da UCP-1.

Ao avaliar a capacidade respiratória máxima com o uso do desacoplador, demonstrou-se efeito do sexo [F (1, 19) = 6,917; $p=0.0165$], mas não do genótipo [F (1, 19) = 0,01982; $p= 0.8895$] ou da interação entre fatores [F (1, 19) = 1,394; $p= 0.2523$]. As fêmeas C57Bl/6 apresentaram uma diminuição na capacidade máxima em comparação aos machos C57Bl/6 (Figura 7C). Além disso, avaliamos a capacidade respiratória de reserva das mitocôndrias do BAT dos camundongos, e houve efeito da interação entre os fatores [F (1, 25) = 9,531; $p=0.0049$], mas não do sexo [F (1, 25) = 0,04409; $p= 0.8354$] e do genótipo [F (1, 25) = 1,774; $p= 0.1949$]. Os camundongos machos LDLR^{-/-} apresentaram uma diminuição na capacidade respiratória de reserva em comparação aos machos C57Bl/6 ($p<0.05$; Figura 7D).

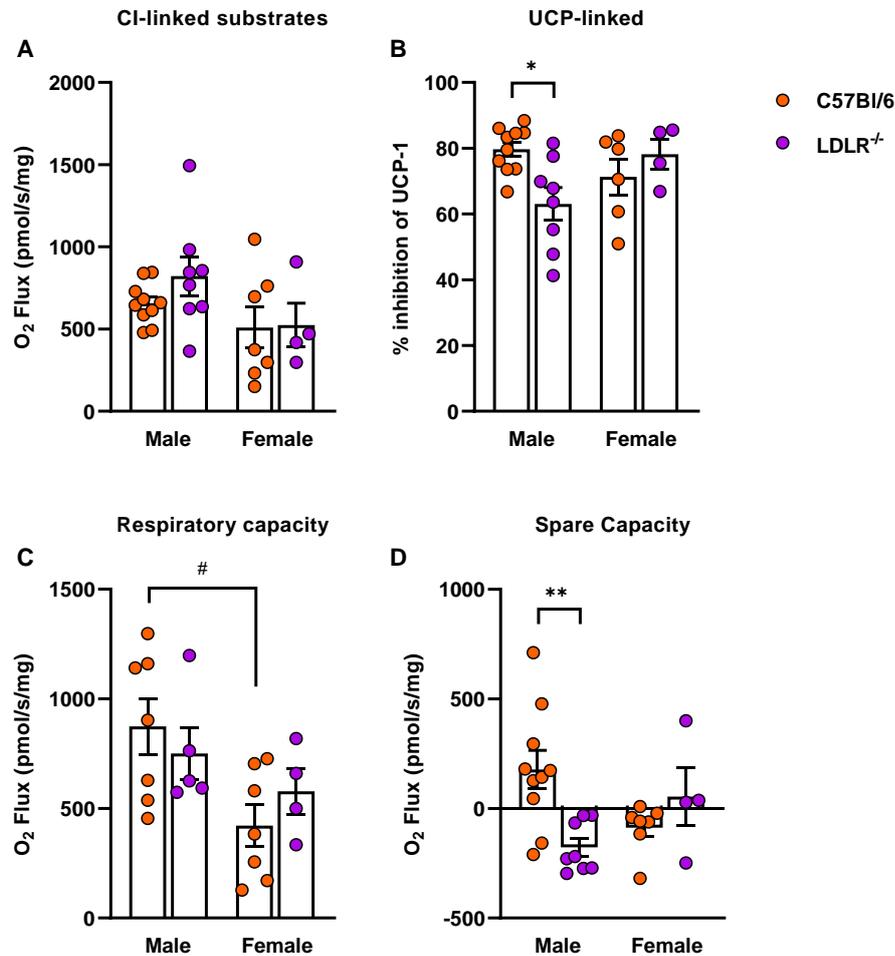


Figura 7. Efeito das variáveis genótipo e sexo em complexos do ETS em homogenato de BAT. A RAR foi realizada para avaliar os estados respiratórios mitocondriais (fluxo de O₂ (pmol/s) / mg de proteína): ETS I (PM), respiração ligada à UCP-1 e capacidade respiratória máxima (U=CCCP). **A:** Substratos ligados ao complexo I. **B:** Porcentagem de inibição da respiração ligada a UCP, com GDP. **C:** Capacidade respiratória máxima. **D:** Capacidade respiratória de reserva. n= 4-9/grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. *p<0.05 e **p<0.01, na comparação entre genótipos; #p<0.05, na comparação entre sexos.

5.4. A bioenergética mitocondrial do fígado é influenciada pelo sexo e genótipo.

O fígado é um órgão essencial na regulação da homeostase energética e no metabolismo de substâncias e macromoléculas, incluindo carboidratos e lipídios (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). Por ter um papel crucial na síntese de colesterol, investigamos os efeitos da deleção genética e do dimorfismo sexual em mitocôndrias hepáticas isoladas.

Na figura 8, mostramos como as mitocôndrias isoladas de fígado de machos e fêmeas, WT e LDLR^{-/-}, se comportam *ex vivo* ao induzir a transferência de elétrons de NADH ou

FADH₂ para os complexos, o bombeamento de prótons para o EIM e a capacidade de produzir ATP. Além disso, expusemos as mitocôndrias a um desacoplador (CCCP), a fim de avaliar a capacidade respiratória máxima.

O consumo de oxigênio associado aos complexos I e II foram avaliados utilizando PM e S, respectivamente. A atividade do complexo I e complexo I+II foi influenciada pelo genótipo [F (1, 28) = 4,471; $p= 0.0435$ e F (1, 28) = 7,863; $p=0.0091$, respectivamente], mas não pelo sexo [F (1, 28) = 0,006281; $p= 0.9374$ e F (1, 27) = 0,8468; $p= 0.3656$, respectivamente] ou pela interação entre os fatores [F (1, 28) = 0,3487; $p= 0.5596$ e F (1, 27) = 0,6546; $p= 0.4256$, respectivamente] (Figura 8A e B).

Para investigar a dinâmica da bioenergética mitocondrial, o ADP foi utilizado para avaliar a OXPHOS, que consiste na respiração relacionada à síntese de ATP, e o CCCP foi usado para avaliar a capacidade respiratória máxima, que indica a capacidade máxima de respiração, desacoplada da produção de ATP. Não houve efeito do genótipo [F (1, 27) = 3,858; $p= 0.0599$], do sexo [F (1, 27) = 0,6410; $p= 0.4303$] e da interação [F (1, 27) = 0,1219; $p= 0.7297$] na OXPHOS (Figura 8C). A capacidade respiratória máxima não foi influenciada pelo genótipo [F (1, 27) = 0,7636; $p= 0.3899$], nem pelo sexo [F (1, 27) = 0,04632; $p= 0.8312$], ou pela interação entre os dois [F (1, 27) = 0,4063; $p=0.5292$] (Figura 8D).

