

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ANDREA CAMARGO CASQUERO

**ALTERAÇÕES DO PERFIL DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS INDUZIDAS
PELA TESTOSTERONA SÃO MODULADAS PELA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA
DE TRANSFERÊNCIA DE COLESTERIL ÉSTER: ESTUDOS EM
CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS E CONTROLES.**

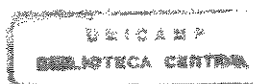
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Andrea Camargo
Casquero
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Helena Coutinho Franco de Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Funcional
e Molecular, na área de Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

2001



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
 1.ª CHAMADA: T/UNICAMP
C27a
 F. 46895
 TOMBO BC/ 16-892101
 PROC. 16-892101
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 02/11/01
 N.º CPD _____

CM00161033-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Casquero, Andrea Camargo

C27a Alterações do perfil de lipoproteínas plasmáticas induzidas pela testosterona são moduladas pela expressão de proteína de colesterol éster: estudos em camundongos transgênicos e controles/Andrea Camargo Casquero. – Campinas, S.P.: [s.n.], 2001.

74f: ilus.

Orientadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Transgênico. 2. Testosterona. 3. Proteína de transferência de colesterol éster. I. Oliveira, Helena Coutinho Franco de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 10/09/2001

Banca Examinadora:

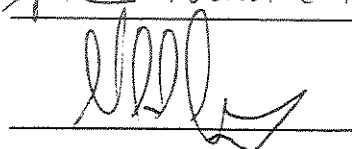
Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira (Orientador)



Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho



Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.”

Amir Klink

Dedico este trabalho aos meus pais, Tino e Elisa, que através do amor incondicional, sempre respeitaram minhas decisões e me incentivaram a buscar meus objetivos em todas as áreas da minha vida.

AGRADECIMENTO AOS FAMILIARES E AMIGOS

Aos meus irmãos Ian e Xandi pelo amor e apoio não só durante a realização deste trabalho mas por toda a minha vida.

Ao Rica, meu compaheiro e amigo de todas as horas.

Ao meu cunhado André pelo incentivo e por ser meu exemplo de profissional.

Aos meus amigos Graça, Nelson, Rafa, Carla, Carol e Dylan que sempre estiveram dispostos a me ouvir e me confortar.

Aos meus amigos Sandra, Alê e Flavinho por me fazerem sentir parte de sua família e por todo carinho que me deram.

A todos os amigos que me apoiaram direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira meus agradecimentos especiais por sua orientação, bem como pela confiança em mim depositada, sem os quais este trabalho não seria concluído.

Às professoras, Dra. Eliana C. de Faria e Dra. Lúcia Nassi Castilho, pela oportunidade de iniciar minha vida acadêmica em seu laboratório e à aluna de pós-graduação Águeda pela confiança depositada em meu trabalho ao longo do estágio.

Aos professores, Dr. Antônio Carlos Boschero e Dr. Everardo Magalhães Carneiro, pela oportunidade de trabalhar em um laboratório modelo, onde pude estar em contato com tecnologia de ponta e conviver com profissionais altamente capacitados.

Ao Prof. Dr. Eder C. R. Quintão e ao seu grupo de pesquisadores que inúmeras vezes nos acolheram em seu laboratório e aprendi novas técnicas.

Aos alunos de Doutorado e co-autores deste trabalho, Jairo Augusto Berti e Eliete Janaína Bueno Bighetti pela atenção e auxílio técnico.

Aos colegas de laboratório Denise, Maria Esméria, Fabrizio, Luciane, Alessandro, Fabiano, Adriana, Vanessa, Eliana, Eliane, Gislaine, Mércia, Eunice, Ana Beatriz, Ana Cláudia, Leônia, Juliano e Valber pela atenção e auxílio técnico.

Aos funcionários Cidinha, Ana Augusta, Léscio, Viviane, Miriam, André, Alexandra, Ivo, D. Cida, D.Zefa pela atenção e auxílio técnico.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Curso de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular da UNICAMP, que de contribuíram para minha formação intelectual.

