

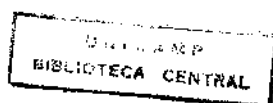
JAIRO AUGUSTO BERTI



UNICAMP

**EFEITOS DOS HORMÔNIOS DA TIREÓIDE SOBRE O
METABOLISMO DA HDL EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS
QUE EXPRESSAM A PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE
COLESTERIL ÉSTER (CETP) HUMANA**

**IB/UNICAMP
1999**



6675066

JAIRO AUGUSTO BERTI



**EFEITOS DOS HORMÔNIOS DA TIREÓIDE SOBRE O
METABOLISMO DA HDL EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS
QUE EXPRESSAM A PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE
COLESTERIL ÉSTER (CETP) HUMANA**

Este trabalho corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Jairo Augusto Berti
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Helena Coutinho Franco de Oliveira
16/03/99

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas, na área
de Fisiologia.

ORIENTADORA:
Prof. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

IB/UNICAMP
1999

UNIDADE	13 C
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	37495
PROC.	229199
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/04/99
N.º CPD	

CM-00122991-3

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Berti, Jairo Augusto

B461e

Efeitos dos hormônios da tireóide sobre o metabolismo da HDL em camundongos transgênicos que expressam a proteína de transferência de colesterol Éster (CETP) humana/
Jairo Augusto Berti. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.
78f.:ilus.

Orientadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Tireóide-hormônios. 2. Lipoproteína. 3. Metabolismo. I. Oliveira, Helena Coutinho Franco de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES:

1. Prof. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira (orientadora) *Helena Coutinho Franco de Oliveira*
 2. Prof. Dra. Edna Regina Nakandakare *Edna Regina Nakandakare*
 3. Prof. Dra. Eliana Cotta de Faria *Eliana Cotta de Faria*
-

MEMBRO SUPLENTE:

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

DATA 16/ 03 / 1999

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Helena C.F. Oliveira, docente do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela orientação, paciência e por acreditar em meu trabalho e minha motivação para concluir essa dissertação.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, professor titular do Departamento de Fisiologia e Biofísica chefe do Laboratório de Pâncreas Endócrino, por ceder gentilmente materiais e as instalações de seu laboratório para o desenvolvimento desse trabalho e principalmente pelo exemplo de seriedade científica.
- Às professoras Dra. Eliana Cotta de Faria e Dra. Lúcia Nassi Castilho do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela realização de dosagens bioquímicas no plasma dos animais, e aos técnicos e funcionários desse departamento que sempre colaboraram com muita boa vontade.
- À Dra. Lila Mina Harada e Patrícia M. Cazita , pelo fornecimento da HDL marcada radioativamente.
- Aos amigos José Roberto Bosqueiro e Dr. Everardo M. Carneiro pelos constantes ensinamentos de técnicas de laboratório, cálculos, utilização de equipamentos e principalmente pela amizade e companheirismo.
- Ao amigo mestrando Juliano de Souza Gracioso, pelo companheirismo.
- Ao amigo Luiz Fabrizzio Stoppiglia, pelo auxílio na utilização dos programas de computador para cálculos estatísticos.
- À mestranda Maria Esméria do Amaral, pelo auxílio técnico nos estudos cinéticos da remoção plasmática da HDL.

- À bióloga e administradora do Laboratório de Pâncreas Endócrino, Viviane Delghingaro Augusto pela organização e colaboração nos orçamentos, compras de materiais e execução de alguns experimentos.
- Aos técnicos Léscio Domingos Teixeira e Haracaúna Pereira pela ajuda e cuidados constante com animais experimentais.
- À estagiária Daniela C. Vidoti pelo auxílio em alguns experimentos.
- Aos amigos do Laboratório Pâncreas Endócrino, pela constante ajuda nos momentos difíceis e pelo companheirismo.
- A todos os companheiros de trabalho e do curso de pós-graduação não citados, mas que com certeza em algum momento, contribuíram direta ou indiretamente com informações, técnicas e a própria amizade.
- Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica: Ivo, Alexandra, Sonia e Francisco pela amizade e colaboração em assuntos burocráticos e em especial a Dona "Zefa" e Dona Cida que com seu sorriso, simplicidade e simpatia enchem de alegria o departamento.
- À coordenadora da Sub-Comissão do Curso de Pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Profa. Dra. Alba Regina Monteiro de Souza Brito, pela dedicação e busca constante da melhoria da qualidade desse curso.
- A todos os docentes do Departamento de Fisiologia e Biofísica na pessoa do Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves.
- Ao CNPq, FAPESP, PRONEX/FINEP e FAEP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	ii
INTRODUÇÃO.....	01
Transporte exógeno de colesterol.....	03
Transporte endógeno de colesterol.....	04
Transporte reverso de colesterol.....	06
Proteína de transferência de colesterol éster.....	08
Modelo de camundongos transgênicos.....	10
Hormônios da tireóide e metabolismo das lipoproteínas.....	11
Regulação hormonal da CETP.....	16
OBJETIVOS.....	18
MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
Animais.....	19
Isolamento e marcação da HDL com colesterol radioativo.....	19
Estudo cinético da HDL marcada com colesterol éster radioativo.....	20
Estudo da captação tecidual de colesterol éster de HDL.....	21
Dosagens bioquímicas do plasma.....	22
Fracionamento de lipoproteínas por FPLC.....	22
Atividade da CETP no plasma.....	23
Atividade da lipase hepática no plasma.....	23
RESULTADOS.....	25
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÕES.....	36
ABSTRACT.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
FIGURAS.....	53
TABELAS.....	58
APÊNDICES.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	- alanina-aminotransferase
apoLP	- apolipoproteína
AST	- aspartato-aminotransferase
CE	- colesterol éster
CEt	- colesterol éter
CETP	- proteína de transferência de colesterol éster, "cholesteryl ester transfer protein"
CL	- colesterol livre (não esterificado)
d	- densidade
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
FALC	- fosfatase alcalina
FPLC	- cromatografia líquida de alta resolução, "fast protein liquid chromatography"
HDL	- lipoproteína de alta densidade, "high density lipoprotein"
HMGCoA red	- 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
IDL	- lipoproteína de densidade intermediária, "intermediate density lipoprotein"
Kb	- Kilobases
LCAT	- lecitina: colesterol aciltransferase, "lecitin: cholesterol-acyltransferase"
LDL	- lipoproteína de baixa densidade, "low density lipoprotein"
LPL	- lipoproteína lipase, "lipoprotein lipase"
LH	- lipoproteína lipase hepática
LP	- lipoproteínas
LSR	- receptor estimulado pela lipólise, "lipolysis stimulated receptor"
PL	- fosfolípidos
PTU	- propiltiouracil
QM	- quilomicrons
TG	- triglicerídeos
T3	- triiodotironina
T4	- tiroxina
TRE	- elementos responsivos aos hormônios da tireóide, "thyroid responsive elements"
VLDL	- LP de densidade muito baixa, "very low density lipoprotein"

RESUMO

Disfunções da tireóide resultam em múltiplas alterações do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas. A proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e a lipase hepática (LH) são importantes determinantes da concentração plasmática das HDL, as quais são inversamente correlacionadas ao risco de doença aterosclerótica. Neste trabalho investigamos os efeitos dos hormônios da tireóide sobre o metabolismo das HDL e sobre as atividades da CETP e LH em camundongos transgênicos com hipo e hipertireoidismo experimental. O perfil das lipoproteínas plasmáticas obtido por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) revelou aumento significativo da fração de VLDL e diminuição da fração da HDL nos animais hipertireoideos. Os animais hipotireoideos apresentaram aumento da fração de LDL. Estudo cinético da remoção plasmática da HDL mostrou que a taxa fracional catabólica da HDL é aproximadamente 2 vezes maior nos camundongos hipertireoideos ($p < 0,001$) mas não está alterada nos animais hipotireoideos. A atividade da CETP foi determinada por ensaio isotópico e expressa como porcentagem de transferência de colesterol éster de HDL para LDL. Verificamos que os animais com hipertireoidismo tem a atividade da CETP 1,9 vezes maior que seus controles, enquanto que essa não variou significativamente nos animais hipotireoideos. Em animais hipertireoideos também avaliou-se a atividade da lipase hepática (LH). Houve uma pequena, porém significativa ($p = 0,05$) redução da LH nestes animais. O estudo da captação tecidual do colesterol éster da HDL mostrou que, entre os 11 tecidos avaliados, houve uma maior captação de colesterol éster de HDL pelo músculo esquelético dos animais hipertireoideos ($p < 0,02$) e menor captação pelo intestino delgado e baço ($p < 0,05$). Nos animais hipotireoideos a captação de colesterol éster de HDL foi significativamente menor no intestino delgado ($p < 0,04$).

Concluindo, a diminuição dos níveis plasmáticos de HDL encontrada nos animais com hipertireoidismo pode ser explicada pela maior velocidade de remoção plasmática das HDL, maior captação muscular da HDL e maior atividade da CETP. O metabolismo das HDL e a atividade da CETP não foram alterados significativamente no hipotireoidismo experimental.

INTRODUÇÃO

Segundo a posição da *American Heart Association* (1997) *apud* KRIEGER (1998), os distúrbios cardiovasculares são as principais causas de morte nos países desenvolvidos, sendo a aterosclerose a principal responsável por esse mal. Sabe-se há cerca de 50 anos que altas taxas de colesterol no plasma e alterações do metabolismo das lipoproteínas estão envolvidas no aumento da incidência da aterosclerose (DOYLE *et al.*, 1959; KANNEL, *et al.*, 1961). Fatores como dieta rica em colesterol e gordura, sedentarismo, hipertensão, fumo e fatores genéticos alteram o metabolismo das lipoproteínas, os quais contribuem para o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, comprometendo o sistema cardiovascular (BEISIEGEL, 1998).

As lipoproteínas plasmáticas (LP) são partículas micelares, compostas por lípidos e proteínas. Seu interior é constituído de moléculas com características apolares (triglicerídeos e colesterol esterificado) e sua superfície é constituída por uma monocamada de lípidos com um certo grau de polaridade (colesterol livre e fosfolípidos) e proteínas (GARCIA & OLIVEIRA, 1992).

As proteínas componentes das LP são denominadas apolipoproteínas (apoLP). Elas variam em estrutura e função e são designadas por letras: A (apo-AI; apo-AII; apo-AIV), B (apo-B48 e apo-B100), C (apo-CI; apo-CII e apo-CIII), apo-D e apo-E. Além de tornarem os lípidos solúveis no meio aquoso, as apoLP são importantes reguladoras do metabolismo das lipoproteínas. Atuam como co-fatores de enzimas-chave e mediam a interação das lipoproteínas com receptores responsáveis pela remoção das partículas do plasma (QUINTÃO *et al.* 1989,

BEISIEGEL, *et al.* 1998).

A função das lipoproteínas é basicamente transportar substâncias lipossolúveis no compartimento plasmático provenientes da dieta ou sintetizadas pelo próprio organismo. Assim, podem por exemplo, suprir os tecidos com ácidos graxos e promover a redistribuição tecidual de colesterol (BEISIEGEL, 1998).

As diferentes LP encontradas no plasma possuem diferentes proporções e tipos de apoLP e lípidos. Tais diferenças resultam em diversidade de tamanho, carga elétrica e densidade permitindo uma classificação por critérios eletroforéticos e de ultracentrifugação. Desse modo, foram identificadas 5 classes principais de LP e várias sub-frações de acordo com suas densidades (HAVEL, *et al.*, 1955; GOTTO, *et al.*, 1986). São elas, em ordem crescente de densidade: quilomicrons (QM) com densidade (d) < 0,95g/mL; VLDL - ("very low density lipoprotein" = lipoproteína de densidade muito baixa) com $d < 1,006$; IDL - ("intermediate density lipoprotein" = lipoproteína de densidade intermediária) com $1,006 < d < 1,019$ g/mL; LDL ("low density lipoprotein" = lipoproteína de baixa densidade) com $1,019 < d < 1,063$ g/mL e HDL ("high density lipoprotein" = lipoproteína de alta densidade) com $1,063 < d < 1,210$. Os QM são de origem intestinal enquanto todas as outras são de origem endógena. Os QM, VLDL e IDL são chamados também de LP ricas em triglicerídeos (TG).

Do ponto de vista quantitativo, o colesterol e os triglicerídeos são os lípidos mais importantes transportados nas LP. Esses são também componentes implicados no complexo processo de desenvolvimento da aterosclerose. A seguir descreveremos sucintamente o transporte de colesterol nas lipoproteínas, classificando-o de acordo com sua origem e destino metabólico.

Transporte exógeno de colesterol

O transporte exógeno de colesterol inicia-se com a absorção dos lípides provenientes da dieta nos enterócitos. Os ácidos graxos re-esterificados à triglicerídeos (TG) juntamente com o colesterol livre (CL), colesterol esterificado (CE) e fosfolípidos (PL) são associados à apolipoproteína B48 (apoB48) recém sintetizada formando os quilomicrons (QM). Estes são liberados por exocitose para linfa mesentérica. Quando na circulação sistêmica, os TG contidos nos QM sofrem hidrólise pela ação da lipoproteína-lipase (LPL), enzima que encontra-se ancorada na membrana basal das células endoteliais dos vasos sanguíneos dos vários órgãos (BISGAIER, *et al.*, 1983). Nesse processo, além de perder TG, os QM perdem também CL, PL e apoC para as HDL circulante e ganham apoE, resultando em uma partícula denominada remanescente de quilomicron (QM-rem), rica em CE e apoE, pobre em TG e contendo a apoB48 original.

Em uma segunda etapa, as apoE dos QM-rem são reconhecidas por receptores hepáticos com alta afinidade, os quais promovem uma rápida captação destes pelos hepatócitos (TALL, *et al.*, 1979; HAVEL, *et al.* 1986). Esses receptores existem em outros órgãos mas a maior parte dos QM-rem é captado pelo fígado. A apoE possui regiões ricas em aminoácidos básicos que constituem o domínio de reconhecimento pelo receptor de alta afinidade localizado na membrana celular (MAHLEY, *et al.* 1988) e denominado receptor de remanescentes de QM ou receptor E ou ainda LRP (*LDL receptor-related protein*) (HERZ, *et al.* 1988). Esse sistema é de alta eficiência resultando em uma meia-vida da partícula na circulação de aproximadamente 10 minutos (REDGRAVE *et al.*, 1983, COOPER *et al.*, 1997).

Transporte endógeno de colesterol

O transporte endógeno de colesterol inicia-se com a secreção hepática de VLDL, a qual contém apoB100 como principal apoLP estrutural. As VLDL passam pelas mesmas etapas iniciais do catabolismo vascular dos QM, porém com menor velocidade. Durante a ação da LPL sobre os TG das VLDL, essas também perdem PL, CL e apoLP para as HDL, diminuindo de tamanho e gerando os remanescentes de VLDL ou IDL, os quais praticamente só contém apoB-100 e apo-E como componentes protéicos. Grande parte das IDL (~75%) é rapidamente captada via receptores hepáticos específicos (LRP e receptores de LDL) e o restante continua circulando, perdendo mais TG e PL e praticamente toda apoE, transformando-se então em LDL (BROWN & GOLDSTEIN, 1981, 1986; FIELDING & FIELDING, 1991).

As LDL contêm basicamente apoB100 e colesterol esterificado. Seu “turnover” é mais lento (cerca de 2 dias) e assim como as IDL, também são removidas da circulação por receptores hepáticos que reconhecem sítios idênticos na cadeia da apoE e da apoB100. Esses receptores foram inicialmente chamados de receptores B-E ou receptores de LDL (BROWN & GOLSDSTEIN, 1986).