O consumo de O₂ relacionado à produção de ATP (*ATP-Linked*) sofreu efeito do sexo [F (1, 24) = 4,849; $p= 0.0375$], mas não do genótipo [F (1, 24) = 0,3690; $p= 0.5493$] e da interação entre eles [F (1, 24) = 0,1149; $p= 0.7376$] (Figura 8E). Avaliamos a capacidade respiratória de reserva (*Spare capacity*), entretanto, ela não foi influenciada pelo sexo [F (1, 27) = 0,006498; $p=0.9363$], pelo genótipo [F (1, 27) = 0,009616; $p=0.9226$] ou pela interação dos dois [F (1, 27) = 0,001367; $p=0.9708$] (Figura 8F).

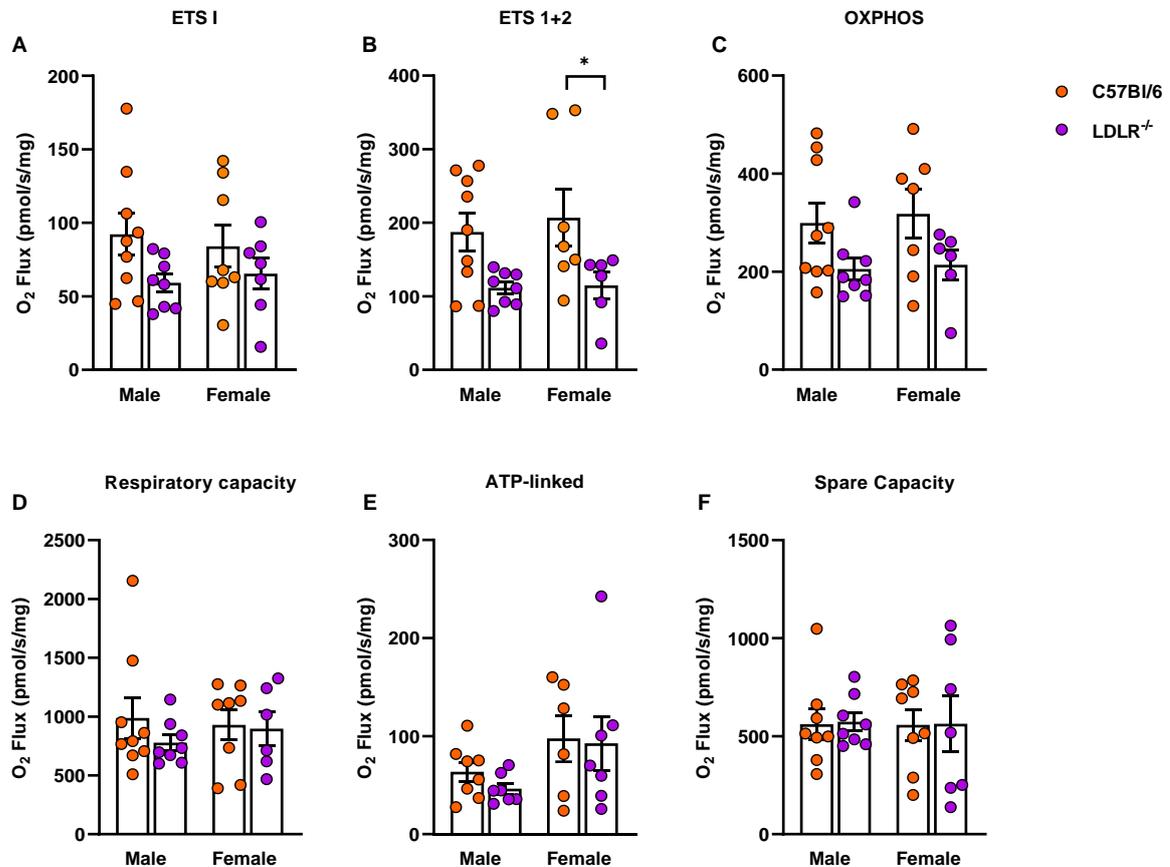


Figura 8. Efeito das variáveis genótipo e sexo em complexos do ETS em mitocôndrias isoladas de fígado. A respirometria de alta resolução foi realizada para avaliar os estados respiratórios mitocondriais (fluxo de O₂ (pmol/s) / mg de proteína): ETS I (PM), ETS I+II (PM+S), OXPHOS (ADP) e capacidade respiratória máxima (U=CCCP). **A:** substratos ligados ao complexo 1. **B:** substratos ligados aos complexos 1 e 2. **C:** OXPHOS. **D:** capacidade respiratória máxima. **E:** Consumo de oxigênio ligado à ATP-sintase. **F:** Capacidade respiratória de reserva. n= 6-9/ grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. *p<0.05, na comparação entre genótipos.

5.5. A atividade mitocondrial do coração não sofreu impacto do dimorfismo sexual e do genótipo.

O coração é um órgão essencial, que fornece nutrientes e O₂ aos tecidos via circulação sanguínea. Indivíduos com HF apresentam maior susceptibilidade para doenças ou danos cardiovasculares, como calcificação na raiz da aorta e DAC (HE et al., 2019; ITO; WATTS, 2015; MYTILINAIYOU et al., 2018). Para avaliarmos se há alterações mitocondriais no coração, submetemos as mitocôndrias cardíacas isoladas à RAR.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação aos substratos do complexo I e I+II referente ao sexo [F (1, 25) = 0,1021; $p= 0.7519$ e F (1, 25) = 0,7602; $p= 0.3916$, respectivamente], genótipo [F (1, 25) = 0,004824; $p= 0.9452$ e F (1, 25) = 1,103; $p= 0.3036$, respectivamente] ou interação [F (1, 25) = 0,02529; $p= 0.8749$ e F (1, 25) = 0,8202; $p= 0.3738$, respectivamente] (Figura 9A e B). Além disso, não houve influência do genótipo [F (1, 25) = 2,119; $p= 0.1579$ e F (1, 25) = 1,167; $p= 0.2903$], do sexo [F (1, 25) = 1,305; $p= 0.2641$ e F (1, 25) = 0,01862; $p= 0.8926$] e da interação entre os fatores [F (1, 25) = 0,01789; $p= 0.8947$ e F (1, 25) = 0,03857; $p= 0.8459$] no OXPHOS e na capacidade respiratória máxima, respectivamente (Figura 9C e D), como também não foram encontrados efeitos do genótipo [F (1, 24) = 0,8982; $p= 0.3527$ e F (1, 25) = 0,04857; $p= 0.8274$], do sexo [F (1, 24) = 2,152; $p= 0.1553$ e F (1, 25) = 0,2607; $p= 0.6141$] e da interação entre fatores [F (1, 24) = 2,582; $p= 0.1211$ e F (1, 25) = 0,6509; $p= 0.4274$] na respiração ligada à atividade da ATP-sintase e na capacidade respiratória de reserva, respectivamente (Figura 9E e F). Os dados indicam que a bioenergética mitocondrial cardíaca de camundongos LDLR^{-/-} não é afetada em ambos os sexos.