À FAPESP pelo apoio financeiro e à assessoria pelos comentários pertinentes.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	x
Resumo	xi
Abstract.....	xiii
Introdução	
• Metabolismo de lipoproteínas e aterosclerose.....	1
• Transporte reverso de colesterol.....	3
• CETP e aterosclerose.....	6
• Hormônios sexuais, lipoproteínas e doença coronariana.....	7
• Modelo animal.....	10
Objetivos.....	11
Materiais e métodos.....	12
Resultados	
• Efeitos da deficiência da testosterona em camundongos CETP transgênicos e não-transgênicos.....	19
• Efeitos da suplementação de testosterona em camundongos CETP transgênicos e não- transgênicos	21
Tabelas e Figuras.....	23
Discussão.....	34
Conclusões.....	40
Referências Bibliográficas.....	41
Anexo I.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AN	- Androgenol
ApoLP	- apolipoproteína
CE	- colesterol éster
CETP	- proteína de transferência de colesterol éster, “cholesteryl ester transfer protein”
CL	- colesterol livre (não esterificado)
COL	- colesterol
DT	- Durateston
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	- cromatografia líquida de alta resolução, “fast protein liquid chromatography”
HDL	- lipoproteína de alta densidade, “high density lipoprotein”
IDL	- lipoproteína de densidade intermediária, “intermediate density lipoprotein”
LCAT	- lecitina: colesterol aciltransferase, “lecitin: cholesterol-acyltransferase”
LDL	- lipoproteína de baixa densidade, “low density lipoprotein”
LPL	- lipoproteína lipase, “lipoprotein lipase”
LH	- lipase hepática
LP	- lipoproteína
Não-Tg	- não-transgênico
PL	- placebo
PLTP	- proteína de transferência de fosfolípidos
QM	- quilomicrons
TG	- triglicérides
Tg	- transgênico
VLDL	- LP de densidade muito baixa, “very low density lipoprotein”

RESUMO

Hormônios sexuais modificam o perfil lipoprotéico e o risco de aterosclerose. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de testosterona sobre os lipídeos plasmáticos e enzimas associadas. Camundongos transgênicos (Tg) para proteína de transferência de colesterol-éster (CETP) e controles (não-Tg) foram estudados após 30 dias de castração ou pseudo-cirurgia (sham) e após 14 dias de suplementação com testosterona por injeções subcutâneas diárias de Durateston (DT), Androgenol (AN) ou placebo (PL). As concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides, ácidos graxos livres, glicose e insulina e as atividades da lipase hepática e da CETP foram semelhantes tanto nos animais castrados comparados aos sham quanto nos animais DT comparados aos PL. No entanto, estes tratamentos induziram modificações significativas da distribuição do colesterol nas lipoproteínas nos animais CETP Tg e não-Tg, as quais foram distintas conforme o genótipo. Em termos relativos, a deficiência de testosterona nos animais não-Tg provocou aumento de 73 % da VLDL e 79 % da LDL e redução de 11 % da HDL, enquanto nos animais CETP Tg castrados houve aumento de 36 % da LDL e redução de 30 % da HDL. Portanto esses resultados sugerem que a expressão da CETP nos camundongos transgênicos amenizou as modificações desfavoráveis nas apoB-LP observadas nos não-Tg. Em estudos cinéticos com LDL e HDL marcadas radioativamente, verificou-se uma tendência de redução da velocidade de remoção plasmática da LDL e redução do tempo de residência da HDL no plasma dos animais castrados, as quais explicam em parte as alterações das respectivas concentrações plasmáticas destas lipoproteínas. Além disso, a atividade endógena da CETP estava aumentada em 20 % nos animais castrados, contribuindo para redução da HDL nestes animais. A suplementação com testosterona em machos não-Tg e fêmeas CETP Tg também modificou os níveis de apoB-LP. Machos não-

Tg tratados com DT apresentaram aumento de 42 % da VLDL e 72 % na LDL; fêmeas CETP Tg tratadas com DT apresentaram aumento de 35 % em VLDL. Concluindo, tanto a deficiência como a suplementação com testosterona tornaram o perfil lipoprotéico dos camundongos mais aterogênico, independentemente da massa de lipase hepática e de CETP. A magnitude dos efeitos sobre as beta- e alfa-lipoproteínas foi dependente do genótipo, isto é, da expressão da CETP.