A síntese dos receptores de LDL é controlada pela concentração intracelular de colesterol livre. Quando essa concentração se eleva, uma das principais respostas regulatórias da célula é a inibição da síntese desses receptores (GOLDSTEIN & BROWN, 1990; BROW & GOLDSTEIN, 1997). Essa resposta protege a célula do efeito lesivo do excesso de colesterol. Acima de uma determinada concentração crítica de colesterol intracelular este pode precipitar-se sob a forma de cristais e lisar a célula (SMALL & SHIPLEY, 1974; BEISIEGEL, *et*

al.,1998). Conforme a síntese de receptores de LDL diminui com o aumento do colesterol intracelular, ocorre elevação da concentração de LDL circulante. Isso pode fazer com que ocorra uma maior infiltração dessa lipoproteína para o espaço sub-endotelial, onde elas podem sofrer modificações, principalmente oxidativas. Macrófagos residentes reconhecem as LDL modificadas através de seus receptores "scavenger", os quais não são regulados pelo conteúdo intracelular de colesterol. Assim, a captação das lipoproteínas modificadas pelos macrófagos é contínua em função da sua concentração no espaço subendotelial, o que causará uma transformação dos macrófagos em "foam cells" - células espumosas, precursoras da placa do ateroma (STEINBERG, *et al.*, 1989, MARCUS, *et al.*, 1993).

Recentemente foram identificados vários novos receptores estruturalmente relacionados aos receptores da LDL são eles: megalina/gp330, LR-11, LR-7/8, apoEr₂ (SHNEIDER, *et al.*, 1997) e receptor de VLDL (NIEMEIER, *et al.*, 1996). *In vitro*, todos reconhecem a apoE. No entanto, a expressão tecido-específica desses receptores é distinta. Enquanto o gp330 tem expressão preferencial nos rins e adrenais, os LR-7/8 e LR-11 são encontrados em grande quantidade no tecido nervoso (KIM, *et al.* 1996).

O papel fisiológico do receptor da VLDL ainda não está bem conhecido, mas sua distribuição tecidual sugere uma participação relevante no fornecimento de triglicerídeos aos tecidos periféricos (JOKINEM, *et al.*, 1994). Em tecidos que necessitam grandes quantidades de energia (músculo, coração e tecido adiposo) encontrou-se grande expressão de receptores para VLDL. Estes também reconhecem a LPL além da apoE nas lipoproteínas (NIEMEIER, *et al.*, 1996).

Um novo receptor denominado receptor estimulado pela lipólise (LSR), foi encontrado na superfície das células hepáticas e é expresso na presença de ácidos graxos livres (AGL). Este também reconhece principalmente a apoE e possui um papel importante no "clearance" das lipoproteínas ricas em TG, porém é um receptor não relacionado à família dos receptores de LDL (BIHAIN & YEN, 1998).

Transporte reverso do colesterol

O transporte reverso do colesterol é assim chamado porque refere-se ao fluxo do colesterol dos tecidos periféricos (extra-hepáticos) para o fígado, onde este é re-utilizado ou excretado na bile. A principal lipoproteína mediadora deste fluxo de colesterol é a HDL (BARTER & RYE, 1996).

As HDL podem originar-se no fígado, intestino ou como resultado do catabolismo intravascular das LP ricas em TG, ou ainda, podem ser geradas no interstício por secreção de apoLP e fosfolípidos (EISENBERG, 1984; FIELDING & FIELDING, 1995). As HDL nascentes, também chamadas de pré- β HDL, são pequenas e discóides. Ao interagir com estruturas que contenham excesso de colesterol livre na interface com o meio aquoso (lipoproteínas ou membranas celulares) são capazes de receber esse colesterol. A enzima lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT) esterifica esse colesterol (GLOMSET, 1968) que passa para o interior da partícula, tornando a HDL maior, mais esférica e menos densa, agora denominada de HDL₃. A ação contínua da LCAT aumenta a quantidade de colesterol éster (CE) da HDL₃ transformando-a em HDL₂ (BARTER & RYE, 1996;

EINSENBURG, 1984).

O colesterol recém esterificado na HDL₂ é subseqüentemente transferido para lipoproteínas que contêm apoB (QM e QM-rem, VLDL, IDL e LDL), as quais são removidas da circulação rapidamente pelo fígado via receptor de LDL e LRP. Esse é o chamado transporte reverso do colesterol por uma via indireta (FIELDING & FIELDING, 1995). A transferência de CE das HDL para as lipoproteínas que contêm apoB é mediada por uma proteína específica denominada CETP (*cholesteryl ester transfer protein* = proteína de transferência de colesteril éster). A CETP transfere CE em troca de TG, de maneira não equimolar, enriquecendo a HDL₂ com TG e as apoBLP com CE.

Os TG e PL da HDL₂ são hidrolizados pela lipoproteína lipase hepática (LH) situada nos capilares sinusóides do fígado. Durante esse processo ocorre entrada de CE da HDL₂ no hepatócito (BAMBERGER, *et al.*, 1985), o que é chamado de captação seletiva de CE da HDL e também transporte reverso do colesterol direto. Com isso, a HDL₂ é reconvertida em HDL₃, a qual é mais eficiente em promover efluxo de CL dos tecidos periféricos (BARTER & RYE, 1996), re-iniciando o ciclo do transporte reverso de colesterol.

Ratos e camundongos têm perfil lipoprotéico bastante distinto do perfil dos seres humanos. Parte dessa diferença pode ser explicada porque esses animais não expressam CETP (HA & BARTER, 1982) e possuem elevados níveis de lipases (tanto LPL como LH) circulantes (GILLET, *et al.* 1980; PETERSON, *et al.* 1986).

In vivo, a maior parte da captação seletiva de CE da HDL ocorre no fígado e órgãos esteroideogênicos (KRIEGER, *et al.*, 1998). Em 1996, ACTON e

colaboradores verificaram que os receptores "scavenger" do tipo SR-BI reconheciam a HDL de maneira específica, promovendo a captação seletiva de CE principalmente em fígado e tecidos esteroideogênicos. Ainda não se conhece bem os mecanismos que regulam esse receptor, porém sua expressão nas células esteroideogênicas é regulada por condições que alteram os requerimentos celulares de colesterol (RIGOTTI, *et al.*, 1996; LANDSCHULZ, *et al.*, 1996; WANG, *et al.*, 1996).

Proteína de transferência de colesterol éster (CETP)

A CETP é uma glicoproteína constituída de 476 aminoácidos, dos quais cerca de 40% são resíduos hidrofóbicos. Seu peso molecular aparente é de 66 a 74 KDa em gel de poliacrilamida com SDS. Seu gene situa-se no braço longo do cromossomo 16 e consiste de 16 exons e 15 introns, perfazendo um total de 25 Kb de DNA genômico (TALL, 1995).

A atividade da CETP já foi documentada em mais de 16 espécies de vertebrados, incluindo peixes, répteis, aves e mamíferos (HA & BARTER, 1982). O RNA mensageiro da CETP é encontrado em vários tecidos do corpo, incluindo fígado, baço, adiposo, adrenal e outros. No entanto, o principal sítio de expressão e secreção da CETP na maior parte dos mamíferos é o fígado. A maior parte da CETP do plasma é encontrada associada à fração de HDL (TALL, 1993).

A CETP media toda a atividade de troca de lipídeos neutros no plasma e é responsável por cerca de metade das trocas de PL entre as lipoproteínas. O mecanismo de ação provável dessa proteína descrito por TALL (1995) consiste na dissociação da CETP da HDL (doadora) e ligação e transferência do colesterol

éster para lipoproteínas que contém apoB (receptoras) VLDL, LDL e QM. A disponibilidade de lipídeos neutros na superfície das LP receptoras facilita a interação com a CETP. Os grupos fosfato dos fosfolipídeos são os sítios primários da interação da LP com a CETP, e a estabilidade do complexo está relacionada com o aumento da eletronegatividade da LP receptora.

A CETP tem uma função importante no transporte reverso de colesterol aumentando o movimento do colesterol do plasma para o fígado via transporte reverso de colesterol indireto. Essa proteína também pode estimular a transferência do colesterol de tecidos periféricos para as HDL (primeira etapa do transporte reverso de colesterol) de duas maneiras: 1- atuando em conjunto com a lipase hepática na reconstituição de partículas pequenas de HDL (HDL₃ e pré-β HDL), as quais são mediadores ótimos do efluxo celular de colesterol (KUNITAKE, *et al.*, 1992) e 2- estimulando a ação da LCAT (OLIVEIRA, *et al.*, 1996). Por outro lado, a CETP pode promover o enriquecimento das lipoproteínas que contém apoB com colesterol, ação essa que pode ser aterogênica, particularmente quando a captação hepática dessas partículas está comprometida.

Existe uma correlação positiva entre níveis plasmáticos de colesterol total e CETP, tanto em indivíduos normolipidêmicos como em diversas formas de hiperlipidemias (TATO, *et al.*, 1995; TALL, *et al.*, 1987). Por outro lado, na deficiência genética de CETP, mutação identificada em várias famílias no Japão (INAZU, *et al.*, 1990), ocorre ausência completa de CETP no plasma e hiperalfalipoproteinemia. O aumento da concentração de HDL-colesterol em consequência da redução da atividade da CETP foi reproduzido

experimentalmente em coelhos tratados com anticorpos monoclonais contra CETP (WHITLOCK, *et al.*, 1989) e, ao contrário, a diminuição de HDL foi observada em camundongos transgênicos que expressam o gene da CETP (AGELLON, *et al.*, 1991). Em conjunto, estes estudos indicam uma correlação direta entre níveis plasmáticos de CETP e colesterol total, e uma correlação inversa entre CETP e HDL-colesterol. No entanto, a relação causa-efeito não está ainda esclarecida. A interpretação destes achados quanto ao potencial de desenvolvimento de aterosclerose é ambígua e controversa. Por um lado, o aumento da CETP pode representar um mecanismo homeostático para aumentar a eficiência do transporte reverso de colesterol. Por outro lado, o aumento de CETP favorece a redistribuição do CE para as apoBLP, caracterizando um perfil lipoprotéico potencialmente mais aterogênico.

O modelo dos camundongos transgênicos

No final dos anos 80 e início dessa década, o desenvolvimento de animais transgênicos e "knock out" (com 1 ou mais genes inativados) têm resolvido algumas das complexidades do funcionamento de genes envolvidos no transporte das lipoproteínas e apontado novos alvos para intervenções farmacológicas para normalizar o perfil lipoprotéico e reduzir o risco de aterosclerose.

Camundongos normalmente não expressam a CETP e por isso são modelos muito úteis para o estudo da expressão dessa proteína. Em estudos prévios verificou-se que a expressão da CETP resulta em diminuição do colesterol da fração HDL (AGELLON, *et al.*, 1991). Quando expressa em níveis supra-fisiológicos, a CETP pode induzir um aumento de lesões ateroscleróticas em

camundongos transgênicos (MAROTI *et al.*, 1993). Em contrapartida, se expressa em condições de hipertrigliceridemia basal (transgênicos para apoCIII), a CETP promove uma redução das lesões ateroscleróticas (HAYEK, *et al.*, 1995).

Outro achado importante de estudos prévios com animais transgênicos para CETP foi a demonstração de que sua expressão (tanto RNAm como proteína) é estimulada pelo colesterol da dieta (JIANG, *et al.*, 1992). Além disso, elementos regulatórios responsivos ao colesterol da dieta foram mapeados no promotor do gene da CETP (OLIVEIRA, *et al.*, 1996).

Hormônios da tireóide e metabolismo das LP

Os hormônios da tireóide alteram a síntese de proteínas e o metabolismo de um modo geral. Eles podem ter uma ação celular não-genômica (efeitos na membrana plasmática e nas mitocôndrias) ou genômica (nuclear). T3 e T4 circulantes penetram no citoplasma e em alguns tecidos o T4 é convertido na forma ativa, T3, através da ação da 5'deiodinase. O T3 passa para o núcleo onde liga-se à receptores nucleares específicos de alta afinidade para atuarem na transcrição gênica. O complexo T3-receptor reconhece sequências específicas de nucleotídeos do DNA de genes regulados pelos hormônios da tireóide. Essas sequências são denominadas elementos responsivos aos hormônios da tireóide ou TRE. Vários TRE foram descritos recentemente (BRENT, *et al.*, 1994). Os receptores nucleares de T3 podem formar dímeros entre si (homodímeros) ou com outros receptores nucleares (heterodímeros), tais como o receptor do ácido 9-cisretinóico (RXR), e então ligam-se aos TRE. O complexo hormônio-receptor-DNA pode ainda interagir com outros fatores de transcrição (co-ativadores ou co-

repressores) que induzem a regulação transcricional positiva ou negativa (MOTOMURA & BRENT 1998).

O excesso de hormônios da tireóide circulante pode levar ao hipertireoidismo ou tireotoxicose. O principal efeito metabólico é uma elevação significativa da taxa metabólica basal que leva à disfunção de vários sistemas, tais como o cardiovascular, muscular e nervoso. Diminuição da massa adiposa é uma característica típica desse estado (MOTOMURA & BRENT, 1998). Muitos destes efeitos são desencadeados por estimulação do número de receptores β -adrenérgicos em vários órgãos (ROS *et al.*, 1988; MOTOMURA & BRENT, 1998). Por outro lado, a diminuição das concentrações de T3 e T4 no plasma (hipotireoidismo) leva à diminuição da taxa metabólica basal com consequente aumento de peso corporal e, entre outros sintomas, mixedema e bócio.

Os hormônios da tireóide causam múltiplas alterações no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas. Em seres humanos e animais experimentais com hipotireoidismo é frequente a ocorrência de hipercolesterolemia (HEIMBERG *et al.*, 1985), podendo ocorrer aumento (NIKKILA, *et al.*, 1972) ou diminuição (SALTER, *et al.*, 1991) da trigliceridemia. O aumento da concentração de colesterol plasmático encontrado no hipotireoidismo deve-se principalmente a um aumento da fração LDL (CHAIT, *et al.*, 1979; THOMPSON, *et al.*, 1981; STAELS, *et al.*, 1990; SALTER, *et al.*, 1991). Quando ao hipotireoidismo associa-se uma dieta rica em colesterol e ácidos graxos saturados, ocorre também aumento de VLDL juntamente com o aumento da LDL (SALTER, *et al.*, 1991). Em contrapartida, no hipertireoidismo ocorre redução dos níveis de VLDL e LDL

(MULS, *et al.*, 1982; FRIIS, *et al.*, 1987).

O principal evento responsável pela variação da concentração de LDL na disfunção tireoidiana é provavelmente a alteração do número de receptores hepáticos para essa LP. No hipotireoidismo verificou-se diminuição e no hipertireoidismo, aumento do RNAm deste receptor (SCARABOTTOLO, *et al.*, 1986, CHAIT, *et al.*, 1979; THOMPSON, *et al.*, 1981; STAEELS, *et al.*, 1990; SALTER, *et al.*, 1991).

Assim como ocorre com os receptores de LDL, no hipotireoidismo experimental em ratos também ocorre redução da expressão de LRP. No entanto, o tratamento com tiroxina eleva os receptores de LDL mas não altera a expressão de LRP (SZANTO, *et al.*, 1992).

Embora não se conheça qual a influência do número de receptores de VLDL sobre o *clearance* dessas lipoproteínas, foi observado um efeito bastante potente dos hormônios da tireóide sobre o número de receptores e a abundância de seu RNAm no músculo esquelético de ratos. Os receptores de VLDL estavam 80% reduzidos em animais hipotireoideos e 300% aumentados nos hipertireoideos. Essas manobras experimentais não afetaram os receptores de VLDL do tecido adiposo e do coração (JOKINEN, *et al.*, 1994).

A resposta dos níveis plasmáticos de HDL em seres humanos com disfunção tireoidiana é bastante variável. Enquanto a maior parte dos trabalhos em pacientes hipertireoideos descrevem um decréscimo da concentração da HDL (MULS, *et al.*, 1982; FRIIS, *et al.*, 1987; TAN, *et al.*, 1998a), no hipotireoidismo ela pode estar aumentada (MULS, *et al.*, 1984; FRIIS, *et al.*, 1987; TAN, *et al.*, 1998 a e b), normal (VERDUGO, *et al.*, 1987) ou diminuída (AGDPA, *et al.*, 1979).

O comportamento da concentração sérica de HDL e apoAI parece ser espécie- específica. Enquanto em pacientes a concentração plasmática de apoAI encontra-se diminuída no hipertireoidismo e aumentada no hipotireoidismo (O'BRIEN, *et al.*, 1997; MULS, *et al.*, 1985), em ratos ocorre o contrário. Em animais hipertireoideos observa-se aumento da concentração sérica de HDL e apoAI e nenhuma variação significativa na concentração de apoAI nos animais hipotireoideos (MOORADIAN, *et al.*, 1996, WILCOX, *et al.*, 1991, HEIMBERG, *et al.*, 1985).