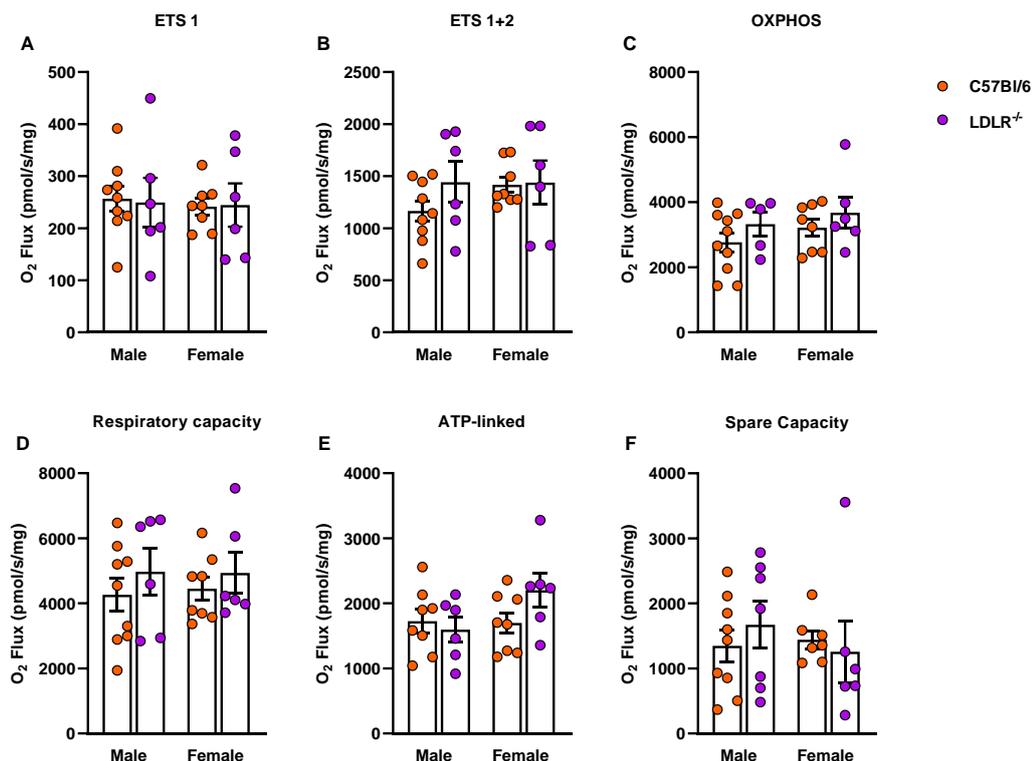


Figura 9. Efeito das variáveis genótipo e sexo em complexos do ETS em mitocôndrias isoladas de coração. A RAR foi realizada para avaliar os estados respiratórios mitocondriais (fluxo de O₂ (pmol/s) / mg de proteína): ETS I (PM), ETS I+II (PM+S), OXPHOS (ADP) e capacidade respiratória máxima (U=CCCP). **A:** substratos ligados ao complexo 1. **B:** substratos ligados aos complexos 1 e 2. **C:** OXPHOS. **D:** capacidade respiratória máxima. **E:** Consumo de oxigênio ligado à ATP-sintase. **F:** Capacidade respiratória de reserva. n= 6-9/ grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p<0.05$. N= 9-6/ grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6. DISCUSSÃO

Em 1985, Michael S. Brown e Joseph L. Goldstein caracterizaram a regulação do colesterol pelo LDLR e evidenciaram que a sua ausência ou disfunção causa a HF (SOKAL et al., 1978). Com a descoberta, foi desenvolvido na década de 90 um modelo murino de HF, utilizando camundongos nocautes para esse receptor (ISHIBASHI et al., 1993). Os camundongos LDLR^{-/-} são amplamente utilizados para avaliar o impacto da HF sobre órgãos suscetíveis a alterações metabólicas causadas pelo aumento do colesterol sanguíneo associado à ausência do LDLR, além dos prejuízos cardiovasculares e danos descritos no SNC (ISHIBASHI et al., 1993, 1994). Conforme esperado, com 6 meses de idade, os camundongos machos e fêmeas LDLR^{-/-}, sem interferência dietética, exibem diminuição na capacidade de depuração sanguínea de colesterol, apresentando um perfil lipídico alterado, com aumento de aproximadamente duas vezes nos níveis de colesterol sanguíneo em comparação com os animais selvagens (Figura 5). Os dados concordam com a caracterização do modelo animal de HF, em que os níveis plasmáticos de colesterol total são significativamente aumentados pela deleção genética do LDLR.

Poucos trabalhos, entretanto, relacionam as diferenças nos níveis de colesterol plasmático ao sexo do animal. Os estudos de Ishibashi e colaboradores mostraram que tanto a alimentação com dieta padrão, quanto com dieta rica em lipídios, fez com que camundongos fêmeas LDLR^{-/-} apresentassem níveis de colesterol relativamente mais altos que machos LDLR^{-/-}, quanto esse lipídeo foi mensurado aos 56 dias ou 6 meses de idade (ISHIBASHI et al., 1993, 1994). Em outros estudos, não houve diferença significativa da média de colesterol de fêmeas e machos com dieta normolipídica aos 6 meses (GHOSH et al., 2020), ou os machos apresentaram níveis de colesterol mais elevados do que as fêmeas aos 4 meses (MARSH et al., 1999). No presente estudo, não encontramos diferenças estatísticas entre a média de colesterol (mg/mL) de camundongos machos e fêmeas LDLR^{-/-}, aos 6 meses, com a dieta padrão.

Por outro lado, diversos autores relatam que os níveis de triglicédeos em camundongos LDLR^{-/-} se mantêm dentro da normalidade, quando comparado com animais selvagens (ISHIBASHI et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, também já foi previamente descrito que há aumento de aproximadamente 80% nos níveis de TG em camundongos machos LDLR^{-/-}, sem interferência da dieta (RUDLING; ANGELIN, 2001), inclusive em animais novos, a partir de 4 semanas de idade (FERREIRA, 2014). No presente estudo, demonstramos um aumento significativo nos níveis de TG dos camundongos fêmeas e machos LDLR^{-/-} aos 6

meses de idade (Figura 5). Níveis elevados de TG são marcadores de lipoproteínas aterogênicas, podendo ser um preditor de DCV, importante comorbidade associada às dislipidemias (TALAYERO; SACKS, 2011).

A HF possui expressiva incidência mundial, mesmo subdiagnosticada, com maior número de casos reportados em mulheres, conferindo um alto risco cardiovascular (HARADA et al., 2018). Contudo, a maior parte dos estudos que envolvem o metabolismo lipídico associado a doenças metabólicas, como a HF, foram por realizados em homens e extrapolados para ambos os sexos, suprimindo as diferenciações sexuais (SANTOSA; JENSEN, 2015; SUGIYAMA; AGELLON, 2012). Os trabalhos que mencionam a HF e analisam a função mitocondrial, em sua maioria, não abrangem as fêmeas como parte do modelo animal LDLR^{-/-}, tornando a literatura tendenciosa aos machos (Tabela 1). Todavia, a busca pela avaliação das diferenças entre gêneros biológicos nas pesquisas pode contribuir para entender a dinâmica metabólica apresentada por ambos os sexos, uma vez que os riscos e desfechos da HF podem diferir entre eles.