ABSTRACT

Sex hormones modify the plasma lipoprotein profile and hence the risk of atherosclerosis. In this study we have investigated the effects of testosterone on plasma lipid and lipoprotein levels and associated enzymes. Transgenic mice (Tg) that express a human cholesteryl ester transfer protein (CETP) minigene with natural flanking sequences and non transgenic (nTg) control mice were studied 30 days after castration or sham operation and 14 days after testosterone supplementation by subcutaneous daily injections of Durateston (DT), Androgenol (AN) or placebo (PL). Plasma concentrations of cholesterol, triglycerides, free fatty acids, glucose and insulin, as well as the hepatic lipase and CETP activities on exogenous substrates were similar in both conditions, testosterone deficiency (castrated vs. sham) or excess (DT vs. PL) for both groups of mice, CETP Tg and non Tg. However, these treatments induced changes in the cholesterol distribution among plasma lipoproteins that were dependent on the CETP expression. Testosterone deficiency in nTg mice provoked increase of 73 % in VLDL- and 79 % in LDL- and reduction of 11 % in HDL-cholesterol, while in CETP Tg mice there was an elevation of 36 % in LDL- and decrease of 30 % in HDL-cholesterol. Kinetic studies of LDL and HDL labeled with ^{131}I and ^{125}I , respectively, showed that the LDL fractional plasma removal rate and HDL plasma residence time tend to be lower in CETP Tg castrated as compared to sham mice. These results can explain, at least in part, the changes in LDL and HDL concentrations in the plasma of the CETP Tg castrated mice. Furthermore, endogenous substrate dependent CETP activity was elevated by 20 % in CETP Tg castrated mice, which contributed to the reduction in HDL-cholesterol levels in these mice. Testosterone supplementation induced an increase of 42 % in VLDL- and of 72 % in LDL-cholesterol in

the plasma of nTg mice and a mild 35 % increase in VLDL-cholesterol in plasma of female CETP Tg mice, while no change was observed in the cholesterol distribution among plasma lipoproteins of male CETP Tg mice. In conclusion, both testosterone deficiency and excess induced a more atherogenic lipoprotein profile in mice, which was independent of the mass of hepatic lipase and CETP. However, the magnitude of the effects were dependent on the CETP expression, which attenuated the elevation on beta-lipoprotein but strengthened the reduction on alpha-lipoprotein cholesterol levels.

INTRODUÇÃO

Metabolismo de lipoproteínas e aterosclerose

A aterosclerose, principal responsável pela patogênese do infarto miocárdico e cerebral, da gangrena e outras doenças vasculares periféricas, permanece como principal causa de morbidade e mortalidade nas populações “ocidentalizadas”. Anormalidades no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, principalmente em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL), são fatores de risco primários para aterosclerose, cuja lesão mais precocemente reconhecível caracteriza-se por uma agregação de macrófagos carregados de colesterol (*foam cells*) e linfócitos T na íntima arterial, a chamada *fatty streak*. A ubiquidade do processo aterosclerótico é atestada pela detecção de *fatty streaks* em 50% das autópsias realizadas em coronárias de crianças entre 10 e 14 anos. As lesões iniciais progridem em função de uma resposta inflamatória-fibroproliferativa exagerada à injúria ou disfunção das células endoteliais e musculares lisas da parede arterial (Ross, 1993).

A homeostase do colesterol no compartimento plasmático e nos tecidos é regulada por processos fisiológicos complexos que envolvem a síntese e secreção de lipoproteínas, atividade de receptores celulares específicos para as lipoproteínas, atividade de enzimas lipolíticas e de proteínas de transferência de lípidos.