Verificou-se em animais que a triiodotironina (T3) é um mediador potente da expressão do gene da apoAI (ROMMEY, *et al.*, 1992), onde os elementos cis- atuantes responsivos aos hormônios da tireóide foram mapeados na extremidade 5' do gene. A estabilidade e maturação do RNAm da apoAI estão estimuladas pelos hormônios da tireóide (VANDENBROUCK, *et al.*, 1995; SOYAL, *et al.*, 1995). Embora a abundância do RNAm hepático da apoAI seja estimulada pelos hormônios da tireóide (STAEELS, *et al.*, 1990; STROBL, *et al.*, 1992; VANDENBROUCK, *et al.*, 1995; MOORADIAN, *et al.*, 1996), a secreção de apoAI por hepatócitos pode não estar alterada (VANDENBROUCK, *et al.*, 1995). Já a secreção intestinal da apoAI está estimulada no hipertireoidismo (WILCOX, *et al.*, 1988).

Várias outras proteínas e enzimas do metabolismo do colesterol são reguladas por hormônios da tireóide, tais como LPL, LH, ACAT, HMGCo-A redutase, LCAT e CETP.

Em pacientes com hipotireoidismo ocorre uma diminuição da atividade da LH e LPL, enquanto em hipertireoideos observou-se aumento da atividade da LH

mas nenhuma alteração da LPL (VALDEMARSSON, *et al.*, 1983 e 1984, HANSSON, *et al.*, 1983, TAN, *et al.*, 1998b). Também em ratos hipotireoideos verificou-se diminuição da LH enquanto a LPL permaneceu inalterada (MURASE, *et al.*, 1980). Hepatócitos estimulados por hormônios da tireóide apresentam aumento da liberação de LH (HANSON, *et al.*, 1986). No entanto, o RNAm da LPL aumentou em animais hipotireoideos e diminuiu nos hipertireoideos em músculo esquelético, coração e adiposo (JOKINEN, *et al.*, 1994). ZERBINATTI e colaboradores (1991) observaram que a lipólise intravascular de partículas ricas em TG variava com a função tireoideana de ratos devido à alterações da remoção plasmática dessas partículas e não da velocidade de hidrólise de TG. Enquanto no hipotireoidismo houve um retardo, no hipertireoidismo houve aceleração da remoção plasmática de partículas ricas em TG, mas a hidrólise *in vivo* dos TG não estava alterada. STAELS, *et al.*, 1990, mostraram que a expressão da LH não é modificada pelos hormônios da tireóide em ratos.

A esterificação intracelular de colesterol medida em hepatócitos de ratos hipotireoideos encontra-se diminuída, apesar da atividade da ACAT (acil Co-A: colesterol aciltransferase), medida com substrato exógeno, não ter se modificado (SALTER, *et al.*, 1991). FIELD *et al.* (1986) verificaram diminuição da atividade da ACAT no fígado e aumento no intestino de ratos hipotireoideos. O tratamento com tiroxina reverteu esses efeitos.

Quanto à atividade da LCAT, VALDEMARSSON *et al.* (1984) observaram que a habilidade de esterificação de colesterol estava aumentada em plasma de pacientes hipertireoideos, diminuindo após o tratamento. No entanto, a velocidade de esterificação com substrato exógeno estava normal.

A síntese de colesterol medida como atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA red) encontra-se diminuída no fígado de hipotireoideos e aumentada no fígado e intestino de hipertireoideos (FIELD, *et al.*, 1986). Embora a síntese corpórea de colesterol esteja aumentada no hipertireoidismo, a hipocolesterolemia frequente nestes casos resulta de uma excreção biliar de colesterol também muito aumentada (MOTOMURA & BRENT, 1998). Além disso, a enzima colesterol 7 alfa hidroxilase é sensível e rapidamente estimulada por hormônios da tireóide (NESS, *et al.*, 1991).

Regulação hormonal da CETP

A expressão da CETP pode ser regulada por estímulos nutricionais, inflamatórios e hormonais.

Os estados de jejum e alimentado também modificam a expressão do gene da CETP. O RNAm da CETP no tecido adiposo e músculo cardíaco está aumentado após 12 horas de jejum quando comparado à alimentação com dieta rica em carboidratos (JIANG, *et al.*, 1991). Esses dados sugerem que a diminuição do RNAm da CETP no tecido adiposo e muscular no estado alimentado pode estar relacionada à ação da insulina.

Hormônios sexuais são potentes moduladores do metabolismo das lipoproteínas. Em geral, esteróides estrogênicos aumentam os níveis de HDL, enquanto os androgênicos têm efeito oposto (CROOK, *et al.*, 1990). Esteróides gonadais afetam os níveis de HDL por alteração da síntese de apoA1 e da atividade da lipase hepática. A CETP plasmática também é alterada por hormônios esteróides. A atividade plasmática da CETP diminui durante a gestação

em coelhos, no entanto, está aumentada no terceiro trimestre de gravidez em seres humanos, sugerindo um efeito dos hormônios sexuais sobre a expressão da CETP (TALL, 1993).

Terapia com corticoesteróides resulta em redução da CETP no plasma de indivíduos normais e com síndrome nefrótica (MOULIN, *et al.*, 1992). Além disso, dose única de cortisona leva a uma drástica redução de RNAm de CETP em animais transgênicos para CETP (MASUCCI-MAGOULAS, *et al.*, 1995).

Hormônios da tireóide são reguladores metabólicos e de expressão gênica (SAMUELS, *et al.*, 1988) envolvidos em quase todos os aspectos das atividades fisiológicas normais. Recentemente o efeito dos hormônios da tireóide sobre a CETP foi investigado. RITTER *et al.*, 1996, não observaram diferença na concentração plasmática de CETP de indivíduos hipotireoideos, porém verificaram uma diminuição na atividade de transferência de CE, sugerindo que essa diminuição de transferência seja secundária à modificações das lipoproteínas receptoras (VLDL e LDL) de CE. TAN *et al.* (1998a) verificaram aumento na atividade da CETP em indivíduos hipertireoideos e diminuição nos hipotireoideos, quadro que foi revertido com o tratamento para restabelecer a função tireoideana.

OBJETIVOS

Disfunções da tireóide resultam em múltiplas alterações do metabolismo das LP. Elevação da concentração de LDL no hipotireoidismo e redução desses no hipertireoidismo são as alterações mais consistentes e frequentes e provavelmente refletem a regulação do número de receptores de LDL pelos hormônios da tireóide. O efeito dos hormônios da tiróide sobre o metabolismo de HDL é menos compreendido. Assim o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito dos hormônios da tireóide sobre:

- o perfil de lipoproteínas plasmáticas;
- a velocidade de catabolismo intravascular da HDL;
- a captação tecidual do colesteril éster de HDL;
- a atividade das duas principais proteínas que modulam o metabolismo de HDL: a CETP e a lipase hepática.

Para tanto, utilizamos o modelo experimental do camundongo transgênico que expressa níveis fisiológicos de CETP humana, o que torna seu sistema de transporte de colesterol mais semelhante ao do ser humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados para esse estudo, camundongos C57BL/6J e transgênicos para CETP humana, derivados da linhagem 5203 (JIANG, *et al.* 1992) de ambos os sexos, com 8 a 11 meses de idade. Esses animais foram subdivididos em 4 grupos: hiper e hipotireoideos e seus respectivos controles. Os animais hipertireoideos foram tratados com triiodotironina (T3) (SIGMA), 25µg/100g de peso, via intraperitoneal (IP) durante 7 dias seguidos (DE LUISE, *et al.*, 1989). Nos controles foi injetado o mesmo volume de solução salina. Os hipotireoideos foram tratados com Propiltiouracil (PTU) (SIGMA) na água de beber, durante 3 semanas (MURASE, *et al.*, 1980; ZERBINATTI, *et al.*, 1991). A primeira semana com uma concentração de 0,1%, a segunda semana com 0,05% e na terceira 0,08%. Seus controles receberam água de beber comum (torneira).

Isolamento e marcação da HDL com colesterol radioativo

Utilizou-se o método descrito anteriormente por OLIVEIRA & QUINTÃO 1996, para a marcação da HDL com colesterol éter triciado. Para tanto, obteve-se misturas de plasmas de doadores normolipidêmicos que não estavam em jejum. Aproximadamente 20mL da mistura plasmática foi ajustada a densidade 1,125 g/mL com KBr (0,202 g/mL) e ultracentrifugado no rotor 50 ti, a 4°C, 40.000 rpm, por 40 horas. Descartou-se os 2 mL sobrenadantes de cada tubo e dializou-se o infranadante ($d < 1.125$) que contém HDL₃ e proteínas plasmáticas. 50 uCi de [$^3\text{H}(\text{N})$] - colesterol oleoil éter dissolvido em 100µL de etanol absoluto foi adicionado,

gota-a-gota, aos 10mL da fração de $d > 1.125$, sob agitação. A mistura foi então transferida para os tubos do rotor 50 ti e incubada a 37 °C por 20 horas em rotor de tubos (Tube rotator, Scientific Equipment Products, EUA) a 20 rpm. Nesse tempo de incubação o ^3H colesterol éter é incorporado às HDL por ação da CETP que encontra-se na fração de $d > 1.21$. Em seguida, ajustou-se a densidade para 1.21 g/mL e ultracentrifugou-se a 40.000 rpm, 4 °C, por 40 horas para obtenção de HDL₃ ($1.125 < d < 1.21$) marcada com ^3H colesterol éter ($^3\text{HCet-HDL}$). Essa foi exaustivamente dializada contra salina 0,15M e esterilizada em filtro Millipore 0,22 μm . A eficiência da marcação variou entre 25-30%.

Estudo cinético da HDL marcada com colesterol éter radioativo

No último dia de tratamento injetou-se (IP) 0,1 mL de uma solução de HDL marcada com colesterol éter triciado ($^3\text{HCet-HDL}$) contendo 1.000.000 dpm. 50 μL de sangue da ponta da cauda foram coletados em capilares heparinizados nos tempos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 24 horas, após a injeção de $^3\text{HCet-HDL}$. Logo após a coleta, os capilares foram centrifugados em uma centrífuga de hematócrito (CELM) por 5 min a 12000 rpm. Transferiu-se 20 μL de plasma para frascos de contagem contendo 3 mL de líquido de cintilação (SARDI) e determinou-se a radioatividade em um cintilador beta Beckman LS6000TA. Na última coleta de 24 horas após a injeção de $^3\text{HCet-HDL}$, os animais foram anestesiados com injeção IP de Rompum® (Bayer), 16mg/kg de peso corporal, e Vetanarcol® (König), 50mg/Kg, para exsanguinação total via plexo retroorbital.

A taxa fracional de remoção plasmática do $^3\text{HCet-HDL}$ foi calculada como a

inclinação da curva de desaparecimento da radioatividade no plasma (do pico máximo até 8 horas após a injeção) pelo ajuste de curva exponencial utilizando-se o programa Microcal™ Origin™ 4.1. O tempo de residência da HDL na circulação foi calculado como a área sob a curva da radioatividade normalizada (pico máximo = 1) (TAI, 1994).

Estudo da captação tecidual de colesterol éter da HDL

Para a extração de lípidos teciduais após a exsanguinação, perfundi-se o animal com 10 mL de solução fisiológica via ventrículo direito, com secção da aorta abdominal distal. Coletou-se uma parte do fígado, intestino delgado, baço, coração, tecido adiposo, músculo (abdominal), pulmões, adrenais, rim e gônadas (ovário e testículo). Foram feitos “pools” das adrenais e ovários de animais do mesmo grupo. Os órgãos removidos para extração lipídica foram estocados a -20°C. Os tecidos (0,1 - 0,5g) foram descongelados e macerados em tubos de vidro de 15mL, aos quais foram adicionados 3,5mL de metanol (Merck®) e 7mL de Clorofórmio (Merck®). Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente por uma noite, tempo suficiente para decantação dos resíduos do tecido delipidado. No dia seguinte, o extrato foi filtrado em um papel filtro tipo 50, e a esse adicionou-se 2,3mL de água destilada. Após um noite em repouso, a fase aquosa superior foi substituída por uma solução de clorofórmio/ metanol/água (3:48:47, v/v) e seguiu-se outro período de repouso de 24 horas. A fase superior foi então descartada e o extrato transferido para frascos de contagem e evaporado com ajuda de ar comprimido em uma capela de exaustão. Após a secagem,

adicionou-se 10 mL de líquido de cintilação (Sardi) e determinou-se a radioatividade em um cintilador β (Beckman LS 6000 TA).

Dosagens Bioquímicas

Para o diagnóstico de hiper e hipotireoidismo dosou-se Tiroxina (T4) total no plasma dos camundongos utilizando-se o Acess® Immunoassay System - 33800. Essas dosagens foram feitas no laboratório Prevlab - Laboratório Clínico - Campinas-SP.

Os perfis hepático renal e lipídico foram feitos no Laboratório de Patologia Clínica - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade de Campinas - SP. Foram dosados: uréia, creatinina, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase-alcalina (FALC), HDL-colesterol, colesterol total, triglicerídeos (TG) no analisador automático MEGA utilizando-se os reagentes da Merck Diagnostic®.

Fracionamento das Lipoproteínas

Foram feitos "pools" de plasma fresco dos 4 grupos de animais tratados e controles. Esses foram submetidos à cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) utilizando-se coluna de superose 6 para o fracionamento das lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) (JIAO, *et al.* 1990; MASUCCI-MAGOULAS, *et al.*, 1996). Nas 40 frações eluídas da coluna foi determinado a quantidade de colesterol total em analisador automático COBAS utilizando "kit" enzimático da Boehringer Mannheim.

Atividade da CETP no plasma:

Uma mistura de VLDL+LDL foi obtida por ultracentrifugação de plasma de doadores normolipidêmicos e utilizada como lipoproteínas receptoras. HDL também obtida por ultracentrifugação de plasma de doadores normolipidêmicos e marcada radioativamente com ^{14}C -colesteril-éster (^{14}CCE), como descrito acima para o colesteril éter triciado. O ensaio isotópico consiste em uma reação contendo 50µg de proteína de VLDL+LDL, 10000dpm de ^{14}CCE -HDL e 10µL do plasma fonte de CETP em um volume final de 100µL. A mistura é incubada a 40°C por 2 horas. Em seguida, adiciona-se à mistura 400µL de tampão tris(10mM)/salina(150mM)/EDTA(1mM) e 50µL de coquetel de precipitação das lipoproteínas que contém apoB (partes iguais de sulfato de dextrana 1,6% e MgCl_2 1,0M) e espera-se 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras são então centrifugadas à 12000rpm por 30 minutos. 450µL do sobrenadante são recuperados e misturados à 2 mL de solução cintiladora para determinação da radioatividade remanescente nas HDL. No ensaio são utilizados sempre 2 blanks (tubos com salina) e 2 controles-negativos (tubos com plasma de camundongo não-transgênico). Os resultados são expressos como % de ^{14}CCE transferido da HDL para as V+LDL:

$$\% \text{CE transferido} = (\text{dpm blank} - \text{dpm amostra}) \times 100 / \text{dpm blank}$$

Atividade da lipase hepática (LH)

A atividade da enzima LH foi determinada de acordo com Ehnholm & Kuusi (1986) através de incubação do plasma pré e pós heparina (100U/Kg,

intraperitoneal) com um substrato de goma arábica e trioleína marcada com ^3H (o radioisótopo está ligado ao ácido graxo) pH=8,5, 37 °C por 1 hora. A enzima hidrolisa a ligação glicerol-ácidos graxos. Os ácidos graxos livres liberados foram extraídos com metanol/clorofórmio/heptana (1,4:1,25:1) em pH=10,5 para medida da radioatividade. A atividade da enzima lipoproteína lipase periférica (LPL) foi inibida pela presença de 2,0M de NaCl no meio de incubação.