O metabolismo energético nas células eucarióticas converge na rede mitocondrial, responsável pela marcante síntese do trifosfato de adenosina (ATP), através da fosforilação oxidativa. Por outro lado, o papel da mitocôndria não se limita à produção de energia, posto que outros processos fisiológicos essenciais compreendem a sua atuação, desde o processo de morte celular por apoptose à sinalização mediada pelos íons de cálcio, regulação do metabolismo e proliferação celular, síntese de hormônios esteroides, β -oxidação de ácidos graxos, termogênese, detoxificação de amônia, biologia redox e respostas inflamatórias (KENNEDY; LEHNINGER, 1949; MITCHELL, 1975; NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; ZALMAN; NIKAIDO; KAGAWAL, 1980). É necessário enfatizar que a distribuição do controle de uma via pode variar de acordo com o tecido, uma vez que há tecidos que são mais controlados pelo ETS, como o músculo e coração, e outros que são mais controlados pela maquinaria da síntese de ATP, como o cérebro e rim (MAZAT et al., 2001). Além disso, há tecidos menos sensíveis aos defeitos em complexos da fosforilação oxidativa, o que torna os impactos causados por alguma disfunção menos evidentes. Portanto, faz-se fundamental avaliar se a HF impacta funções metabólicas em diferentes órgãos e tecidos, considerando as distinções e necessidades fisiológicas.

Na avaliação da atividade mitocondrial hipocampal, verificamos que houve efeito do genótipo, ou seja, da deleção do LDLR, apenas em camundongos machos. Verificamos a diminuição na atividade mitocondrial em vários estados metabólicos, incluindo ETS I+II,

OXPHOS e respiração máxima, além de uma forte tendência à diminuição no ETS I ($p= 0.06$). Entretanto, o efeito do genótipo não foi observado em fêmeas, sugerindo que elas podem ter maior tolerância à disfunção mitocondrial no hipocampo, mesmo apresentando os mesmos níveis de colesterol sanguíneo observados em machos.

A menor capacidade de produção de ATP pelas mitocôndrias está diretamente relacionada à disfunção celular. Em neurônios, o ATP produzido é direcionado para a formação de sinapses, e a quantidade e a força dessas interconexões neuronais definem a plasticidade sináptica, responsável pela função cognitiva (LEJRI et al., 2019). O hipocampo é fundamental para processos relacionados ao aprendizado, memória e modulação de humor (SQUIRE, 1992). Estudos demonstram que a HF pode ter impacto em áreas cerebrais associadas aos processos de aprendizagem e memória, como o hipocampo (ENGEL, 2016) e o córtex pré-frontal (MOREIRA et al., 2012), com ou sem interferência da dieta. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a astrogliose e a morte neuronal apresentadas pelos camundongos LDLR^{-/-} estão associadas ao aumento na permeabilidade da BHE no hipocampo (DE OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, nestes estudos foram observados o aumento da geração de EROs, a desregulação de defesas antioxidantes e o prejuízo na atividade de enzimas dos complexos mitocondriais no cérebro dos camundongos LDLR^{-/-} (DE OLIVEIRA et al., 2011, 2014; MOREIRA et al., 2012).

As alterações metabólicas avaliadas nestes experimentos se correlacionaram com os prejuízos cognitivos e comportamentais manifestados pelos camundongos machos LDLR^{-/-}. O modelo animal apresenta redução na plasticidade sináptica e proliferação celular hipocampal e, conseqüentemente, são percebidos prejuízos na memória espacial e de trabalho, bem como podem exibir comportamento tipo-depressivo (DE OLIVEIRA et al., 2011; MULDER et al., 2007). Acredita-se que a diminuição na captação neuronal de colesterol, requerido para a homeostase celular, devido às mutações no LDLR, pode resultar em conseqüências deletérias estruturais e funcionais no SNC (ENGEL et al., 2019; OLESCOWICZ, 2021). Somando-se a isso, no presente trabalho mostramos que os camundongos machos LDLR^{-/-} possuem mitocôndrias hipocampais menos eficientes, sugerindo que as alterações respiratórias e oxidativas nessa região contribuem para o declínio cognitivo observado em outros estudos.

Os estudos supracitados, no entanto, não consideraram o dimorfismo sexual para avaliar o efeito do sexo sobre a HF. Aqui, nós percebemos que as fêmeas do tipo selvagem apresentaram menor consumo de O₂, avaliado nos diferentes estados metabólicos, em comparação aos machos do tipo selvagem. Entretanto, as fêmeas LDLR^{-/-} não possuem

diferenças na função mitocondrial quando comparadas às fêmeas C57Bl/6, reforçando que a variável sexo não deve ser suprimida. As evidências experimentais observadas em homogenato de hipocampo somam-se às informações disponíveis na literatura sobre camundongos LDLR^{-/-} e alterações no SNC, contribuindo para o melhor entendimento dos efeitos do genótipo e do sexo sobre a HF. De maneira importante, o nosso estudo apresenta pela primeira vez o efeito não apenas do genótipo, mas também do sexo, sobre as disfunções provocadas pela HF.

Além do impacto evidente da HF no SNC, os tecidos periféricos também são afetados pelos altos níveis de colesterol circulantes, que decorrem da disfunção ou deleção do LDLR. Em contraste com o tecido adiposo branco (*white adipose tissue*, WAT), que armazena energia como gotículas lipídicas e triglicerídeos, o BAT controla o gasto de energia por meio da geração de calor através da proteína UCP-1, sendo ativado durante a exposição ao frio ou por estímulo β -3 adrenérgico. (LEE et al., 2019). Essa proteína transmembrana transloca prótons através da membrana mitocondrial interna, contornando a ATP sintase, que ao aumentar a oxidação de substratos e a produção de calor, reduz a produção de EROs. (KLINGENBERG; HUANG, 1999; LIU et al., 2013). Em humanos, o BAT é formado durante o desenvolvimento fetal, sendo maior ao nascimento. Embora seu tamanho diminua com a idade, o BAT está presente e ativo em adultos (COX et al., 2022).

No presente estudo, não observamos efeito do genótipo e do sexo sobre a função mitocondrial do Complexo I no BAT dos camundongos machos e fêmeas. Os camundongos machos LDLR^{-/-} apresentaram menor porcentagem de inibição da UCP-1 por GDP, o que, consequentemente, reflete no menor consumo de oxigênio associado à atividade da UCP-1. Diante o exposto, os camundongos machos C57Bl/6 demonstraram maior eficiência na termogênese via UCP-1 ao apresentarem maior inibição da respiração relacionada à proteína, diferentemente dos camundongos machos LDLR^{-/-}, que apresentaram menor capacidade termogênica. Por outro lado, as fêmeas C57Bl/6 e LDLR^{-/-} exibiram o mesmo padrão na porcentagem de inibição da UCP-1, indicando que não houve influência do genótipo na sua capacidade termogênica. Do ponto de vista bioenergético, o tecido adiposo é altamente plástico e alguns autores sugerem que, em diferentes condições, inclusive a disfunção bioenergética, podem favorecer a conversão fenotípica e funcional do BAT, rico em mitocôndrias, em WAT, tornando-o menos termogênico (PORTER et al., 2016) e aumentando a estocagem de gorduras (BERBEÉ et al., 2015; DONG et al., 2013; LEE et al., 2019). Por meio dos resultados apresentados, é possível que em camundongos machos LDLR^{-/-} esteja ocorrendo o processo de *branqueamento* do BAT e, como consequência, apresentam menor capacidade de gerar calor.