Há cinco classes principais de lipoproteínas plasmáticas (LP) transportadora de lípidos, classificadas de acordo com a sua densidade: as LP de alta, baixa, intermediária e muito baixa densidade, respectivamente, HDL, LDL, IDL e VLDL, além dos quilomícrons (QM). As várias LP diferem entre si em termos de densidade, tamanho e migração

eletroforética porque têm composição lipídica e protéica distintas. QM e VLDL são as chamadas LP ricas em triglicérides (TG), de origem intestinal e hepática, respectivamente. Essas LP são metabolizadas no compartimento vascular pela lipoproteína lipase (LPL) que hidrolisa seus TG gerando partículas remanescentes de quilomícrons e de VLDL enriquecidas em colesterol. As IDL são os produtos intermediários e as LDL os produtos finais do catabolismo intravascular das VLDL. A LDL é a LP mais abundante do plasma dos seres humanos (cerca de 70 % do colesterol plasmático é encontrado nessa fração). As IDL e LDL são removidas da circulação sanguínea via receptores de LDL amplamente expressos em tecidos em proliferação, tecidos esteroideogênicos (gônadas e adrenal) e principalmente fígado (Brown e Goldstein, 1986). Os remanescentes de QM e as IDL são também rapidamente captados por outros receptores hepáticos chamados LRP (*LDL receptor related protein*) (Herz et al., 1988). Uma vez dentro da célula, o colesterol derivado das LP exerce várias ações regulatórias, incluindo a supressão da expressão da enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese do colesterol, a HMG-CoA redutase, e a supressão da transcrição do gene do receptor da LDL. Desta forma, as células se protegem de um aumento excessivo da concentração de colesterol. Por outro lado, na deficiência de colesterol, as células aumentam a expressão da HMG-CoA redutase estimulando a síntese *de novo* de colesterol e aumentam também a expressão dos receptores de LDL promovendo captação do colesterol exógeno. Os mecanismos moleculares envolvidos nesta fina regulação da concentração intracelular de colesterol foram elegantemente elucidados pelos prêmios-Nobel, Michael Brown e Joseph Goldstein (Brown e Goldstein, 1997). Como consequência, a concentração de LDL no plasma varia em função do número de receptores de LDL nos tecidos, principalmente no fígado. Estes

podem estar diminuídos por defeito genético ou por excesso de colesterol na dieta que aumenta o aporte de lipoproteínas de origem intestinal (QM e remanescente) para o fígado.

Concentração elevada de LDL plasmática resulta em aumento da quantidade de LDL que se infiltra no espaço subendotelial. A LDL interage com elementos da matriz extracelular (ex.: glicosaminoglicanos e colágenos) e fica retida por mais tempo neste microambiente, onde sofre alterações químicas tais como oxidação e proteólise. Esta LDL quimicamente modificada estimula as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão facilitando a adesão e transmigração de células linfomonocitárias circulantes para o espaço subendotelial. Os monócitos proliferam-se e diferenciam-se em macrófagos que captam as LDL modificadas através de uma classe de receptores chamados *scavenger*. Diferentemente dos receptores de LDL, os receptores *scavenger* não são regulados e os macrófagos captam as LDL modificadas de maneira contínua transformando-se em *foam cells*. Com o tempo, as *foam cells* morrem e vão constituir o núcleo necrótico da lesão aterosclerótica avançada. Células musculares lisas também migram da camada adventícia para íntima, proliferam-se e eventualmente transformam-se em *foam cells*. O processo ocorre em progressão geométrica com a participação de um grande número de fatores de crescimento, citocinas e moléculas vasoregulatórias (Ross, 1993; Lusis, 2000 e Libby, 2000).

Transporte reverso de colesterol

Alterações dos níveis plasmáticos de LDL- e HDL-colesterol produzem efeitos muito distintos no risco relativo para doença arterial coronariana. Este risco está diretamente correlacionado à concentração plasmática de LDL-colesterol e inversamente à

concentração plasmática de HDL-colesterol (Huuskonen e Ehnholm, 2000; Pedersen, 2001; Assmann, 2001).