RESULTADOS

Indução de hipo e hipertireoidismo em camundongos CETP transgênicos

Camundongos machos e fêmeas CETP transgênicos, pesando entre 25 e 35g, com 10 a 11 meses de idade foram usados para indução do hiper e hipotireoidismo experimental. O hipertireoidismo foi obtido através de injeções intraperitoneais de 5 µg/animal de triiodotironina (T3) em solução salina alcalinizada, diariamente durante 7 dias. Os animais controles receberam as injeções intraperitoneais diárias apenas com a salina. Para indução do estado hipotireoideo, os animais foram tratados com uma solução aquosa de propiltiouracil (PTU) por 3 semanas como única fonte de água de beber. Como os animais diminuíram muito a ingestão da solução de PTU 0,1% na primeira semana do tratamento, diminuimos a dosagem para 0,05% na segunda semana e aumentamos para 0,08% na terceira semana do tratamento. Os controles receberam água comum *ad libitum*.

As concentrações plasmáticas dos hormônios nos 4 grupos de animais ao final dos tratamentos são apresentadas na **Tabela I**. Como era esperado, esses resultados mostram a eficiência dos 2 tratamentos, i. e., as altas concentrações plasmáticas de T3 provocadas pelas injeções diárias induziram o bloqueio da secreção tireoideana de tiroxina nesses animais. Também a ingestão oral de PTU inibiu a secreção tireoideana de tiroxina.

Como podemos observar na **Tabela II**, não houve variação significativa do peso corporal dos animais hipertireoideos após o tratamento hormonal. No entanto, o consumo de ração aumentou significativamente sugerindo que o gasto

energético desses animais também está aumentado, como esperado.

Nos animais tratados com PTU houve um menor consumo de ração e de água, tanto nos machos quanto nas fêmeas (**Tab.III**). Isto repercutiu na diminuição significativa do peso final apenas nos machos. Através da observação mais detalhada do padrão alimentar desses animais durante o tratamento (**Fig.1**), verificamos que na primeira semana, com PTU a 0,1%, ocorreram variações mais intensas. Após esse período, pudemos observar uma recuperação no consumo de ração e água e do peso, tendendo à normalização.

Efeito dos hormônios da tireóide sobre parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos CETP transgênicos:

A **tabela IV** mostra uma avaliação bioquímica dos níveis de lípides, enzimas hepáticas e uréia e creatinina no plasma dos animais com hipo e hipertireoidismo e seus respectivos controles. Encontramos uma diminuição significativa da concentração de colesterol total e do colesterol da fração HDL e aumento de TG no plasma dos animais hipertireoideos. Esses resultados foram confirmados por uma metodologia mais adequada, a cromatografia líquida de alta resolução (FPLC), descrita a seguir. Também foi observado um aumento significativo da fosfatase alcalina, achado já descrito na literatura para o hipertireoidismo (MOTOMURA & BRENT, *et al.*, 1998), e decréscimo dos níveis de creatinina. Com relação aos animais hipotireoideos, a única variação encontrada entre os animais tratados e controles foi uma diminuição dos níveis de colesterol da fração HDL. Esse achado não foi confirmado por FPLC. Isso provavelmente aconteceu porque o método de precipitação de lipoproteínas para obtenção da fração de HDL é

altamente suscetível à interferentes. Esse é bastante grosseiro se comparado aos métodos-referência como a ultracentrifugação e FPLC.

Efeito dos hormônios da tireóide sobre o perfil de lipoproteínas de camundongos CETP transgênicos:

O perfil de lipoproteínas plasmáticas obtido por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC, "fast protein liquid chromatography") dos animais hipertireoideos é apresentado em valores absolutos (concentração de colesterol em cada fração) na **Fig.2** e em valores relativos (distribuição percentual de colesterol em cada fração) na **Tab.V**. Observamos um aumento significativo do colesterol da fração VLDL e redução paralela da HDL. O principal efeito do hipertireoidismo descrito (MULS, *et al.* 1982; FRIIS, *et al.* 1987) é a redução dos níveis de VLDL e LDL. Esse efeito é atribuído a um aumento do número de receptores para LDL, inclusive ao nível de RNAm do receptor (CHAIT, 1979; THOMPSON, 1981; STAELS, *et al.*, 1990; SALTER, *et al.*, 1991). Por outro lado, ZERBINATTI, *et al.*, 1991 mostraram uma diminuição significativa da lipólise intravascular de lipoproteínas ricas em triglicérides em ratos hipertireoideos. Isso poderia explicar o aumento da fração das VLDL encontrado por nós. A redução de HDL nos hipertireoideos encontrada por nós está de acordo com outros trabalhos (MULS, *et al.*, 1982; FRIIS, *et al.*, 1987; TAN, *et al.*, 1998).

O perfil de lipoproteínas plasmáticas dos animais com hipotireoidismo é apresentado na **Fig. 3** (valores absolutos) e **Tab. VI** (distribuição percentual). Encontramos um aumento significativo do colesterol da fração LDL. Entre as muitas alterações conhecidas no transporte das lipoproteínas no estado

hipotireoideo, a elevação das concentrações de LDL é a variação mais consistente observada em seres humanos (CHAIT, *et al.*, 1979; THOMPSON, *et al.*, 1981; QUINTÃO, *et al.*, 1992). A HDL encontra-se aumentada, normal ou diminuída no hipotireoidismo (VERDUGO, *et al.*, 1987). O aumento da lipólise intravascular das lipoproteínas ricas em triglicérides descrito em ratos hipotireoideos (ZERBINATTI, *et al.*, 1991) poderia ser a causa do aumento das LDL. No entanto, não verificamos uma concomitante redução das VLDL nesses animais, o que sugere que uma redução do número de receptores de LDL é provavelmente responsável por essa alteração.

Efeito dos hormônios da tireóide sobre a velocidade de remoção plasmática e captação tecidual do colesterol éster de HDL em camundongos CETP transgênicos

Para avaliar mais especificamente o metabolismo das HDL frente à manipulação da função tireoideana (tratamentos com T3 e PTU) realizamos estudos cinéticos da remoção plasmática de HDL marcada radioativamente e sua captação tecidual. A HDL foi marcada com um análogo do colesterol éster, o colesterol-oleoil-éter, o qual não é metabolizado intracelularmente e, portanto, uma vez captado pelos tecidos não retorna à circulação sanguínea. Optamos por uma administração intra-peritoneal, que é muito mais fácil tecnicamente do que a via endovenosa. Esta opção é legítima, uma vez que a HDL é uma lipoproteína de origem múltipla, *i.e.*, ela é secretada diretamente pelo fígado, ou intestino ou ainda pode originar-se do interstício. As curvas de aparecimento e desaparecimento da HDL radioativa no plasma dos animais com hiper e hipotireoidismo experimental e

de seus controles são apresentadas nos anexos 1 e 2, respectivamente. Através do ajuste de curvas exponencial a partir do pico máximo de radioatividade até 8 horas após a injeção da HDL estimamos a velocidade de catabolismo intravascular da HDL (taxa fracional de remoção). A área total sob as curvas normalizadas de radioatividade no plasma, representa o tempo médio de residência das partículas na circulação, medido no período de 24 h. Esses parâmetros estão apresentados na **Tab. VII**. Verificamos que, nos animais hipertireoideos, a velocidade de remoção plasmática das HDL é 1,9 vezes maior e o tempo médio de residência das HDL no compartimento plasmático é 1,7 vezes menor que em seus controles. Esses dados podem explicar a diminuição dos níveis de HDL-colesterol encontrada na avaliação bioquímica (**Tab.IV**) e no fracionamento do plasma por FPLC (**Fig.2 e Tab.V**). Não houve diferença significativa na velocidade de remoção plasmática da HDL nos animais hipotireoideos (**Tab. VII**). O que também foi verificado nas medidas estáticas desta lipoproteína no plasma por FPLC (**Fig.3 e Tab.VI**).

O estudo da captação tecidual do colesterol éter da HDL injetada intra-peritonealmente nos 4 grupos de animais é apresentado na **figura 4** (hipertireoideos vs. controles) e **figura 5** (hipotireoideos vs. controles). Entre os 11 órgãos investigados, houve uma maior captação de colesterol éter da HDL pelo músculo esquelético dos animais hipertireoideos ($p<0,02$) e menor captação pelo intestino delgado e baço ($p<0,05$) (**fig.4**). Nos animais hipotireoideos, a captação de colesterol éter da HDL foi significativamente menor no intestino delgado (**fig.5**).

Efeito dos hormônios da tireóide sobre a atividade da CETP e da lipase hepática no plasma de camundongos CETP transgênicos:

A atividade da CETP tem sido inversamente correlacionada à concentração de HDL-colesterol (TALL *et al.*, 1987; TALL, 1995; TATO, *et al.*, 1995; TALL *et al.*, 1987; INAZU, *et al.*, 1990) e por isso foi avaliada nesse trabalho. Na **Tab.VIII** apresentamos a atividade da CETP no plasma dos camundongos transgênicos hiper e hipotireoideos e de seus controles. Verificamos que houve um aumento de cerca de 2 vezes na atividade da CETP no plasma dos hipertireoideos, enquanto que nenhuma variação desta foi detectada no plasma dos hipotireoideos. Portanto, nossos achados demonstram que os hormônios da tireóide regulam positivamente a CETP e reforçam a idéia de que a CETP tem papel determinante na concentração de colesterol da HDL.

Outra proteína que modifica a concentração plasmática da HDL é a lipase hepática (HL). Para avaliar a atividade desta enzima outro grupo de camundongos transgênicos para CETP foi induzido ao hipertireoidismo. Os resultados são apresentados na **Tab. IX**. Observamos que o tratamento com T3 resultou em diminuição da atividade da LH e aumento dos ácidos graxos livres e triglicerídeos no plasma, tanto pré quanto pós administração com heparina.

DISCUSSÃO

Nesse trabalho investigamos os efeitos do excesso e da deficiência de hormônios da tireóide sobre o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, mais especificamente da HDL, em camundongos transgênicos que expressam a proteína de transferência de colesterol éster, CETP. Verificamos que no estado hipertireoideo houve elevação da concentração plasmática de triglicerídeos totais e de colesterol de VLDL e redução do colesterol de HDL. Embora vários estudos *in vitro* tenham descrito uma redução da secreção hepática de VLDL, em animais experimentais e pacientes hipertireoideos a concentração plasmática de TG é bastante variável (HEIMBERG, *et al.*, 1985). Tanto influências hormonais como a disponibilidade de substratos são importantes reguladores da síntese e secreção de VLDL. O aumento da lipólise no tecido adiposo no hipertireoidismo (OPENHEIMER, *et al.*, 1987 e 1991) leva a um aumento da concentração de ácidos graxos livres no plasma, também observado por nós (Tab. IX), o que poderia estimular a secreção hepática de VLDL. De maneira oposta à lipólise intracelular, a lipólise intravascular mediada pela lipoproteína lipase, pode estar diminuída (ZERBINATTI *et al.*, 1991) no hipertireoidismo, o que poderia explicar um aumento da VLDL independentemente de sua taxa de secreção.

Por outro lado, vários trabalhos demonstram um *clearance* de LDL aumentado no hipertireoidismo e diminuído no hipotireoidismo (ROSS, *et al.*, 1974; SIKES, *et al.*, 1981; THOMPSON, *et al.*, 1981). Isso acontece porque os hormônios da tireóide modulam a atividade dos receptores de LDL (CHAIT *et al.*, 1979; STAELS, *et al.*, 1990; SALTER, *et al.*, 1991) levando a um aumento da

concentração plasmática de LDL no hipotireoidismo, o qual geralmente é revertido com o tratamento da doença tireoideana. Esse aumento de LDL no plasma também foi observado em nossos animais hipotireoideos.

O efeito dos hormônios da tireóide sobre o metabolismo das HDL é menos compreendido. A concentração plasmática da HDL pode estar normal (NISHITANI, *et.al.* 1990) ou diminuída (MULS, *et. al.*, 1982; FRIIS, *et. al.*, 1987; TAN, *et. al.*, 1998) em pacientes com hipertireoidismo, enquanto no hipotireoidismo, ela pode estar aumentada (FRIIS, *et. al.*, 1987, MULS, *et. al.*, 1984, TAN, *et. al.*, 1998), normal (VERDUGO, *et. al.*, 1987) ou ainda diminuída (AGDPA, *et. al.*, 1979). Os níveis plasmáticos de apoAI são também variáveis. Geralmente refletem os níveis de HDL e dependem das velocidades de secreção e de remoção dessas partículas. No hipertireoidismo experimental ocorre um aumento de RNAm de apoAI e diminuição de RNAm de apoAII (VANDERBROUCK, *et. al.*, 1995; MOORADIAN, *et. al.*, 1996; STROBL, *et. al.*, 1992), porém a secreção de apoAI não está aumentada em células hepáticas estimuladas por hormônios da tireóide (VANDERBROUCK, *et. al.*, 1995). A secreção intestinal de apoAI para a linfa está aumentada em ratos hipertireoideos (WILCOX, *et. al.*, 1988).

Encontramos uma redução dos níveis plasmáticos de HDL-colesterol nos camundongos transgênicos hipertireoideos e nenhuma variação nos hipotireoideos. Diferentemente dos pacientes hipertireoideos e dos camundongos transgênicos para CETP, ratos nos quais foi induzido hipertireoidismo exibem hiperalfalipoproteinemia (HEIMBERG, *et. al.*, 1985). Um fator importante que afeta os níveis de HDL está ausente nos ratos e presente nos seres humanos e nos camundongos transgênicos, a CETP. Essa proteína pode ser, pelo menos

parcialmente, responsável pela resposta diferencial entre ratos e pacientes hipertireoideos, como veremos a seguir. Como dissemos anteriormente, a atividade da CETP tem sido inversamente correlacionada à concentração de HDL-colesterol (TATO, *et. al.*, 1995; TALL, *et. al.*, 1987). Nesse trabalho, verificamos que a atividade da CETP é regulada positivamente pelos hormônios da tireóide, isto é, houve um aumento de cerca de 2 vezes na atividade da CETP no plasma dos transgênicos hipertireoideos, enquanto que nenhuma variação dessa foi detectada no plasma dos hipotireoideos. O ensaio isotópico utilizado para medir a atividade da CETP é indicativo da quantidade (massa) da proteína no plasma. Dois estudos recentes sugerem variações na atividade da CETP frente à disfunção tireoideana (TAN, *et. al.*, 1998a; RITTER, *et. al.*, 1996). RITTER, *et al.*, 1996, mostraram que a atividade da CETP estava reduzida em mulheres com hipotireoidismo e que retornava aos níveis normais após tratamento por reposição hormonal. TAN, *et al.* (1998a), também estudando mulheres, mostraram que a atividade da CETP estava aumentada nas pacientes com hipertireoidismo e diminuída naquelas com hipotireoidismo, e que, essas variações foram corrigidas quando os níveis hormonais normalizaram-se. Nossos resultados do grupo hipertireoideo estão de acordo com os obtidos por TAN *et al.*. No entanto, não encontramos as variações opostas esperadas no grupo hipotireoideo. Muitos fatores podem ter contribuído para isso, tais como, tipo, grau e duração do estado hipotireoideo, além da diferença na espécie estudada. Nos dois trabalhos mencionados acima, foram estudadas mulheres com hipotireoidismo por doença autoimune, tireoidectomia parcial, terapia com iodo radioativo e cretinismo.

Outro processo que poderia explicar a redução dos níveis plasmáticos de

HDL dos animais hipertireoideos seria uma velocidade aumentada de sua remoção plasmática em consequência de sua captação pelos tecidos, seja diretamente do colesterol da HDL ou indiretamente do colesterol que foi transferido da HDL para as lipoproteínas que contém apoB. De fato, verificamos que a taxa fracional de remoção plasmática da HDL dos hipertireoideos foi o dobro da dos controles. Também verificamos que a captação do colesterol da HDL estava significativamente aumentada no músculo esquelético dos transgênicos hipertireoideos. Como a massa muscular total é bastante grande, cerca de 45% do peso corpóreo, esse processo certamente repercute na concentração plasmática de colesterol de HDL. Houve também redução da captação do colesterol de HDL pelo intestino e baço. O significado fisiológico desse achado não é claro. No entanto, como foi descrito anteriormente um aumento da esterificação do colesterol intestinal (FIELD, *et al.*, 1986) em animais hipertireoideos, poderíamos especular que a redução da captação de CE de HDL encontrada no intestino dos transgênicos hipertireoideos deveu-se ao gradiente de concentração de CE entre HDL e enterócito ser desfavorável nessa condição. Quanto ao estado de hipotireoidismo, nenhuma alteração da taxa fracional de remoção plasmática e da captação tecidual da HDL era esperada, já que a concentração plasmática da HDL não variou nesse estado. Entre os 11 tecidos estudados, apenas no intestino dos animais hipotireoideos foi observada uma captação de colesterol de HDL reduzida. Interessante notar que nesse órgão houve redução da captação de HDL tanto no hiper como no hipotireoidismo.