Apesar de não haver diferença na capacidade respiratória máxima entre os camundongos WT e LDLR^{-/-} de ambos os sexos, constatamos que o BAT de machos LDLR^{-/-} possui uma capacidade de reserva respiratória inexistente, ao contrário dos selvagens. Além disso, na comparação entre diferentes sexos, os machos C57Bl/6 apresentaram maior respiração máxima mitocondrial quando comparados às fêmeas também selvagens, indicando interferência do sexo na bioenergética mitocondrial. Por outro lado, em camundongos fêmeas não houve efeito do genótipo sobre os estados respiratórios do BAT.

A capacidade de reserva respiratória mitocondrial é determinada a partir da subtração da respiração basal do consumo máximo de oxigênio obtido na respiração máxima, induzida por agentes de desacoplamento, como o CCCP. Como consequência do desacoplamento, a resposta ao CCCP aumenta o consumo de oxigênio para preservar o gradiente de prótons, necessário para a funcionalidade da mitocôndria (KUNZ, 2003; MARCHETTI, 2020). Além disso, a reserva respiratória se correlaciona com o grau de plasticidade mitocondrial, permitindo adaptabilidade bioenergética em resposta a condições de estresse fisiopatológico (NICHOLLS, 2009). Uma vez que a depleção da capacidade de reserva respiratória tem sido associada a várias doenças cardiovasculares e neurológicas (MARCHETTI, 2020), o resultado observado em camundongos machos LDLR^{-/-} pode estar relacionada à disfunção mitocondrial e maior propensão a essas comorbidades.

Além da termogênese, o BAT está envolvido na regulação do balanço energético e do peso corporal, bem como no controle do metabolismo da glicose e lipídios. Estudos demonstram que, em modelos murinos para aterosclerose que apresentam hiperlipidemia (camundongos APOE*3 ou APOE^{-/-}), a ativação do BAT acelera o gasto energético e diminui os níveis plasmáticos de TG e colesterol (BERBEÉ et al., 2015; COX et al., 2022). A redução de hiperlipidemia e de hipercolesterolemia mediada pelo BAT protege o desenvolvimento de aterosclerose em camundongos APOE*3, entretanto, os efeitos parecem depender de uma via de depuração hepática com LDLR funcional, pois não ocorre a atenuação da hipercolesterolemia em camundongos LDLR^{-/-} (BERBEÉ et al., 2015). Pelo contrário, estudos demonstram que a ativação do BAT em camundongos LDLR^{-/-}, pela exposição ao frio, induz o crescimento e instabilidade de placas ateroscleróticas (DONG et al., 2013). Curiosamente, os trabalhos não exploram a função mitocondrial do BAT em fêmeas LDLR^{-/-} e ao extrapolar os resultados obtidos em machos às fêmeas, as particularidades referentes ao sexo são negligenciadas. Nosso estudo corrobora que essa avaliação é fundamental, uma vez que, apesar de a deleção genética do LDLR ter induzido disfunção mitocondrial em machos, o mesmo não

foi observado em fêmeas. Diferentemente, nos camundongos do sexo feminino, a função das mitocôndrias do BAT de animais LDLR^{-/-} foi conservada, quando comparadas com os animais selvagens.

Dessa maneira, nossos dados permitem estabelecer uma conexão entre a disfunção mitocondrial no BAT e no hipocampo de camundongos machos. No hipocampo, foi possível observar um declínio da atividade do ETS mitocondrial e, no BAT, os camundongos machos LDLR^{-/-} apresentaram uma diminuição na capacidade termogênica, caracterizando uma desregulação metabólica (LEE et al., 2019; PORTER et al., 2016). Essa desregulação metabólica nos tecidos, resultante da disfunção mitocondrial, favorece danos sistêmicos e prejuízos cerebrais causados pela hipercolesterolemia. Foi relatado a proteção de camundongos fêmeas C57Bl/6, com 6 meses, contra a síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura, enquanto os machos desenvolveram hiperinsulinemia, intolerância à glicose e inflamação sistêmica, as fêmeas apresentaram um estado anti-inflamatório no tecido adiposo e não apresentaram alterações metabólicas (PETTERSSON et al., 2012).

Como visto anteriormente, a desregulação metabólica não se limita a um tecido em específico, mas pode causar danos evidentes de forma sistêmica. Nesse sentido, o fígado desempenha um papel significativo no metabolismo e biossíntese de lipídios, assim como na produção e secreção de lipoproteínas. O acúmulo de lipídios nos hepatócitos resulta em esteatose hepática que, conseqüentemente, contribui para inúmeras disfunções hepáticas, como alterações na síntese de ácidos graxos (SAAOUD et al., 2020). Estudos indicam que os camundongos LDLR^{-/-} possuem diversas disfunções hepáticas decorrentes da ausência do LDLR, como uma menor capacidade antioxidante hepática (PAIM et al., 2008), cerca de 30% de redução nos níveis de glutathione reduzida (GSH) por oxidada (GSSH), razão GSH/GSSG, importante via antioxidante, aumento da lipogênese e da secreção lipídica, maior geração de EROs pelas mitocôndrias e maior suscetibilidade à morte celular mediada pela MPT (OLIVEIRA et al., 2005; VERCESI et al., 2007).

Em consonância com os demais estudos, já foi descrito que a deficiência do LDLR está associada a diminuição da concentração de albumina, perfil lipídico compatível com quiescência hepática, disfunção na sinalização de citocinas e, como resultado, prejuízo na regeneração hepática (PAUTA et al., 2013). Ademais, camundongos machos LDLR^{-/-} submetidos a dieta hiperlipídica durante 7 dias, exibem inflamação hepática com elevado número de macrófagos, neutrófilos e células T infiltrados. Após 3 meses de dieta, os danos

evoluem para esteatose e fibrose hepática, aumento nos níveis de CT e TG, e apoptose celular, com lesões ateroscleróticas progressivas (AL RAJABI et al., 2014; BIEGHS et al., 2012).