O efeito atero-protetor da HDL parece ser devido, em grande parte, ao transporte reverso de colesterol (Tall, 1995; Navab et al., 1996; Breslow, 1989). Este é um processo pelo qual o excesso de colesterol é removido das células e é transportado ao fígado para ser reutilizado e/ou excretado na bile. Tem sido sugerido que a HDL remove o excesso de colesterol não esterificado inclusive da camada da íntima arterial. Além disso, a HDL exibe outras propriedades anti-aterogênicas, como por exemplo, tem ação anti-oxidante (Kwiterovich, 2000).

O colesterol não esterificado associado à HDL é esterificado pela lecitina: colesterol acil transferase (LCAT) e é transportado direta ou indiretamente para o fígado (Navab, 1996). O transporte indireto para o fígado envolve a proteína de transferência de colesterol éster (CETP) que transfere colesterol éster (CE) da HDL para lipoproteínas que contêm apoB (apoB-LP), como VLDL, IDL e LDL, as quais em seguida são captadas por receptores hepáticos. Assim, o CE retorna ao fígado por 2 vias: captação seletiva de CE das HDL e captação específica das apoB-LP. Em espécies que não expressam a CETP, como ratos e camundongos, não existe o transporte indireto de CE para o fígado.

Várias são as proteínas e enzimas que podem modificar o metabolismo da HDL :

Apolipoproteína AI e AII. A apolipoproteína (apo) AI é o principal componente protéico da HDL. Além da função estrutural, ela é ativadora da LCAT. No entanto, esta propriedade é compartilhada com outras apoLP, a apo AIV e apo CI e com peptídeos sintéticos contendo hélices anfipáticas (Tall, 1985; Eisenberg, 1984), indicando que a ativação da LCAT não é uma interação proteína-proteína altamente específica. A apo AI é sintetizada no fígado e no intestino (Haddad et al., 1986). A apo AII é a segunda proteína estrutural

mais abundante da HDL. É sintetizada exclusivamente no fígado (Hussain e Zannis, 1990). As funções metabólicas da apo AII não são bem conhecidas. Estudos em animais transgênicos sugerem que ela pode inibir o remodelamento das HDL mediado pela lipase hepática (Zhong et al., 1994).

Lipoproteína lipase (LPL). A LPL é uma enzima encontrada no endotélio dos capilares dos tecidos periféricos, principalmente músculo e tecido adiposo. A LPL participa diretamente do metabolismo das LP ricas em triglicérides gerando os remanescentes ricos em colesterol (Redgrave, 1983) e influencia indiretamente o metabolismo da HDL (Rader e Jaye, 2000; Nunes et al., 2001). Deficiência de LPL encontrada em humanos ou camundongos transgênicos, está associada com hipertrigliceridemia severa (Rader e Jaye, 2000). A atividade da LPL é dependente da apo CII, seu cofator. Por outro lado, a apo CIII é inibidora de sua atividade (Rader e Jaye, 2000).

Lipase Hepática (LH). É uma enzima lipolítica sintetizada principalmente pelo fígado. Está ancorada no endotélio vascular do fígado e na superfície do hepatócito por proteoglicanos de heparan sulfato. A LH funciona como acilglicerol hidrolase e fosfolipase, hidrolisando triglicérides dos remanescentes de quilomícrons, IDL e HDL e também os fosfolípides da sub-fração HDL₂. A LH pode ainda facilitar o processo de transporte reverso do colesterol e aumentar a transferência de CE da HDL para o fígado e tecidos esteroideogênicos como as glândulas adrenais e gônadas (Cohen et al., 1999).

Lecitina: colesterol acil transferase. A LCAT é responsável pela formação de quase todo colesterol esterificado encontrado no plasma e pela transformação das HDL discóides nascentes (pré-beta HDL) em partículas esféricas (HDL₂ e HDL₃) (Santamaria-Fojo et al., 2000). Vários estudos têm demonstrado o papel central da LCAT na estimulação do fluxo (efluxo) de colesterol de membranas celulares para a HDL (Peelman et al., 2000). Em

humanos, as mutações do gene da LCAT estão associadas à deficiência parcial (“fish eye disease”) ou completa (deficiência familiar da LCAT) de atividade plasmática da LCAT. Os dois grupos de mutantes apresentam níveis de HDL, apo AI e apo AII reduzidos (Santamaria-Fojo et al., 2000). As HDL existentes são discóides, as LDL são ricas em TG, podendo esses indivíduos apresentar aterosclerose prematura (Breslow, 1989).