Vários trabalhos (VALDEMARSSON *et al.*, 1983, 1984; HANSSON *et al.*, 1983; TAN *et al.*, 1998b) descreveram que a lipase hepática encontra-se elevada

em pacientes hipertireoideos e diminuída em hipotireoideos, sendo essas variações inversamente correlacionadas com as variações dos níveis de colesterol da HDL (TAN, *et. al.*, 1998b). Nos camundongos transgênicos para CETP hipertireoideos verificamos uma diminuição discreta, porém significativa, da atividade da LH. Nos seres humanos, as lipases, lipoprotéicas e hepática, encontram-se ligadas aos proteoglicanos de heparan sulfato dos capilares, enquanto nos ratos e camundongos essas encontram-se livres na circulação. Isso pode ser confirmado pela semelhança da atividade da lipase hepática pré e pós-heparina (**Tab IX**). Assim, a regulação da atividade da lipase hepática no homem e no camundongo difere em pelo menos uma etapa, sua fixação ou não na parede endotelial. Isso poderia explicar as diferenças de resultados. Embora os mecanismos responsáveis pela alteração da atividade da lipase hepática no hipertireoidismo não sejam conhecidos, STAELS, *et al.*, (1990) mostraram que alterações da função tireoidiana em ratos, não modificam a expressão do gene da LH.

Em resumo, nossos resultados demonstram que a deficiência de hormônios da tireóide eleva a concentração de LDL no plasma e não modifica o metabolismo das HDL. Em contrapartida, o excesso de hormônios da tireóide provoca redução da concentração de HDL-colesterol, o que pode ser explicado por aumento da velocidade de remoção plasmática da HDL, por aumento da atividade da CETP e por aumento da captação muscular do colesterol da HDL. Se o aumento da atividade da CETP reflete um aumento da sua expressão gênica é ainda assunto a ser investigado.

CONCLUSÕES

1. O excesso de hormônios da tireóide causou aumento de triglicérides totais e de colesterol de VLDL e redução de colesterol da HDL no plasma.
2. A deficiência de hormônios da tireóide resultou em aumento da concentração de colesterol da fração de LDL plasmática.
3. O excesso de hormônios da tireóide aumentou a velocidade de remoção do colesterol da HDL do compartimento plasmático, como verificado pelo aumento da taxa fracional de remoção e diminuição do tempo médio de residência dessas partículas no plasma. Por outro lado, a deficiência de hormônios da tireóide não alterou a remoção plasmática da HDL.
4. O excesso de hormônios da tireóide estimulou a captação do colesterol da HDL pelo músculo esquelético e reduziu sua captação pelo intestino e baço. Por outro lado, a deficiência de hormônios da tireóide causou diminuição da captação do colesterol da HDL pelo intestino delgado.
5. O excesso de hormônios da tireóide produziu um aumento da atividade da proteína de transferência de colesterol éster no plasma. Essa não foi alterada pela deficiência destes hormônios.

6. No hipertireoidismo experimental não houve alteração da atividade da lipase hepática no estado basal e uma discreta, porém, significativa diminuição de sua atividade após o tratamento com heparina.

Em síntese, a deficiência de hormônios da tireóide eleva os níveis de LDL e não modifica o metabolismo das HDL em camundongos transgênicos para CETP. Por outro lado, o excesso de hormônios da tireóide modula o metabolismo da HDL, reduzindo sua concentração plasmática, o que pode ser explicado pelo aumento de sua velocidade de remoção plasmática; aumento da captação muscular e aumento da atividade da CETP.

ABSTRACT

Thyroid dysfunction produces multiple alterations on the plasma lipoprotein levels, including HDL. CETP and hepatic lipase (HL) are important factors that modulates HDL plasma levels. Thus, the effects of thyroid hormone on the HDL metabolism and CETP and LH activities was investigated in hypo and hyperthyroid CETP transgenic mice.

Transgenic mice were divided in 4 groups: hypo and hyperthyroid and their respective controls. The hyperthyroid plasma lipoprotein profile showed significant increase in the VLDL fraction and decrease in HDL fraction. In the hypothyroid animals an increase in LDL fraction was observed. ^3H -cholesteryl ether-HDL kinetic studies showed that plasma fractional catabolic rate was approximately 2 fold greater in hyperthyroid animals than in controls ($p < 0.001$) while it did not change in hypothyroid animals. CETP activity was measured as cholesteryl ester transfer from HDL to LDL. Hyperthyroid animals had twice as much plasma CETP activity as compared to their controls, while in hypothyroid animals plasma CETP activity did not change. LH activity was measured in hyperthyroid animals. There was a modest but significant ($p=0,05$) reduction of LH activity in these animals. Tissue uptake of HDL cholesteryl ether (Cet) was examined in eleven tissues. Hyperthyroid mice exhibited a significant increase in skeletal muscle HDL-Cet uptake ($p < 0,02$) and decrease in small intestine ($p < 0,01$) and spleen ($p < 0,05$). Hypothyroid animals showed a decrease in small intestine HDL-Cet uptake ($p < 0,04$). In conclusion, the decrease in HDL levels found in hyperthyroid animals can be explained by an increase in HDL plasma removal rate, muscle uptake and plasma CETP activity. However, hypothyroid status did not change HDL metabolism.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, S.; RIGOTTI, A.; LANDSCHULZ, K.T.; XU, S.; HOBBS, H.H.; KRIEGER, M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. **Science**, **271**: 518-20, 1996.
- AGDPA, D.; MACARON, C.; MALLIK, T.; SCHNUDA, N.D.; Plasma high density lipoprotein cholesterol concentration in thyroid disease. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, **49**: 726-29, 1979.
- AGELLON, L.B.; WALSH, A.; HAYEK, T.; *et al.* Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. **J. Biol. Chem.**, **266**: 10796-801, 1991.
- BAMBERGER, M.; LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M.C.; *et al.* Mechanism of the hepatic lipase induced accumulation of high-density lipoprotein cholesterol by cells in culture. **Biochemistry**, **24**: 3693-701, 1985.
- BARTER, P.J.; and RYE, K.A. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. **Curr. Opin. Lipidology**, **7**: 82-7, 1996.
- BEISIEGEL, U. Lipoprotein metabolism. **Eur. Heart Journal**, **19** (suplement A): A20-A23, 1998.
- BIHAIN, B.E. & YEN, F.T. The lipolysis stimulated receptor: a gene at last. **Curr. Opin. Lipidology**, **9**: 221-224, 1998.
- BISGAIER, C.L.; GLICKMAN, R.M. Intestinal synthesis, secretion, and transport of lipoproteins. **Ann. Rev. Physiol.**, **45**: 625-36, 1983.

- BRENT, G.A. The molecular basis of thyroid hormone action. **N. Engl. J. Med.**, **331**: 847-53, 1994.
- BROWN, M.S.; KOVANEN, P.T.; GOLDSTEIN J.L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. **Science**, **212**: 628-35, 1981.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, **232**: 34-47, 1987.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, **343**: 425-30, 1990.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcriptional factor. **Cell** **89**: 331-40, 1997.
- CHAIT, A.; BIERMAN, E.L.; ALBERS, J.J. Regulatory role of triiodotironine in the degradation of low density lipoprotein by cultured human skin fibroblasts. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **48**: 887-89, 1979.
- COOPER, A.D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. **J. Lipid. Res.**, **38**: 2173-92, 1997.
- CROOK, D. & SEED, M. Endocrine control of plasma lipoprotein metabolism: effects of gonadal steroids. **Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.**, **4**: 851-75, 1990.
- DE LUISE, M & HARKER, M. Skeletal muscle metabolism effect of age, obesity, thyroid and nutritional status. **Horm. Met. Res.** **21**:410-15, 1989

- DOYLE, J.T.; HESLIN, A.S.; HILLEBOE, H.E.; FORMEL, P.F.; KORNS, R.F. A prospective study of degenerative cardiovascular disease in Albany: early diagnosis of ischemic heart disease. **N. Engl. J. Med.**, **261**: 1096, 1959.
- EHNHOLM, C.; KUUSI, T. Preparation, characterization and mensurement of hepatic lipase. **Methods Enzymol.**, **129**: 716-38, 1986.
- EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **J. Lipid Res.**, **25**: 1017-58, 1984.
- FIELD, F.J.; ALBRIGHT, E.; MATHUR, S.N. The effect of hypothyroidism and thyroxine replacement on hepatic and intestinal HMG-CoA reductase and ACAT activities and biliary lipids in the rat. **Metabolism**, **35**: 1085-89, 1986.
- FIELDING, C.J.; FIELDING, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **J. Lipid Res.**, **36**: 211-28, 1995.
- FIELDING, P.E. & FIELDING, C.J. Dynamics of lipoproteins transport in the circulatory system. In: **BIOCHEMISTRY of lipid, lipoproteins and membranes**. Ed. D.E. Vance & J. Vance, New York, Elsevier, p. 427-29, 1991.
- FRIIS, T.; PEDERSEN, L.R. Serum lipids in hyper - and hypothyroidism before and after treatment. **Clin. Chim. Acta**, **162**: 155-63, 1987.
- GARCIA, R.C. & OLIVEIRA, H.C.: Fisiologia das Lipoproteínas: **Colesterol e Aterosclerose** in QUINTÃO, E.C.R. (Ed.), Qualitymark, RJ, 1992, p. 01-30.
- GILLET, M.P.; COSTA, E.M.; OWEN, J.S. The phospholipase activities present in preheparin mouse plasma are inhibited by antiserum to hepatic lipase. **Biochim. Biophys. Acta**, **617**: 237-44, 1980.

- GLOMSET, J.A.; The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. **J. Lipid Res.**, **9**: 155-67, 1968.
- GOTTO, JR.; A.M.; POWNALL, H.J.; HAVEL, R.J. Introduction to the plasma lipoproteins. **Methods. Enzymol.**, **128**: 3-41, 1986.
- HA, Y.C. & BARTER, P.J. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. **Comp. Biochem. Physiol.**, **71B**: 265-9, 1982.
- HANSON, P.; JENSEN, E.; FLOREM, C.H. *et al.*: Thyroid hormones stimulate the release of hepatic lipase from cultured rat hepatocytes. **Horm. Metab. Res.** **18**: 107-9, 1986.
- HAVEL, R.J.; EDER, H.A.; BRAGDON, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **J. Clin. Invest.**, **34**:1345-53, 1955.
- HAVEL, R.J. Functional activities of hepatic lipoprotein receptors. **Ann. Rev. Physiol.**, **48**: 119-34, 1986.
- HAYEK, T.; MASUCCI-MAGOULAS, L.; JIANG, X.; WALSH, A.; RUBIN, E.; BRESLOW, J.L.; TALL, A.R. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. **J. Clin. Invest.**, **96**: 2071-74, 1995.
- HEIMBERG, M.; OLUBADEWO J.O.; WILCOX H.G. Plasma lipoproteins and regulation of hepatic metabolism of fatty acids in altered thyroid states. **Endocr Rev.**, **6(4)**: 590-607, 1985.

- HERZ, J.; HAMANN, U.; ROGNE, S.; MYKLEBOST, O.; GANSEPOHL, H.; STANLEY, K.K.; Surface location and high affinity for calcium of a 500-KD liver membrane protein related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. **EMBO J.** **7**: 4119-27, 1988.
- INAZU, A.; BROWN, C.B.; HESLER, C.B. *et al.* Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. **N. Engl. J. Med.**, **323**: 1234-38, 1990.
- JIANG, X.C.; MOULIN, P.; QUINET, E.; *et al.* Mammalian adipose tissue, and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. **J. Biol. Chem.**, **266**: 4631-39, 1991.
- JIANG, X.C.; AGELLON, L.B.; WALSH, A.; *et al.* Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. **J. Clin. Invest.**, **90**: 1290-95, 1992.
- JIAO, S.; COLE, T.G.; KITCHENS, R.T.; PFLEGER, B.; SCHONFELD, G. Genetic heterogeneity of lipoproteins in inbred strains of mice: analysis by gel-permeation chromatography. **Metab. Clin. Exp.**, **39**: 155-60, 1990.
- JOKINEN, E.V.; LANDSCHULZ, K.T.; WYNE, K.L.; HO, Y.K.; FRYKMAN, P.K.; HOBBS, H.H. Regulation of the very low density lipoprotein receptor by thyroid hormone in rat skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, **269**(42): 26411 - 26418, 1994.
- KANNEL, W.B.; DAWBER, T.R.; KAGAN, A.; REVOTSKIE, N.; STOKES, J. Factors of risk in the development of coronary heart disease - six year follow-up experience - the Framingham Study. **Ann. Int. Med.**, **55**: 33, 1961.

- KIM, D-H.; LIJIMA, H.; GOTO K.; SAKAI, J.; ISHI, H.; KIM H-J.; SUZUKI H.; KONDO, H.; SAEKI, S.; YAMAMOTO, Y. Human apolipoprotein E receptor 2. **J. Biol. Chem.**, **271**: 8373 - 8380, 1996.
- KRIEGER, M. The "best" of cholesterol, the "worst" of cholesterol: a tale of two receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **95**: 4077- 4080, 1998.
- KUNITAKE, S.T.; MENDEL, C.M.; HENNESSY, L.K.. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. **J. Lipid Res.**, **33**: 1807-16, 1992.
- LANDSCHULZ, K.T.; PATHAK, R.K.; RIGOTTI, A.; KRIEGER, M.; HOBBS, H.H. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. **J Clin Invest.** **98**: 984-95, 1996 .
- MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, **240**: 622-30, 1998.
- MARCUS, A.J.; and HAJJAR, D.P. Vascular transcellular signaling. **J. Lipid. Res.**, **34**: 2017 - 2031, 1993.
- MAROTTI, K.R.; CASTLE, C.K.; BOYLE, T.P.; *et al.* Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. **Nature (Lond.)** **364**: 73- 75, 1993.
- MARTIN, L.J.; CONNELLY, P.W.; NANCOO, D. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein and high density lipoprotein responses to cholesterol feeding in men: relationship to apolipoprotein E genotype. **J. Lipid Res.**, **34**: 437-46, 1993.

- MASUCCI-MAGOULAS, L.; MOULIN, P.; JIANG, X.C.; RICHARDSON, H.; WALSH, A.M.; BRESLOW, J.L.; TALL, A.R. Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolyssaccharide administration in human CETP transgenic mice. **J. Clin. Invest.**, **95**: 1587-94, 1995.
- MASUCCI-MAGOULAS, L.; PLUMP, A. JIANG, X.C.; WALSH, A.; BRESLOW, J.L.; TALL, A.R.; Profound induction of hepatic cholesteryl ester transfer protein transgene expression in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene knockout mice. A novel mechanism signals changes in plasma cholesterol levels. **J. Clin. Invest.**, **97**: 154-61, 1996.
- MOORADIAN, A.D.; WONG, N.G.; SAHAH, G.N. Age-related changes in the responsiveness of apolipoprotein AI to thyroid hormone. **Am. J. Physiol.**, **271**: R1602-7, 1996.
- MOTOMURA, K.; BRENT, G.A.; Mechanisms of thyroid hormone action. **End. Metab. Clin. North America** **27**: 1-23, 1998.
- MOULIN, P.; APPEL, G.B.; GINSBERG, H.N.; TALL, A.R. Increased concentration of plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome: role in dyslipidemia. **J. Lipid. Res.**, **33**:1817-22, 1992.
- MULS, E.; BLATON, V.; ROSSENEU, M. *et al.* Serum lipids and lipoproteins A-I, A-II, and B in hyperthyroidism before and after treatment. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **55**: 459-64, 1982.
- MULS, E.; ROSSENEU, M.; BURY, J.; STUL, M.; LAMBERIGTS, G.; DE MOOR, P. Hyperthyroidism influences the distribution and apolipoprotein A composition of the high density lipoproteins in man. **J. Clin. endocrinol Metab.**, **61**: 882-89, 1985.