Em nosso estudo, avaliamos o consumo de O₂ em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos C57Bl/6 e LDLR^{-/-}, machos e fêmeas. Não foi possível observar diferenças significativas no consumo de O₂ vinculado à oxidação de substratos do complexo I e II em machos, entretanto, as fêmeas LDLR^{-/-} apresentaram redução no consumo de O₂ no ETS I+II. A disfunção mitocondrial no complexo II pode refletir condição de estresse oxidativo desencadeado pelo aumento de vazamento de elétrons e geração de EROs. Não foram observadas no presente estudo outras alterações mitocôndrias hepáticas em machos e fêmeas, selvagens e transgênicos. Entretanto, é importante ressaltar que diversas disfunções associadas aos camundongos machos LDLR^{-/-} foram evidentes somente quando os camundongos foram submetidos a um segundo estímulo como, por exemplo, a introdução da dieta hiperlipídica.

Estudos anteriores demonstraram que camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta normolipídica não desenvolvem lesões proeminentes ou apenas lesões leves no fígado (ISHIBASHI et al., 1994). Com a dieta normolipídica, os camundongos não apresentaram esteatose hepática e o decorrente aumento de infiltrados inflamatórios no fígado (BIEGHS et al., 2012), bem como não desenvolveram insuficiência hepática associada ao metabolismo alterado de colesterol, diferentemente dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (AL RAJABI et al., 2014). Os experimentos citados, por refletirem o metabolismo associado aos machos, corroboram os dados observados em nosso estudo. Por outro lado, diferentemente dos machos, demonstramos pela primeira vez que fêmeas possuem alteração na dinâmica mitocondrial, mesmo na ausência de dieta. Observamos que as fêmeas apresentaram prejuízo no consumo de O₂ no ETS I+II, ressaltando, novamente, que os estudos que utilizam apenas machos não podem ser aplicados em sua totalidade às fêmeas, visto que há discrepância na resposta mitocondrial aos substratos de acordo com o sexo e tecido.

A influência do dimorfismo sexual sobre o coração também é fundamentado, em humanos ou modelos animais (BHUPATHY; HAINES; LEINWAND, 2010; MARSH et al., 1999). O estrogênio, hormônio sexual feminino, é responsável por grande proteção contra doenças cardiovasculares, na apoptose de células cardíacas e, inclusive, pode atenuar as lesões ateroscleróticas em fêmeas LDLR^{-/-} quando submetidas à HFD (TANGIRALA; RUBIN; PALINSKI, 1995). Na HF, estima-se que 85% dos homens e 50% das mulheres podem ter um evento coronariano antes de completarem 65 anos. Além disso, cerca de 200.000 pessoas ao ano, no mundo, vão a óbito por ataques cardíacos precoces devido à HF, o que poderia ser

evitado com o tratamento adequado, considerando as particularidades individuais (IZAR et al., 2021). Para avaliarmos os riscos cardiovasculares associados à HF, mitocôndrias isoladas do coração de camundongos LDLR^{-/-} e WT, foram submetidas aos parâmetros respiratórios anteriormente descritos. Em nosso estudo, os camundongos machos e fêmeas LDLR^{-/-} não apresentaram alterações funcionais em mitocôndrias cardíacas.

Anteriormente demonstraram em camundongos machos LDLR^{-/-}, alimentados com HFD ou SD, uma progressão das lesões ateroscleróticas no coração ao longo de um período de 12 meses, o que foi mais precoce e evidente na presença da dieta rica em lipídeos (MA et al., 2012). Em outro estudo, quando os camundongos LDLR^{-/-} com 6 meses de idade foram submetidos à dieta padrão, a função cardíaca mostrou-se preservada (TYRANKIEWICZ et al., 2016) e, em trabalho subsequente, ao avaliarem a função mitocondrial cardíaca dos machos LDLR^{-/-} observaram que aos 3 meses os animais não apresentaram disfunções nos complexos respiratórios, entretanto, aos 6 meses demonstraram diminuição da respiração mitocondrial no complexo I (BRACZKO et al., 2022). Por outro lado, as fêmeas LDLR^{-/-}, aos 6 meses, apresentaram, na aorta, proteção contra a aterosclerose pelo estrogênio, independente do alto nível plasmático de colesterol induzido pela HFD (MARSH et al., 1999)

Por outro lado, a preservação da função mecânica no coração nesses estudos aponta que o modelo animal alimentado com dieta normolipídica pode não apresentar disfunção cardíaca evidente, diferentemente de quando alimentado com HFD, em que apresentam aumento na produção de EROs, distúrbios da permeabilidade da membrana mitocondrial e diminuição da capacidade antioxidante (MA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2005). Os estudos ainda são insuficientes para caracterizar a atividade mitocondrial cardíaca em fêmeas e, além disso, em nosso estudo não observamos disfunções mitocondriais no modelo animal, o que sugere experimentos adicionais para caracterizar o metabolismo energético mitocondrial juntamente com a cronologia das alterações estruturais de estruturas cardíacas.

Diante o exposto, o presente trabalho reitera os impactos negativos da HF sobre a função mitocondrial em diversos tecidos, especialmente ao considerar o dimorfismo sexual como um fator relevante ao desenvolvimento e à progressão da patologia. As alterações na bioenergética celular central e periférica causadas pela deleção do LDLR não são expressas igualmente entre os sexos, desse modo, destaca-se a importância de maior investigação do metabolismo e fisiologia mitocondrial, uma vez que sua função em fêmeas aparenta estar preservada em maior parte dos tecidos, diferente do que é observado em machos.

7. CONCLUSÕES

As análises de função mitocondrial, em machos LDLR^{-/-}, demonstraram:

- I. Disfunção mitocondrial no ETS avaliando os Complexos I+II, na OXPHOS e na Capacidade respiratória máxima do ETS em homogenato de hipocampo.
- II. Prejuízo mitocondrial na atividade da UCP-1 e na Capacidade de reserva respiratória em homogenato de BAT.
- III. Não foram observadas disfunções mitocondriais em mitocôndrias isoladas do fígado e do coração.

As análises de função mitocondrial, em fêmeas LDLR^{-/-}, demonstraram:

- I. Não verificamos mudanças na atividade mitocondrial em homogenatos de hipocampo, coração e de BAT.
- II. Disfunção mitocondrial no ETS avaliando os Complexos I+II em mitocôndrias isoladas de fígado.

As análises de função mitocondrial entre machos e fêmeas C57Bl/6, demonstraram:

- I. As fêmeas apresentaram taxas significativamente menores que às dos machos na função mitocondrial no ETS avaliando os Complexos I+II, no OXPHOS e na Capacidade respiratória máxima do ETS em homogenato de hipocampo.
- II. A capacidade respiratória máxima mitocondrial foi significativamente maior em machos em homogenato de BAT.
- III. Não foram observadas diferenças na função mitocondrial entre os selvagens em mitocôndrias isoladas de fígado e coração.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. J.; TAKAO SUEHIRO JUNIOR, A.; BRAILOWSKY PELLEGRINO, L. Hipercolesterolemia familiar homocigótica e heterocigótica grave: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 31, n. 1, p. 14–22, 1 abr. 2021.

BEHESHTI, S. O. et al. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 75, n. 20, p. 2553–2566, 26 maio 2020.

BENITO-VICENTE, A. et al. Familial hypercholesterolemia: The most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. **International Journal of Molecular Sciences**. 1 nov. 2018.