Proteínas de transferência de lipídeos (CETP e PLTP). A CETP promove toda a transferência de lipídeos neutros no plasma humano, incluindo a transferência de CE das HDL para as LP ricas em TG e seus remanescentes (coletivamente chamados apoB-LP), e a transferência recíproca de TG na direção oposta (Tall, 1995). A CETP também facilita trocas de fosfolípidos entre as LP. Ao contrário, a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) é responsável pela transferência somente de fosfolípidos entre as LP. Sua ação promove interconversões das subfrações das HDL. PLTP é uma glicoproteína que está parcialmente associada a HDL (Huuskonen e Ehnholm, 2000).

CETP e aterosclerose.

A CETP desempenha um importante papel na patogênese da aterosclerose (Inazu et al., 2000; Hirano et al., 2000), mas ainda não está claro se sua expressão facilita ou antagoniza o desenvolvimento da doença. Existem dados conflitantes de estudos populacionais que mostram aumento de doença coronariana associado a ambos, deficiência (Zhong et al., 1996) e aumento (Bhatnagar et al., 1993) dos níveis de CETP. Achados controversos também foram obtidos de estudos em modelos animais. Animais transgênicos (Tg) que super-expressam CETP (Marotti et al., 1993) desenvolvem aterosclerose mais severa que os não-Tg. Também a expressão de CETP em animais hipercolesterolêmicos acelera o desenvolvimento da aterosclerose (Plump et al., 1999). Por outro lado, a expressão da CETP diminui as lesões ateroscleróticas em animais Tg hipertrigliceridêmicos

(Hayek et al., 1995) e em Tg que super-expressam a LCAT (Foger et al., 1999). No entanto, quando coelhos são usados como modelo experimental, a inibição da CETP endógena destes animais provoca redução significativa das áreas ateroscleróticas arteriais (Sugano et al., 1998; Okamoto et al., 2000; Rittershaus et al., 2000).

Hormônios sexuais, lipoproteínas e doença coronariana.

Hormônios sexuais são reguladores chave no metabolismo das LP, o que se verifica pela diferença nos perfis lipoprotéicos que emergem na puberdade. Ocorrem mudanças dinâmicas nos níveis séricos das LP durante a maturação sexual antes do padrão adulto estabelecer-se (Srinivasan et al., 1985). Meninas possuem níveis mais altos de VLDL-colesterol e níveis similares de HDL-colesterol quando comparadas aos meninos. Durante a adolescência, os níveis de HDL- e LDL-colesterol diminuem, sendo a diminuição de HDL-colesterol mais pronunciada em meninos do que em meninas. Meninos, diferente das meninas, continuam a apresentar um aumento em VLDL-colesterol. Os níveis de HDL-colesterol correlacionam-se negativamente com a testosterona em meninos púberes e positivamente com estradiol em meninas púberes. Essas observações demonstram que as alterações nas lipoproteínas em adolescentes estão fortemente relacionadas aos hormônios sexuais (Srinivasan et al., 1985).

Em geral, homens adultos têm maiores níveis de LDL e menores níveis de HDL que as mulheres pré-menopausadas da mesma idade. Observa-se um menor risco para doença coronariana nessas mulheres quando comparadas aos homens e às mulheres pós-menopausadas (Bagatell e Bremner, 1995; Legato, 2000).