- MULS, E.; RUSSENEU, M.; BLANTON, V.; *et al.* Serum lipids and apolipoprotein A-I, A-II and B in primary hypothyroidism before and during treatment. **Eur. J. Clin. Invest.**, **14**: 12-5, 1984.
- MURASE, T.; UCHIMURA, H. A selective decline of postheparin plasma hepatic triglyceride lipase in hypothyroid rats. **Metabolism**, **29**: 797-801, 1980.
- NESS, G.C. Thyroid hormone. Basis for its hypocholesterolemic effect. **J. Fla. Med. Assoc.** **78**: 383-85, 1991.
- NESS, G.C.; LOPEZ, D.; CHAMBERS, C.M.; NEWSOME, W.P.; CORNELIUS, P.; LONG, C.A.; HARWOOD, H.J. JR. Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression. **Biochem. Pharmacol.**, **56**: 121-29 1998.
- NIEMEIER, A.; GAFVELS, M.; HEERER, J.; MEYER, N.; ANGELIN B.; BEISIEGEL, U. VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. **J. Lipid. Res.**, **37**: 1733 - 1742, 1996.
- NIKKILA, E.A. & KEKKI, M. Plasma triglyceride metabolism in thyroid disease. **J. Clin. Invest.**, **51**: 2103-2114, 1972.
- NISHITANI, H.; OKAMURA, K.; NOGUCHI, S.; INOUE, K.; MOROTOMI, Y.; FUJISHIMA, M.; Serum lipid levels in thyroid dysfunction with special reference to transient elevation treatment in hyperthyroidism Graves' disease. **Horm. Metabol. Res.**, **22**: 490-493, 1990.

- O'BRIEN, T.; KATZ, K.; HODGE, D.; NGUYEN, T.T.; KOTTKE, B.A.; HAY, I.D.;
The effect of the treatment of hypothyroidism and hyperthyroidism on plasma lipids and apolipoproteins AI, AII and E. **Clin. Endocrinol (Oxf)** **46**: 17 - 20, 1997.
- OLIVEIRA, H.C. & QUINTÃO, E.C.R. "*In vitro*" cholesteryl ester bidirectional flow between high-density lipoproteins and triglyceride rich emulsions. Effects of particle concentration and composition, cholesteryl ester transfer activity and oleic acid. **J. Biochem. Biophys. Methods**, **32**: 45-57, 1996.
- OLIVEIRA, H.C.F.; CHOUINARD, R.A.; AGELLON, L.B. *et al.* Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. **J. Biol. Chem.**, **271**: 31831-38, 1996.
- OLUBADEWO, J.; WILCOX, H.G.; HEIMBERG, M. Modulation by glycerol of hepatic glycerol-3-phosphate concentration, ketogenesis, and output of triglyceride and glucose in perfused livers from hyperthyroid and euthyroid rats. **J. Biol. Chem.**, **259**: 8857 - 8862, 1984.
- PATSCH, J.R.; GOTTO, A.M.; OLIVECRONA, T.; *et al.* Formation of high density lipoprotein2-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **75**: 4519-23, 1978.
- PETERSON, J.; BENGTSSON-OLIVECRONA, G.; OLIVECRONA, T. Mouse preheparin plasma contains high levels of hepatic lipase with low affinity for heparin. **Biochim. Biophys. Acta**, **878**: 65-70, 1986.
- QUINTÃO, E.C.R. Hiperlipidemias: Etiologia In: **Colesterol e Aterosclerose**, Quintão ECR (Ed.), Qualitymark, RJ, 1992, p. 71-123.

- QUINTÃO, E.C.R; OLIVEIRA, H.C.F; ZERBINATTI, C.V. Apoproteínas plasmáticas e aterosclerose. **Rev. Bras. Med.**, **46**: 66-71, 1989.
- REDGRAVE, T.G. Formation and metabolism of chylomicrons. **Int. Rev. Physiol.**, **28**: 103-30, 1983.
- RIGOTTI, A.; EDELMAN ER; SEIFERT, P.; IQBAL, S.N.; DEMATTOS, R.B.; TEMEL, R.E.; KRIEGER, M.; WILLIAMS, D.L.. Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. **J. Biol. Chem.**, **271**: 33545-49, 1996.
- RITTER, M.C.; KANNAN, C.R.; BAGDADE, J.D. The effects of hypothyroidism and replacement therapy on cholesteryl ester transfer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**: 797-800, 1996.
- ROMMEY, J.S.; CHAN, J.; CARR, F.E. *et al.* Identification of the thyroid hormone-responsive messenger RNA spot 11 as apolipoprotein-A1 messenger RNA and effects of the hormone on the promoter. **Mol. Endocrinol.**, **6**: 943-50, 1992.
- ROS, M.; NORTHUP, J.K.; MALBON, C.C.; Steady-state levels of G-protein and β -adrenergic receptors in rat fat cells. Permissive effects of thyroid hormones. **J. Biol. Chem.**, **263**: 4362-68.
- ROSSNER, S. & ROSENQUIVIST, U. Serum lipoproteins and the intravenous fat tolerance test in hypothyroid patients before and during substitution therapy. **Atherosclerosis**, **20**: 365-81, 1974.

- SALTER, A.M.; HAYASHI, R.; AL-SEENI, M.; BROWN, N.F.; BRUCE, J.; SORENSEN, O.; ATKINSON, E.A.; MIDDLETON, B.; BLEACKLEY, C.; BRINDLEY, D.N. Effects of hypothyroidism and high-fat feeding on mRNA concentrations for the low-density-lipoprotein receptor and on acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activities in rat liver. **Biochem. J.**, **276**: 825-832, 1991.
- SAMUELS, H.H.; FORMAN, B.M.; HOROWITZ, Z.D. Regulation of gene expression by thyroid hormone. **J. Clin. Invest.** **81**: 957-67, 1988.
- SCARABOTTOLO, L.; TREZI, E.; ROME, P. and CATAPANO, A.L.; Experimental hypothyroidism modulates the expression of low density lipoprotein receptor by the liver. **Atherosclerosis**, **59**: 329 - 333, 1986.
- SCHNEIDER, W.J.; NIMPF, J.; BUJO, H. Novel members of the low density lipoprotein receptor superfamily and their potencial roles in lipid metabolism. **Curr. Opin. Lipidology.**, **8**: 315-19, 1997.
- SMALL, D.M.; SHIPLEY, GG. Physical - chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis. **Science**, **185**: 222-229, 1974.
- SOYAL, S.M.; SEELOS, C.; LIN-LEE, Y.C. *et al.* Thyroid hormone influences the maturation of apolipoprotein A-I messenger RNA in rat liver. **J. Biol. Chem.**, **270**: 3996-4004, 1995.
- STAELS, B.; VAN TOL, A.; CHAN, L. *et al.* Alterations in thyroid status modulate apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. **Endocrinology**, **127**: 1144-52, 1990.

- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol - modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N. Eng. J. Med.**, **320**: 915-24, 1989.
- STROBL, W, GORDER, N.L.; LIN, L.Y. *et al.* Role of thyroid hormones in apolipoprotein A-I gene expression in rat liver. **J. Clin. Invest.**, **85**: 659-667, 1990.
- STROBL, W.; CHAN, L.; PATSH, W.; Differential regulation of hepatic apolipoprotein AI and AII gene expression by thyroid hormone in rat liver. **Atherosclerosis**, **97**: 161-70, 1992.
- SZANTO, A.; BALASUBRAMANIAM, S.; ROACH, P.D.; NESTEL, P.J. Modulation of the low-density-lipoprotein-receptor-related protein and its relevance to chylomicron-remnant metabolism. **Biochem. J.**, **15**: 791-4, 1992.
- TAI, M.M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. **Diabetes Care**, **17**: 152-154, 1994.
- TALL, A.R.; GREEN, P.H.R, GLIKMAN, R.M. Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. **J. Clin. Invest.**, **64**: 977-989, 1979.
- TALL, A.R.; GRANOT, E.; TABAS, I. *et al.* Accelerated transfer of cholesteryl ester in dyslipidemic plasma. Role of cholesteryl ester transfer protein. **J. Clin. Invest.**, **79**: 1217-25, 1987.
- TALL, A.R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. **J. Lip. Res.**, **34**: 1255-74, 1993.
- TALL, A.R. Plasma lipid transfer proteins. **Ann. Rev. Biochem.**, **64**: 235-237, 1995.

- TAN, K.C.B.; SHIU, S.W.M.; KUNG, W.C. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hyper- and hypothyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **83**:140-43, 1998a
- TAN, K.C.B.; SHIU, S.W.M.; KUNG, A.W.C. Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. **J. Clin. End. Met.**, **83**: 2921-24, 1998b.
- TATO, F.; VEGA, G.L.; TALL, A.R.; GRUNDY, S. Relation between cholesterol ester transfer protein activities and lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. **Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.**, **15**: 112-20, 1995.
- THOMPSON, G.R. SOUTAR, A.K.; SPENGEL, F.A.; *et al.* Defects of receptor-mediated low density lipoprotein catabolism in homozygous familial hypercholesterolemia and hypothyroidism in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **78**: 2591-95, 1981.
- VALDEMARSSON, S. Plasma lipoprotein alterations in thyroid dysfunction. Roles of lipoprotein lipase, hepatic lipase and LCAT. **Acta Endocrinol.**, **103(suppl 255)**: 1-52, 1983.
- VALDEMARSSON, S.; HEDNER, P.; NILSSON-EHLE, P. Treatment of hyperthyroidism: effects on hepatic lipase, lipoprotein lipase, LCAT and plasma lipoproteins. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **44**: 183-89, 1984.
- VANDENBROUCK, Y.; JANVIER, B.; LORIETTE, C. Thyroid hormone modulates apolipoprotein-AI gene expression at the post-transcriptional level in hep G2 cells. **Eur. J. Biochem.**, **231**: 126-32, 1995.

- VERDUGO, C.; PERROT, L.; PONSIN, G.; VALENTIN, C.; BERTHEZENE, F.;
Time-course of alterations of high density lipoproteins (HDL) during thyroxine
administration to hypothyroid women. **Eur. J. Clin. Invest.**, **17**: 313-16, 1987.
- WANG, N.; WENG, W.; BRESLOW, J.L.; TALL, A.R. Scavenger receptor BI (SR-
BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase
knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores. In vivo
evidence that SR-BI is a functional high density lipoprotein receptor under
feedback control. **J Biol Chem.**, **271**: 21001-04, 1996.
- WHITLOCK, M.E. SWENSON, T.L.; RAMAKRISHNAN, R. *et al.* Monoclonal
antibody inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity in the rabbit.
Effects on lipoprotein composition and high density lipoprotein cholesteryl ester
metabolism. **J. Clin. Invest.**, **84**: 129-37, 1989.
- WILCOX, H.G.; TSO, P.; HEIMBERG, M.; Stimulation of intestinal secretion of
apolipoprotein AI by triiodotironine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **153**:
606-11, 1988.
- WILCOX, H.G.; FRANK, R.A.; HEIMBERG, M. Effects of thyroid status and fasting
on hepatic metabolism of apolipoprotein A-I. **J. Lipid. Res.**, **32**: 395 - 405,
1991.
- ZERBINATTI, C.V.; OLIVEIRA, H.C.F.; WECHESLER, S.; QUINTÃO. Independent
regulation of chylomicron lipolysis and particle removal rates: effects of insulin
and thyroid hormones on the metabolism of artificial chylomicrons.
Metabolism, **40**: 1122-1127, 1991.

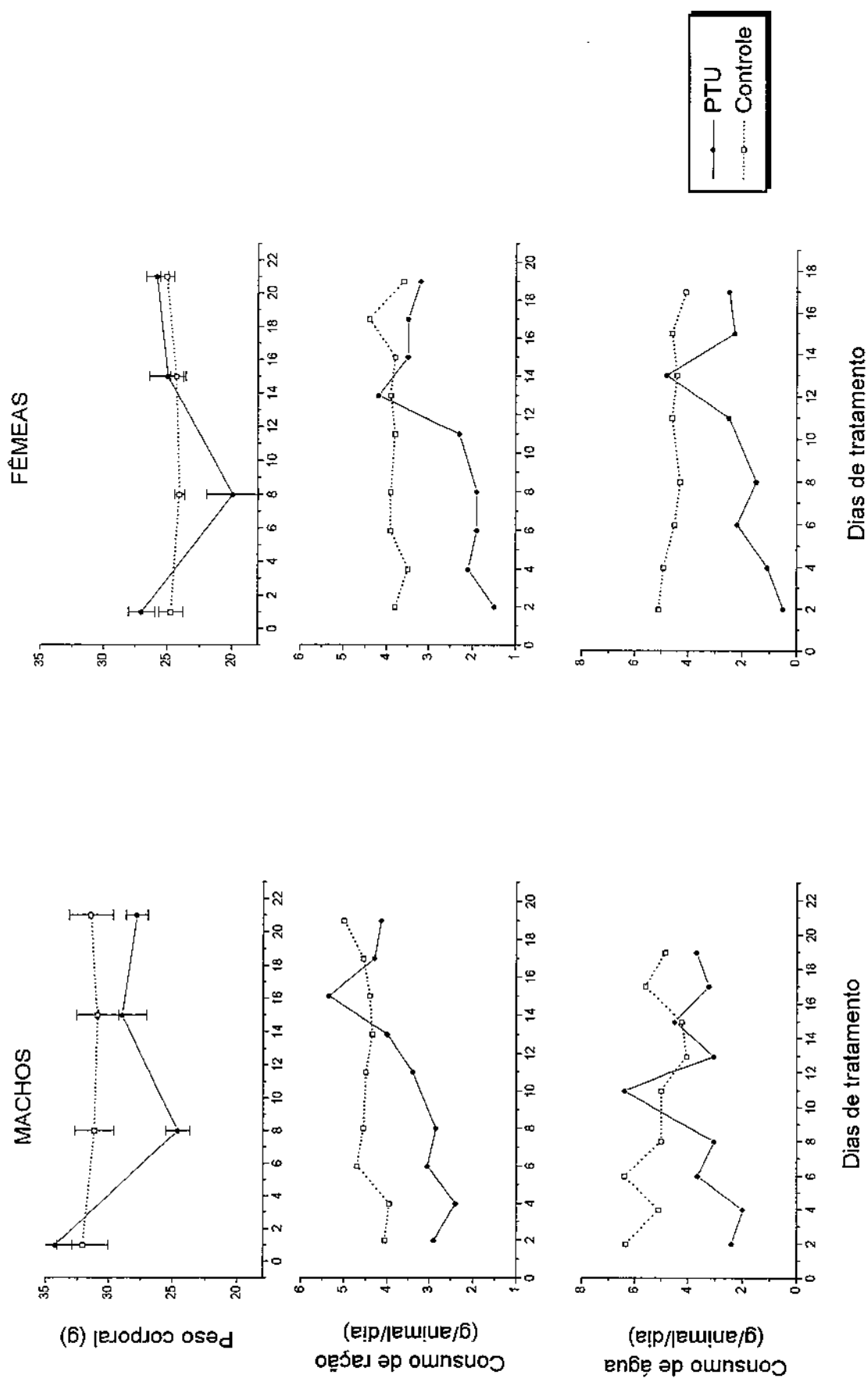


Fig. 1 - Evolução do peso corporal e do consumo de água e ração em camundongos transgênicos para CETP hipotireoideos tratados com propiltiuracil (PTU) na água de beber e controles.