BHUPATHY, P.; HAINES, C. D.; LEINWAND, L. A. Influence of Sex Hormones and Phytoestrogens on Heart Disease in Men and Women. **Women's Health**. SAGE Publications Ltd, 1 jan. 2010.

BIEGHS, V. et al. Ldl receptor knock-out mice are a physiological model particularly vulnerable to study the onset of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 25 jan. 2012.

BLOOR, I. D.; SYMONDS, M. E. Sexual dimorphism in white and brown adipose tissue with obesity and inflammation. **Hormones and Behavior**. Academic Press Inc., 2014.

BOURNAT, J. C.; BROWN, C. W. Mitochondrial Dysfunction in Obesity. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, 2010; 17(5): 446–452. doi:10.1097/MED.

BRACZKO, A. et al. Cardiac Mitochondria Dysfunction in Dyslipidemic Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11488, 29 set. 2022.

BRAGA, S. P. et al. Switching from high-fat feeding (HFD) to regular diet improves metabolic and behavioral impairments in middle-aged female mice. **Behavioural Brain Research**, v. 398, 1 fev. 2021.

CHANDEL, N. S. et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. **Cell Biology**, v. 95, p. 11715-11720, setembro 1998.

COLE, M. A. et al. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, n. 3, p. 447–457, maio 2011.

COUTINHO, E. R. et al. Familial hypercholesterolemia and cardiovascular disease in older individuals. **Atherosclerosis**, v. 318, p. 32–37, 1 fev. 2021.

DE OLIVEIRA, J. et al. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: Relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99–106, 1 dez. 2011.

DE OLIVEIRA, J. et al. Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 10, p. 2028–2036, 2013.

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

EMINI VESELI, B. et al. Animal models of atherosclerosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 816, p. 3–13, 5 dez. 2017.

ENGEL, D. F. Evidências Experimentais da associação entre a hipercolesterolemia e a depressão: envolvimento da neurogênese hipocampal adulta. **Biblioteca Universitária da UFSC**, 2016.

ENGEL, D. F. et al. Impaired adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of familial hypercholesterolemia: A role for the LDL receptor and cholesterol metabolism in adult neural precursor cells. **Molecular Metabolism**, v. 30, p. 1–15, 1 dez. 2019.

FERREIRA, D. F. Papel do receptor toll-like 4 no metabolismo lipídico hepático. **Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2014.

GHOSH, S. S. et al. Dietary supplementation with galactooligosaccharides attenuates high-fat, high-cholesterol diet-induced glucose intolerance and disruption of colonic mucin layer in C57BL/6 mice and reduces atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Journal of Nutrition**, v. 150, n. 2, p. 285–293, 1 fev. 2020.

GODFREY S. GETZ; CATHERINE A. REARDON. Animal Models of Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2012. DOI: 10.1161/atVBaHa.111.

GOEHRING, N. W. et al. Polarization of PAR proteins by advective triggering of a pattern-forming system. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1137–1141, 25 nov. 2011.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN PATHWAY AND ITS RELATION TO ATHEROSCLEROSIS. **Ann. Rev. Biochem**, 1977. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends in Biochemical Sciences**, set. 2010.

HAMILTON, D. J. et al. Estrogen receptor alpha activation enhances mitochondrial function and systemic metabolism in high-fat-fed ovariectomized mice. **Physiological Reports**, v. 4, n. 17, 1 set. 2016.

HAN, L. et al. Overexpressing STAMP2 improves insulin resistance in diabetic ApoE ^{-/-}LDLR^{-/-} mice via macrophage polarization shift in adipose tissues. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 13 nov. 2013.

HARADA, P. H. et al. Familial hypercholesterolemia prevalence in an admixed racial society: Sex and race matter. The ELSA-Brasil. **Atherosclerosis**, v. 277, p. 273–277, 1 out. 2018.

HARTGERS, M. L.; RAY, K. K.; HOVINGH, G. K. New Approaches in Detection and Treatment of Familial Hypercholesterolemia. **Current Cardiology Reports**. Current Medicine Group LLC 1, 1 dez. 2015.

HE, K. et al. An interspecies study of lipid profiles and atherosclerosis in familial hypercholesterolemia animal models with low-density lipoprotein receptor deficiency. **American journal of translational research**, v. 11, p. 3116–3127, maio 2019.

HOLVEN, K. B. et al. Sex differences in cholesterol levels from birth to 19 years of age may lead to increased cholesterol burden in females with FH. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 12, n. 3, p. 748- 755.e2, 1 maio 2018.

HUFF MURRAY W.; ASSINI JULIA M.; HEGELE ROBERT A. Gene therapy for hypercholesterolemia: sweet dreams and flying machines. **European Heart Journal**. Oxford University Press, 21 ago. 2014.

HULTHE, J.; FAGERBERG, B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR study). **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 7, p. 1162–1167, 2002.

ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice and its Reversal by Adenovirus-mediated Gene Delivery. **J. Clini. Invest**, v. 92, 1993.

ISHIBASHI, S. et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 5, p. 1885–1893, 1994.

ITO, M. K.; WATTS, G. F. Challenges in the Diagnosis and Treatment of Homozygous Familial Hypercholesterolemia. **Drugs**, v. 75, n. 15, p. 1715–1724, 1 out. 2015.

IYEN, B. et al. Sex differences in cardiovascular morbidity associated with familial hypercholesterolaemia: A retrospective cohort study of the UK Simon Broome register linked to national hospital records. **Atherosclerosis**, v. 315, p. 131–137, 1 dez. 2020.

IZAR, M. C. DE O. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar – 2021. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 117, n. 4, p. 782–844, 1 out. 2021.

JACKSON, C. L.; BOND, A. R. The fat-fed apolipoprotein e knockout mouse brachiocephalic artery in the study of atherosclerotic plaque rupture. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011.

JASTROCH, M. et al. Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays in Biochemistry**, v. 47, p. 53–67, 2010.

JEON, H.; BLACKLOW, S. C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein recept. **Annual Review of Biochemistry**, 2005.

KENNEDY, E. P.; LEHNINGER, A. L. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, v. 179, n. 2, p. 957–972, 1 jun. 1949.

LEAVER, C. J.; HACK, E.; FORDE, B. G. Protein Synthesis by Isolated Plant Mitochondria. **Methods in enzymology**, v. 97. Academic Press, 1983.

LECRENIER, N. et al. Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of polymerases. **Gene**, v. 185, p. 147-152, 1997.

LEE, J. H. et al. The role of adipose tissue mitochondria: Regulation of mitochondrial function for the treatment of metabolic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 1 out. 2019.