A testosterona, principal hormônio masculino, é sintetizado nas células de Leydig do testículo e no córtex da glândula adrenal, porém neste último em quantidade muito pequena (Wilson et al., 1998). Vermuelen *et al.* (1980 e 1985) e outros demonstraram que

os níveis de testosterona diminuem com a idade. Essa diminuição frequentemente começa antes dos 30 anos em homens aparentemente saudáveis (Simon et al., 1992; Freedman et al., 1991). Se altos níveis endógenos de testosterona explicam os níveis diminuídos de HDL-colesterol, uma diminuição de HDL-colesterol com a idade poderia ser esperada nos homens. No entanto, os níveis de HDL-colesterol em homens permanecem constantes a cada década da vida adulta (Kannel, 1988).

A idéia geral de que hormônios estrogênicos elevam a concentração de HDL e que os androgênicos a reduzem (Wilson et al., 1998) ainda é controversa. Em uma revisão de Barret-Connor (1992) foi documentado que, de treze estudos com homens adultos, dez observaram que os níveis de testosterona total estavam positivamente correlacionados com HDL-colesterol; exatamente o oposto do esperado se a testosterona fosse responsável pelos menores níveis de HDL.

Outros fatores que afetam os níveis de HDL-colesterol também estão associados com níveis endógenos de testosterona (Heiss et al., 1980). Por exemplo, obesidade masculina (depósito de gordura central ou no tronco) está associada com dislipidemia e baixos níveis de testosterona (Kannel, 1988; Stefanick et al., 1987; Seidell et al., 1991; Pasquali et al., 1991; Phillips, 1993). Esta condição implica em maior risco de diabetes tipo II e doença cardiovascular (Bouchard et al., 1993). No entanto, a insuficiência de estrógeno, mais que a alta concentração de testosterona, parece ser responsável pela obesidade central, resistência à insulina, hipercolesterolemia e hiperglicemia, uma vez que este fenótipo aparece em indivíduos de ambos os sexos com deficiência genética da aromatase, enzima que catalisa a síntese de estrógenos a partir de andrógenos (Morishima et al., 1995; Carani et al., 1997; Bilezikian et al., 1998; Conte et al., 1998).

Vários autores (Openhein et al., 1989; Alexandersen et al., 1999; Haug et al., 1985; Uyanik et al., 1997; Heiss et al., 1980) relataram aumento da fração LDL-colesterol em situações de deficiência de testosterona em diferentes espécies, inclusive em seres humanos hipogonádicos. Haug *et al.*, 1985, também observaram aumento nos níveis de apo B em ratos castrados.

Uma diminuição da HDL foi observada em estudos realizados em homens hipogonádicos (Tan et al., 1998; Ozata et al., 1996) e em camundongos castrados (Grainger et al., 1995). Contudo, outros autores encontraram o inverso, i.e., aumento ou nenhuma variação nos níveis de HDL em homens com deficiência de testosterona (Bagatell et al., 1992; Von Eckerdstein et al., 1997; Tang et al., 1991; Oppenheim et al., 1989; Alexandersen et al., 1999), em macacos (Greger et al., 1990) e camundongos castrados (Reckless et al., 1997). As razões para estas discrepâncias de resultados não são claras. Entretanto, elas podem estar relacionadas a diferenças na etiologia do hipogonadismo e/ou variabilidade entre as espécies animais estudadas.

Solyom já havia relatado em 1971 em seus trabalhos com fisiculturistas e halterofilistas, a habilidade da testosterona e seus derivados em induzirem modificações desfavoráveis no perfil lipoprotéico. Diminuição dos níveis de HDL após suplementação de testosterona em indivíduos saudáveis também foi observada por Bagatell et al., 1994; Zmuda et al., 1993; Anderson et al., 1995. Vários outros autores relataram pequeno ou nenhum efeito da testosterona sobre a concentração de LDL-colesterol (Webb et al., 1984; Hinkel et al., 1985; Kieckland et al., 1987; Sorva et al., 1988; Thompson et al., 1989; Frisch e Sumida, 1999). A modificação mais consistente observada após o uso da testosterona era a redução de HDL-colesterol.