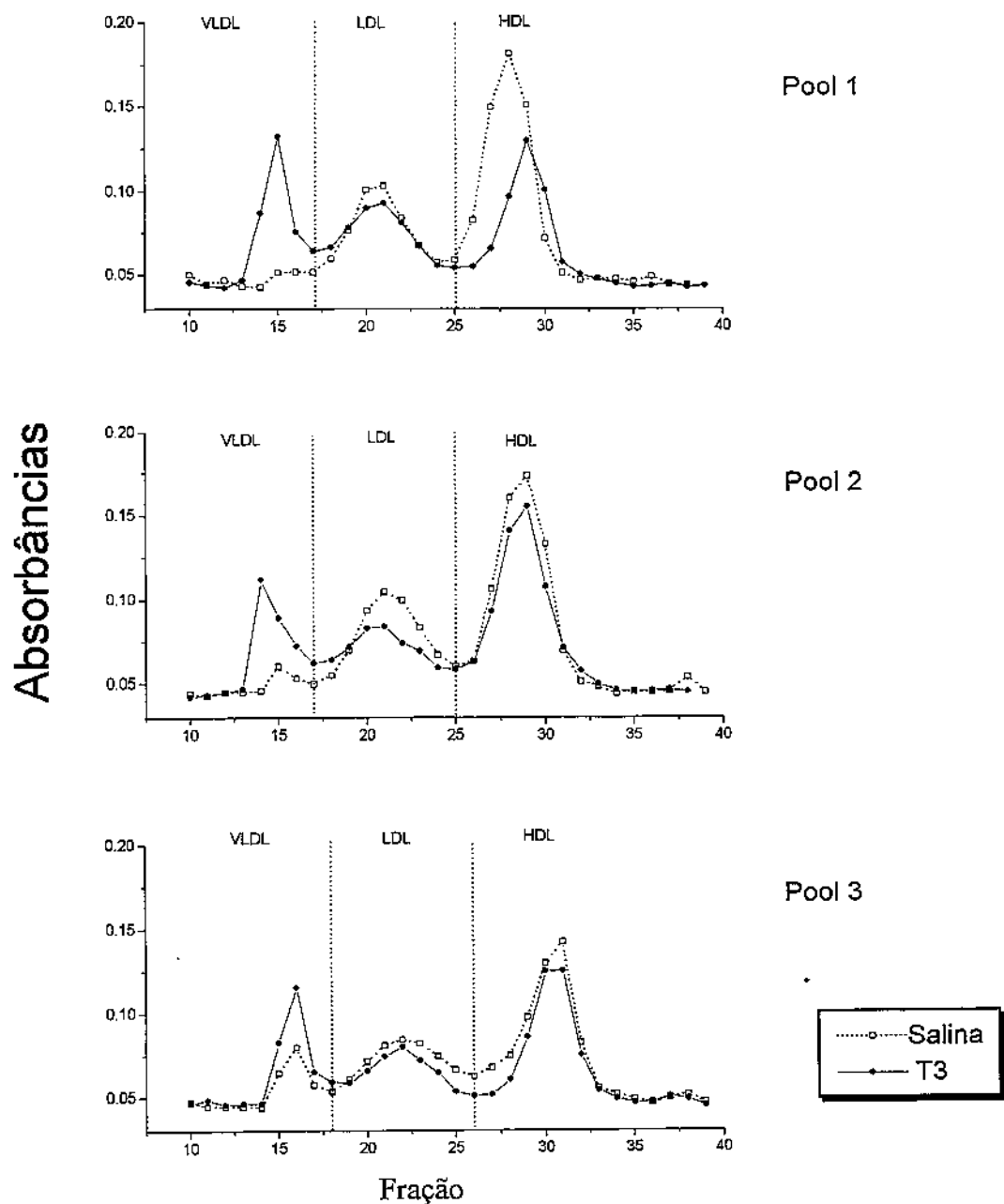


Fig. 2 - Distribuição do colesterol nas lipoproteínas de camundongos transgênicos para CETP tratados com T3 (hipertireoideos) ou salina (controles). "Pools" de plasma (3-5 animais) foram fracionados por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) usando coluna de superose 6. As posições nas quais as lipoproteínas conhecidas são eluídas da coluna estão indicadas. Pool 1: fêmeas; Pool 2 e 3: machos.

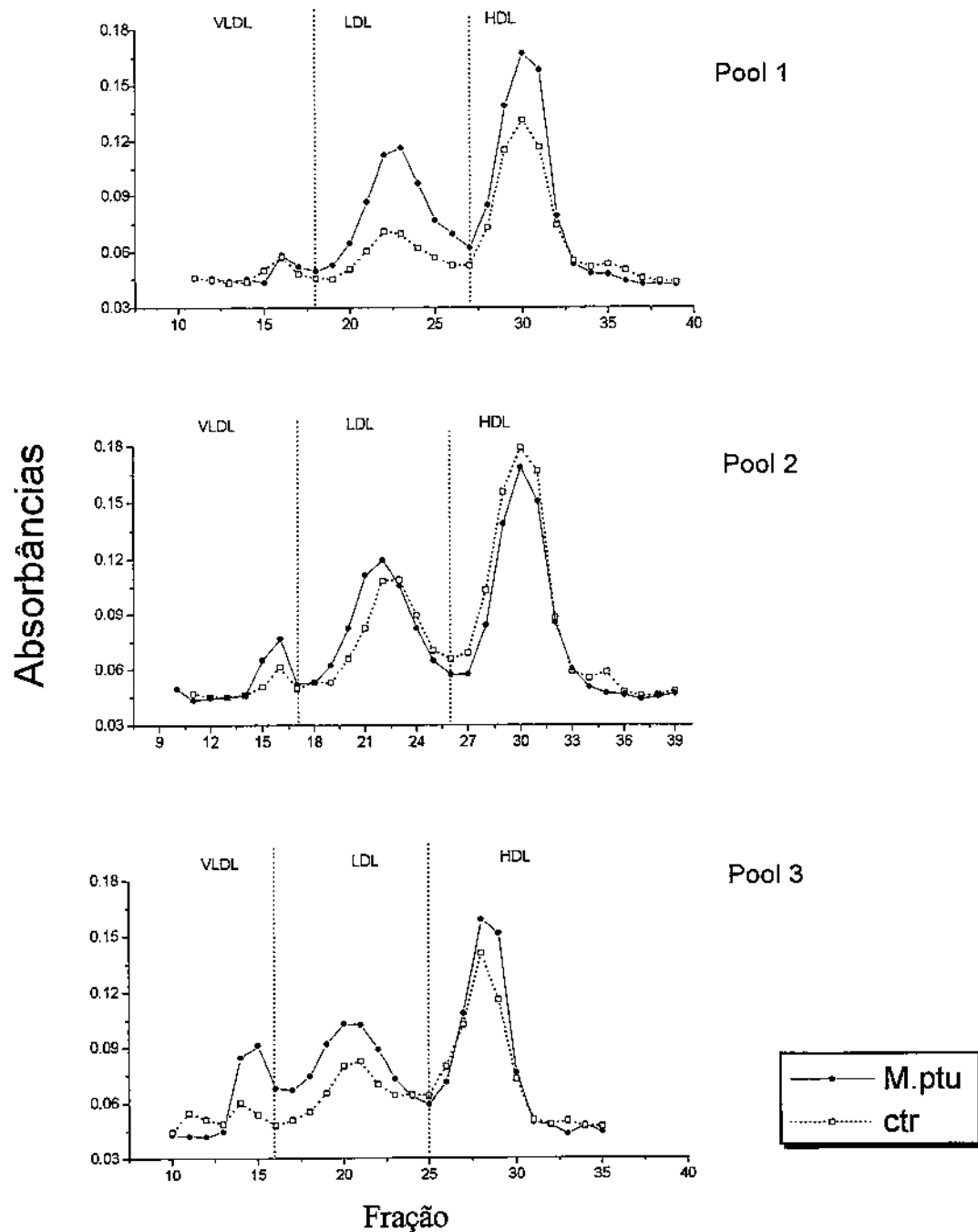


Fig. 3 - Distribuição do colesterol nas lipoproteínas plasmáticas de camundongos transgênicos para CETP tratados com Propiltiouracil (PTU) e controles. "Pools" de plasma (3-5 animais) foram fracionados por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) usando coluna de superose 6. As posições nas quais as lipoproteínas conhecidas são eluídas da coluna estão indicadas. Pool 1 : Fêmeas Pool 2 e 3: machos.

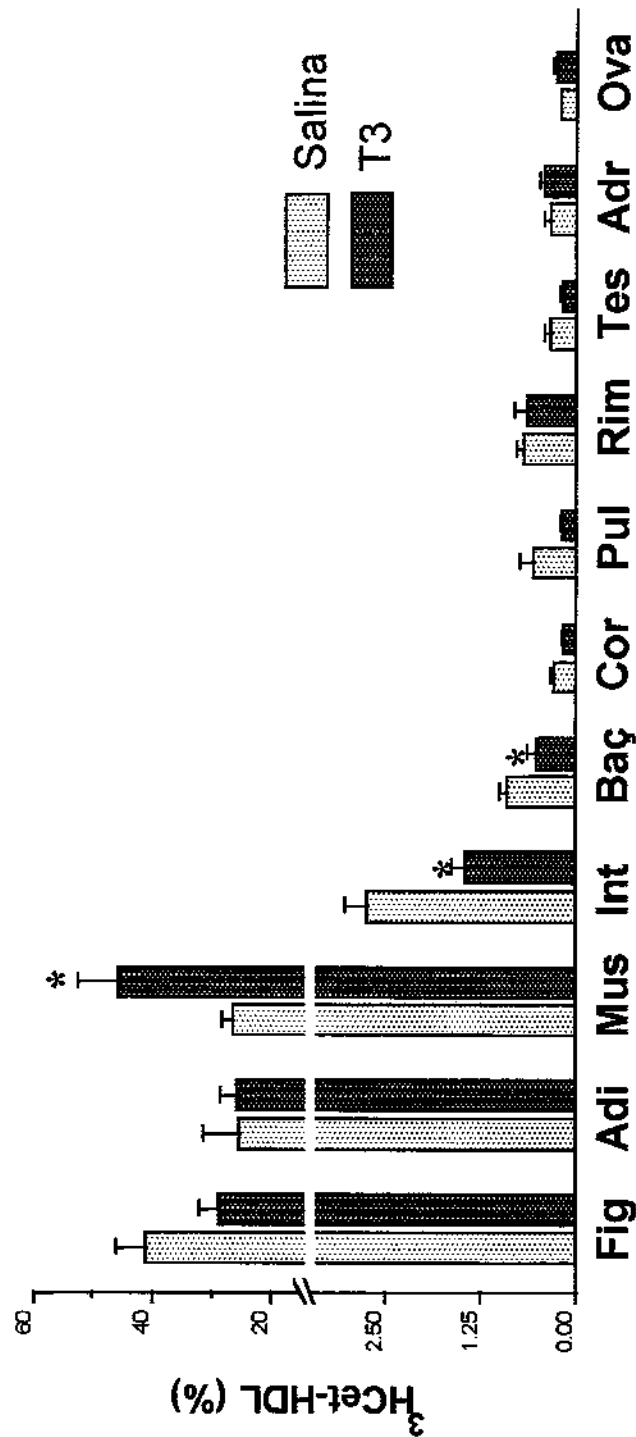


Fig. 4 - Distribuição percentual de ^3H Cet-HDL captado pelos tecidos de animais CETP transgênicos hipertireoideos (T3) e controles (salina). (Fig.: fígado; Adi.: tecido adiposo; Mus.: músculo; Int.: intestino delgado; Baç.: baço; Cor.: coração; Pul.: pulmão; Rim; Tes.: testículo; Adr.: Adrenais; Ova.: Ovários). * Mus. $p < 0,02$, Int. e Baç. $p < 0,05$

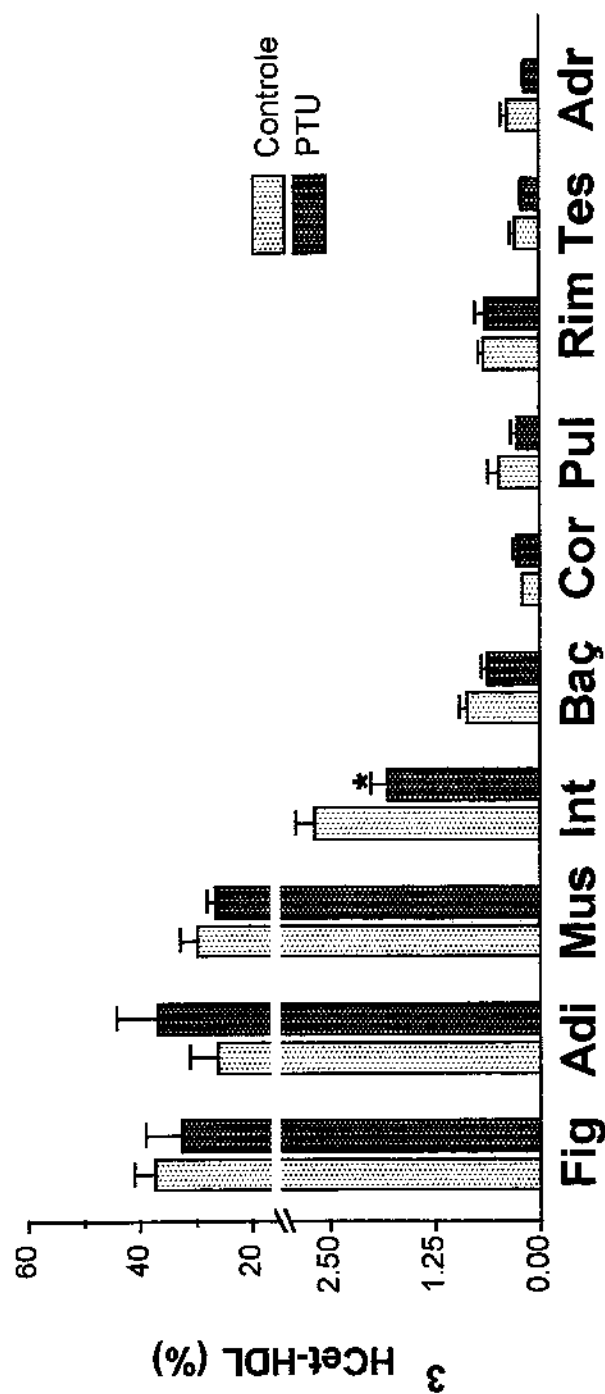


Fig. 5 - Distribuição percentual de ^3H Cet-HDL captado pelos tecidos de animais CETP transgênicos hipotireoideos (PTU) e controles.

(Fig.: fígado; Adi.: tecido adiposo; Mus.: músculo; Int.: intestino delgado; Baç.: baço; Cor.: coração; Pul.: pulmão; Rim; Tes.: testículo; Adr.: Adrenais; Ova.: Ovários).

* $p < 0,05$

Tab. I -Concentração de Tiroxina (T4) total em animais transgênicos para CETP tratados com triiodotironina (T3) e propiltiouracil (PTU).

	Tiroxina total (µg/dl)
Hipertireoideos (25µg/100g T3, I.P., 7 dias)	0,79 ± 0,05 *
Salina (0,1ml salina, I.P., 7 dias)	5,42 ± 0,8
Hipotireoideos (0,10% PTU, oral, 3 semanas)	2,8 ± 0,4 **
Controle (Água comum)	7,9 ± 1,1

* p = 0,00002, **p=0,0003

Tab II - Peso corporal e consumo de água e ração em animais transgênicos para CETP hipertireóides (tratados com T3) e controles (salina).

Grupo	Sexo	Peso (g)		diferença	Consumo Médio (g/animal/dia)	
		inicial	final		ração	água
T3	M	30,9±0,5 (6)	32,3±0,4 (6)	+ 1,4	6,5 ± 0,7* (4)	7,5±0,2 (6)*
Salina	M	32,2±0,9 (5)	31,3±0,7 (5)	- 0,9	4,0 ± 0,1 (4)	5,5±0,7 (4)
T3	F	26,6±0,8 (5)	25,9±0,4 (5)	- 0,7	5,0 ± 0,6 (3)	5,9± 0,6 (2)
Salina	F	24,9±1,0(3)	24,5±0,9 (3)	- 0,4	3,6 ± 0,1 (3)	6,3± 0,2 (3)

Média ± ep. Números entre parênteses correspondem ao número de animais nas colunas de peso ou número de medidas durante o tratamento nas colunas de consumo de ração e água.