- LEIGH, S. et al. The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: Pathogenicity update. **Journal of Medical Genetics**, v. 54, n. 4, p. 217–223, 1 abr. 2017.
- LIU, G. et al. Genetically-engineered hamster models: applications and perspective in dyslipidemia and atherosclerosis-related cardiovascular disease. **Medical Review**, v. 1, n. 1, p. 92–110, 26 out. 2021.
- LOGAN, D. C. The mitochondrial compartment. **Journal of Experimental Botany**, 2006.
- LORBEEK, G. et al. Sex differences in the hepatic cholesterol sensing mechanisms in mice. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11067–11085, set. 2013.
- MA, Y. et al. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in Ldlr-deficient mice on a long-term high-fat diet. **PloS one**, v. 7, n. 4, 2012.
- MADAMANCHI, N. R.; RUNGE, M. S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation Research**, mar. 2007.
- MARSH, M. M. et al. Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 893–900, 1999.
- MAZAT, J.-P. et al. What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions... that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1504, p. 20-30, 2001
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-smotic type of mechanism. **Nature**, 1961.
- MITCHELL, P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. **Hypothesis**, 1975.
- MITTENDORFER, B. Sexual Dimorphism in Human Lipid Metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 4, p. 681–686, 1 abr. 2005.
- MOREIRA, E. L. G. et al. Age-Related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): Evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 32, n. 2, p. 495–511, 2012.

MULDER, M. et al. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. **Neuroscience Research**, v. 59, n. 3, p. 251–256, nov. 2007.

MYTILINAIYOU, M. et al. Familial hypercholesterolemia: New horizons for diagnosis and effective management. **Frontiers in Pharmacology**. Frontiers Media S.A., 12 jul. 2018.

NAKAE, T. Identification of the outer membrane protein of E. coli that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes*. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 71, n. 3, 1976

NORDESTGAARD, B. G. et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. **European Heart Journal**, v. 34, n. 45, 1 dez. 2013.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: In sickness and in health. **Cell**. Elsevier B.V., 16 mar. 2012.

OLESCOWICZ, G. O impacto da hipercolesterolemia sobre os processos de memória e plasticidade sináptica em camundongos machos e fêmeas: do receptor LDL aos oxisteróis. **Biblioteca Universitária da UFSC**, 2021.

OLIVEIRA, C. F. H. et al. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 2, p. 1–14, fev. 2005.

OLIVEIRA, H. C. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial bioenergetics and redox dysfunctions in hypercholesterolemia and atherosclerosis. **Molecular Aspects of Medicine**. Elsevier Ltd, 1 fev. 2020.

PAIM, B. A. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 3, p. 444–451, 1 fev. 2008.

PAJAK, A. et al. Prevalence of familial hypercholesterolemia: A meta-analysis of six large, observational, population-based studies in Poland. **Archives of Medical Science**. Termedia Publishing House Ltd., 1 ago. 2016.

PANG, J. et al. Heterozygous familial hypercholesterolaemia in specialist centres in South Africa, Australia and Brazil: Importance of early detection and lifestyle advice. **Atherosclerosis**, v. 277, p. 470–476, 1 out. 2018.

PATEL, R. S.; SCOPELLITI, E. M.; SAVELLONI, J. Therapeutic management of familial hypercholesterolemia: Current and emerging drug therapies. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 12, p. 1189–1203, 1 dez. 2015.

PAUKNER, K.; LESNÁ, I. K.; POLEDNE, R. Cholesterol in the Cell Membrane—An Emerging Player in Atherogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 1 jan. 2022.

PAUTA, M. et al. Impaired liver regeneration in Ldlr mice is associated with an altered hepatic profile of cytokines, growth factors, and lipids. **EASL**, 2013.

PETTERSSON, U. S. et al. Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 25 set. 2012.

PORTER, C. et al. Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 2, p. 246–255, 9 ago. 2016.

RAAL, F. J.; SANTOS, R. D. Homozygous familial hypercholesterolemia: Current perspectives on diagnosis and treatment. **Atherosclerosis**, ago. 2012.

RONCHI, J. A. et al. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 446–456, 2013.

SANTOSA, S.; JENSEN, M. D. The sexual dimorphism of lipid kinetics in humans. **Frontiers in Endocrinology**. Frontiers Research Foundation, 2015.

SIMON, M. M. et al. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. **Genome Biology**, v. 14, n. 7, 2013.

SOKAL, R. R. et al. A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. **Science**, v. 232, 1978.

STOCK, DANIELA; LESLIE, A. G. W.; WALKER, J. E. **Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase**. **Plant Cell**, v. 286, 1999.

SUGIYAMA, M. G.; AGELLON, L. B. Sex differences in lipid metabolism and metabolic disease risk. **Biochemistry and Cell Biology**, abr. 2012.

TANGIRALA, R. K.; RUBIN, E. M.; PALINSKI, W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: Correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Lipid Research**, v. 36, n. 11, p. 2320–2328, 1995.

TIRANTI, V. et al. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. **Human Molecular Genetics**. Oxford University Press, 1997.

TOYE, A. A. et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. **Diabetologia**, v. 48, n. 4, p. 675–686, abr. 2005.

TYRANKIEWICZ, U. et al. Comprehensive MRI for the detection of subtle alterations in diastolic cardiac function in apoE/LDLR^{-/-} mice with advanced atherosclerosis. **NMR in Biomedicine**, v. 29, n. 6, p. 833–840, 1 jun. 2016.

UNSELD, M. et al. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. **Nature Genetics**, v. 15, 1997.

VAMECQ, J. et al. Mitochondrial Dysfunction and Lipid Homeostasis. **Current Drug Metabolism**, 2012.

VASCONCELOS, E. M. A. et al. Reactive oxygen species generation in peripheral blood monocytes and oxidized LDL are increased in hyperlipidemic patients. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1222–1227, ago. 2009.

VERCESI, A. E. et al. Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. **IUBMB Life**, 2007.

VIANA GONÇALVES, I. C. et al. Tempol improves lipid profile and prevents left ventricular hypertrophy in LDL receptor gene knockout (LDLr^{-/-}) mice on a high-fat diet. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 36, n. 9, p. 629–638, 1 set. 2017.

VICTOR, V. M. et al. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis: Mitochondria-Targeted Antioxidants as Potential Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, 2009.

WANG, L.; AHN, Y. J.; ASMIS, R. Sexual dimorphism in glutathione metabolism and glutathione-dependent responses. **Redox Biology**. Elsevier B.V., 1 abr. 2020.

WATTS, G. F.; PANG, J.; SANTOS, R. D. Europe aspires to set the record straight on familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**. Elsevier Ireland Ltd, 2015.

YANG, H. XIAN et al. Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation. **Clinica Chimica Acta**. Elsevier B.V., 1 jan. 2020.

YU, X. H. et al. Cholesterol transport system: An integrated cholesterol transport model involved in atherosclerosis. **Progress in Lipid Research**. Elsevier Ltd, 1 jan. 2019.

ZALMAN, L. S.; NIKAIDO, H.; KAGAWAL, Y. Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. **The journal of biological chemistry**, v. 255, n. 5, 1980.

ZETTERSTRÖM ROLF. The 1964 Nobel Prize for the discovery of the biosynthesis of cholesterol. **Acta Paediatr.**, jul. 2009.

ZHENG, Z. G. et al. Discovery of a potent SCAP degrader that ameliorates HFD-induced obesity, hyperlipidemia and insulin resistance via an autophagy-independent lysosomal pathway. **Autophagy**, v. 17, n. 7, p. 1592–1613, 2021.