* p=0,01, comparado à salina;

Tab. III - Peso corporal e consumo de água e ração em animais transgênicos para CETP hipotireoideos por tratamento com propiltiouracil (PTU) e controles.

Grupo	Sexo	Peso (g)		Diferença	Consumo Médio (g/animal/dia)	
		Inicial	Final		ração	água
PTU	M	33,6±1,2 (6)	27,7±0,6 (6) ^{a,b}	-5,9	3,6 ± 0,3 (9) ^c	3,5 ± 0,4 (9) ^e
Controle	M	32,2±0,7 (5)	31,7±0,7 (5)	-0,5	4,4 ± 0,1 (9)	5,2 ± 0,2 (9)
PTU	F	26,1±0,6 (4)	25,4±1,0 (4)	-0,4	2,7 ± 0,3 (9) ^d	2,1 ± 0,5 (8) ^f
Controle	F	24,7±0,9 (3)	25,0±0,6 (3)	+0,3	3,8 ± 0,1 (9)	4,6 ± 0,1 (8)

Média ± ep. Números entre parênteses correspondem ao número de animais nas colunas de peso

ou número de medidas durante o tratamento nas colunas de consumo de ração e água.

a - p=0,02, comparado ao peso inicial ;

b - p=0,003, comparado ao peso final do controle;

c - p=0,01, comparado ao controle M;

d - p=0,002 comparado ao controle F;

e - p=0,005 comparado ao controle M;

f - p= 0,05 comparado ao controle F.

Tab. IV - Parâmetros de função renal e hepática, e níveis de lipídeos no plasma de camundongos transgênicos para CETP, controles e tratados com triiodotironina (T3) ou propiltiouracil (PTU).

	Controle do T3 (n=4)	T3 (n=4)	Controle do PTU (n=7)	PTU (n=7)
Uréia (mg/dl)	54,3 ±4,57	47,8±2,1	74,4±8,0	58,4±3,2
Creatinina (mg/dl)	0,34±0,1	0,27±0,01*	0,35±0,02	0,32±0,03
AST (U/l)	78,5±10,0	104,5±26,5	261,1±60,4	390±81,7
ALT (U/l)	15,0±1,29	18,5±3,6	109,4±21,1	146,9±29,8
FALC (U/l)	129,8±21,5	379,8±48,9*	185,4±33,3	197,4±18,0
HDL-C (mg/dl)	40,3±3,3	19,5±2,6*	28,4±1,9	19,3±2,6*
Colesterol (mg/dl)	94,8±4,6	68,5±3,3*	75,1±7,0	65,0±7,1
TG (mg/dl)	74,3±9,5	235,8±37,4*	147,0±27,7	136,4±24,6
V+LDL(mg/dl)	54,5±1,9	49,0±5,1	46,7±5,9	45,7±7,1

Média ± ep, * p < 0,05 teste "t" de Student.

AST: : Aspartato-aminotransferase; ALT: : alanina-aminotransferase; FALC: : fosfatase alcalina; HDL-C: lipoproteína de alta densidade - colesterol; TG: triglicerídeos; V+LDL (VLDL+LDL) VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa e LDL lipoproteína de baixa densidade.

Tab. V: Distribuição percentual do colesterol nas frações lipoprotéicas plasmáticas de camundongos transgênicos para CETP tratados com T3 ou Salina.

		VLDL	LDL	HDL
T3	Pool 1 (fem.)	27,3	33,3	39,4
	Pool 2 (masc.)	24,7	30,4	44,9
	Pool 3 (masc.)	26,7	30,8	42,5
	Média ± ep	26,2±0,78*	31,5±0,91	42,3±1,59**
Salina	Pool 1 (fem.)	18,2	33,4	48,4
	Pool 2 (masc.)	18,2	33,5	48,3
	Pool 3 (masc.)	21,7	32,8	45,5
	Média ± ep	19,4±1,17	33,2±0,22	47,4±0,95

Calculado pela área sob os picos fracionados por FPLC (fig.4);

Teste "t" de Student: T3 vs. Salina: * p=0,008, ** p=0,05.

Tab. VI: Distribuição percentual do colesterol nas frações lipoprotéicas plasmáticas de camundongos transgênicos para CETP tratados com propitiouracil (PTU) e controles.

		VLDL	LDL	HDL
PTU	Pool 1 (fem.)	18,0	35,9	46,1
	Pool 2 (masc.)	19,2	34,4	46,4
	Pool 3 (masc.)	22,6	34,8	42,6
	Média ± ep	19,9±1,4	35,0±0,4*	45,0±1,2
Controle	Pool 1 (fem.)	21,0	28,7	50,3
	Pool 2 (masc.)	17,6	32,2	50,2
	Pool 3 (masc.)	21,8	32,3	45,9
	Pool 4 (fem.)	21,2	29,7	49,3
	Média ± ep	20,4±0,9	30,7±0,9	48,7±1,03

Calculado pela área sob os picos fracionados por FPLC (fig.5).

* p<0,01

Tab. VII: Remoção plasmática da HDL em camundongos transgênicos para CETP com hiper (tratados com T3) e hipotireoidismo (tratados com Propiltiouracil - PTU).

	Taxa Fracional de Remoção Plasmática \$	Tempo (h) de residência no plasma #
T3	0,131 ± 0,096	5,41 ± 0,54
Salina	0,070 ± 0,010	9,03 ± 1,03
p*	0,001	0,02
PTU	0,084 ± 0,096	8,16 ± 0,91
Controle	0,092 ± 0,007	7,64 ± 0,68
p	0,514	0,655

Média ± ep, n = 6 ou 7.

\$ Calculado como a inclinação da curva de desaparecimento da radioatividade no plasma (do pico máximo até 8 horas após a injeção) pelo ajuste de curva exponencial.

Calculado como área sob a curva normalizada da radioatividade no plasma durante as 24 horas após a injeção da HDL marcada.

* Teste "t" student.

Tab. VIII: Atividade da CETP no plasma de camundongos transgênicos para CETP com hiper e hipotireoidismo, tratados com T3 e Propiltiouracil (PTU), respectivamente.

Grupos	% de transferência CE
T3	47,6 ± 2,1 (9)
Salina	25,4 ± 3,0 (7)
p*	2.10 ⁻⁵
PTU	30,6 ± 1,7 (9)
Controle	33,5 ± 3,8 (8)
p	0,474
Média ± ep (n). *Teste "t" student	

Tab. IX: Concentrações de ácidos graxos livres (AGL), triglicerídeos (TG), e atividade da lipase hepática (LH) no plasma de camundongos transgênicos para CETP, controles e hipertireóides, pré e pós injeção de 100 U/Kg peso de heparina.

	Controle (salina)		Hipertireóides (T3)	
	Pré-heparina	Pós-heparina	Pré-heparina	Pós-heparina
AGL (mg/dL)	1,33 ± 0,17	1,16 ± 0,18	2,0 ± 0,21 ^a	1,7 ± 0,22 ^b
TG (mg/dL)	72,0 ± 10,3	72,3 ± 16,1	157,2 ± 13,6 ^c	113,6 ± 10,1 ^{d,e,f}
LH (nmol/ml/h)	1583,2 ± 184,9	1707,1 ± 222,4	1159,0 ± 114,8 ^g	1220,8 ± 93,3 ^h

Média ± ep, n = 7-9

a - p = 0,02, comparado com pré-heparina controle;

b - p = 0,02, comparado com pós-heparina controle;

c - p = 0,0004 comparado com pré-heparina controle;

d - p = 0,03, comparado com pré-heparina T3;

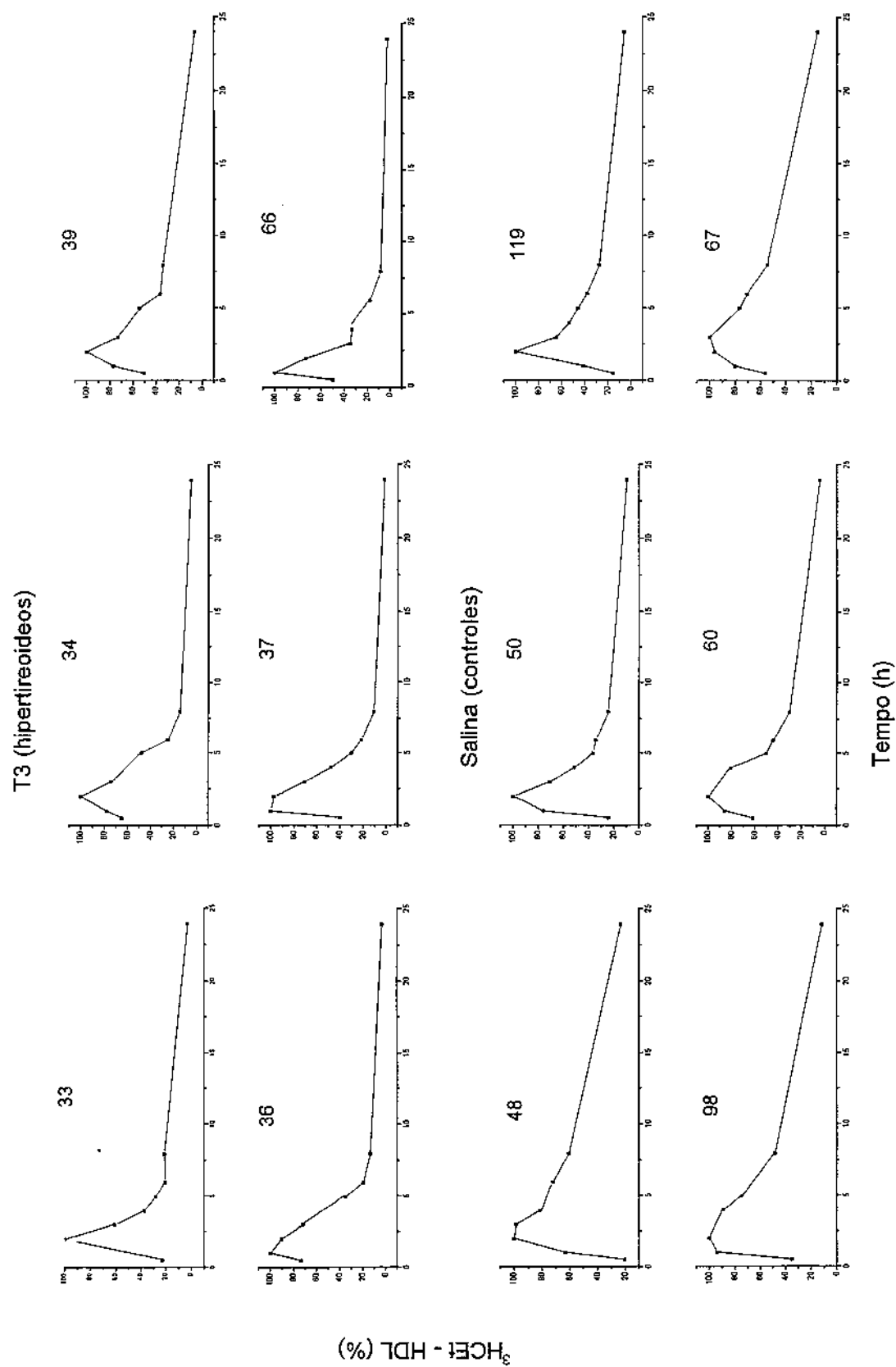
e - p = 0,01, comparado com pré-heparina controle;

f - p = 0,06, comparado com pós-heparina controle;

g - p = 0,06, comparado com pré-heparina controle e

h - p = 0,052, comparado com pós-heparina controle.

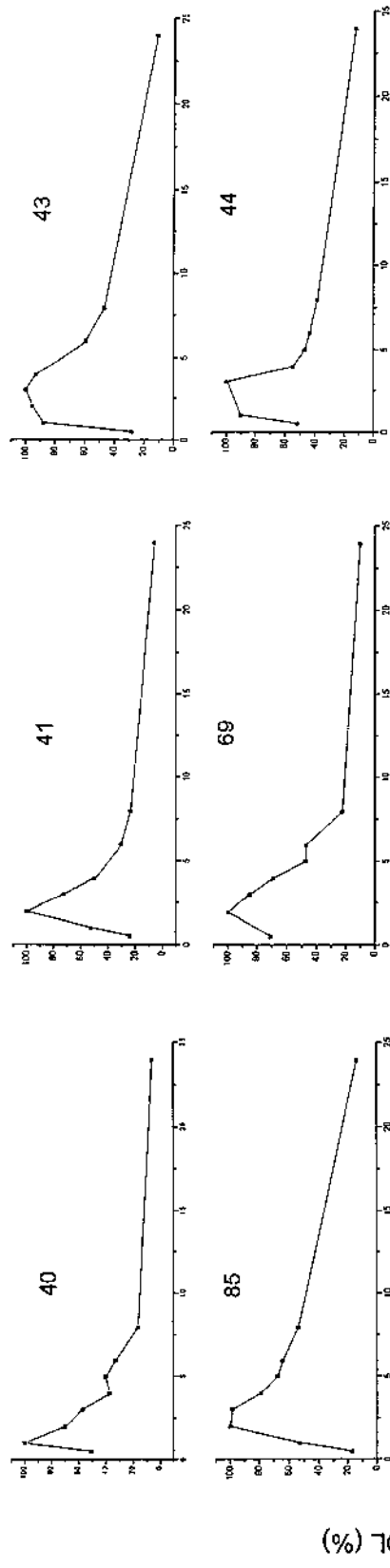
Anexo 1



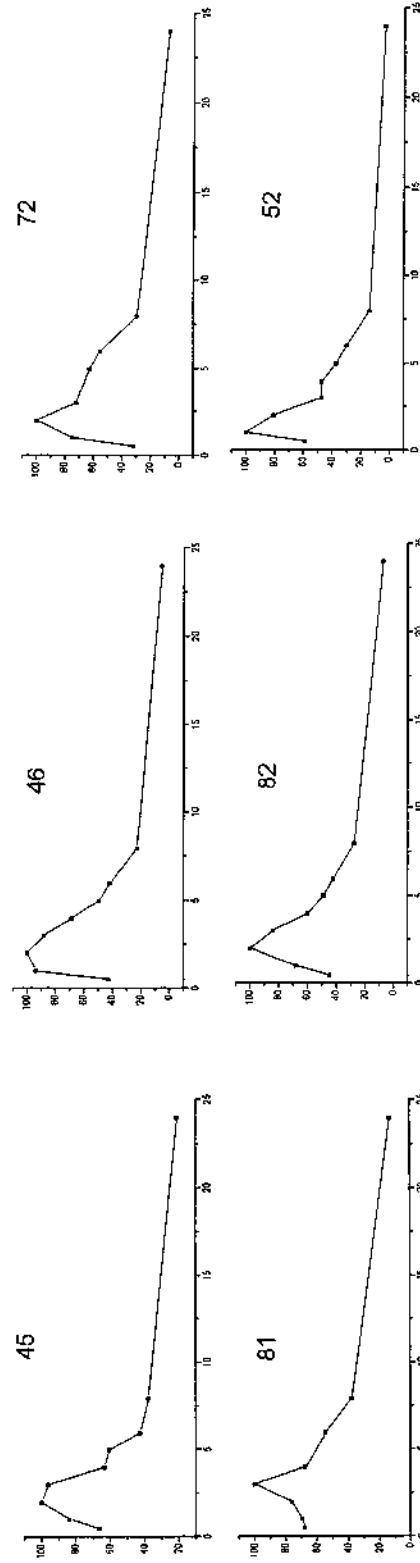
Curvas individuais de aparecimento e desaparecimento de radioatividade no plasma após a injeção intraperitoneal de HDL marcada com ³H colesterol éter em camundongos CETP transgênicos com hipertireoidismo (T3) e controles (salina). Os números acima de cada gráfico correspondem à identidade dos animais.

Anexo 2

PTU (Hipotireoideos)



Controles



Tempo (h)

Curvas individuais de aparecimento e desaparecimento de radioatividade de radioatividade no plasma após a injeção intraperitoneal de HDL marcada com ^3H colesterol éter em camundongos transgênicos para CETP com hipotireoidismo (PTU) e controles. Os números acima de cada gráfico correspondem à identificação dos animais.