Modelo animal

No final dos anos 80, com o desenvolvimento de animais transgênicos, algumas das complexidades do funcionamento dos genes envolvidos no transporte das lipoproteínas começaram a ser elucidados e novos alvos para intervenções farmacológicas para normalizar o perfil lipoprotéico e reduzir o risco de aterosclerose foram apontados. A “tecnologia da transgênese” tem sido empregada com sucesso na criação de modelos experimentais de dislipidemias e aterosclerose, bem como no estudo de aspectos básicos da regulação gênica e da expressão tecido-específico de vários genes do metabolismo das lipoproteínas. Foram criados e estudados transgênicos para quase todas as apolipoproteínas plasmáticas (Breslow, 1993), receptor da LDL (Hofmann et al., 1988), LCAT (Francone et al., 1995), CETP (Agellon et al., 1991; Marotti et al., 1993; Jiang et al., 1992), entre outros.

Camundongos normalmente não expressam CETP e por isso são modelos muito úteis para o estudo do impacto da expressão da CETP sobre o metabolismo das LP plasmáticas. Em estudos prévios, verificou-se que a expressão da CETP resulta em diminuição do colesterol na fração HDL (Agellon et al., 1991; Jiang et al., 1992). Os camundongos CETP transgênicos apresentam um perfil lipoprotéico mais semelhante ao dos seres humanos que os camundongos *wild type*. A comparação entre estes dois modelos animais é imprescindível para compreendermos a ação da CETP na fisiologia das lipoproteínas plasmáticas.

O transgene utilizado na construção deste modelo animal contém 3.4Kb (5') e 2.2 Kb (3') de sequências de nucleotídeos naturais “flanking” (NFR), nas quais várias regiões regulatórias de transcrição já foram definidas (Oliveira *et al.*, 1996a).

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel dos hormônios sexuais, especificamente da testosterona, sobre o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas e sobre a expressão da CETP em camundongos transgênicos que expressam o gene humano da CETP (CETP Tg).

O efeito da testosterona foi verificado, através dos estados de deficiência (castração de machos) e excesso deste hormônio na presença (fêmeas) ou ausência (machos) de estrógenos endógenos, sobre:

- as concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides, ácidos graxos livres, glicose e insulina
- o perfil de lipoproteínas plasmáticas
- a atividade das duas principais proteínas que modulam o metabolismo da HDL: a CETP e a lipase hepática
- o tempo de residência e velocidade de remoção plasmática da LDL e da HDL na circulação sanguínea.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais:

Solventes orgânicos e sais em geral utilizados neste estudo são das marcas Merck® (Darmstadt, Alemanha) e Sigma® (St. Luis, MO, E.U.A).

Animais:

As colônias de animais geneticamente modificadas utilizados neste estudo foram geradas a partir de animais fornecidos pelo Dr. Alan R. Tall, da Divisão de Medicina Molecular da Columbia University, NY, E.U.A. Foram utilizados transgênicos (Tg) para CETP, linhagem 5203 (Jiang *et al.*, 1992). Os animais não transgênicos (não-Tg) com o mesmo “background” dos animais CETP Tg (C57BL/6) eram provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), luminosidade (ciclo de claro-escuro de 12 horas) e receberam água e ração (Nuvilab®, Colombo, Paraná, Brasil) *ad libitum*. Os animais foram reunidos em grupos segundo seus genótipos e tratamentos e submetidos a jejum de 12 horas antes das coletas de sangue. Para a determinação do genótipo dos animais CETP, foi utilizada a medida da atividade da CETP no plasma, descrita a seguir.

Tratamento dos animais:

1. Estudo da deficiência da testosterona (castração):

Foram realizados os procedimentos cirúrgicos de orquidectomia bilateral e pseudocirurgia nos camundongos CETP Tg e não-Tg, com idades de 3 a 4 meses.

Após período de 30 dias de castração, os animais foram anestesiados com 50 mg/Kg de Vetanarcol® (Laboratórios König S.A, Avellaneda, Argentina) e 15 mg/Kg de Ronpum® (Bayer S.A, São Paulo, Brasil), e a gordura epididimal, as adrenais e o

figado foram extraídos e pesados, e o sangue total foi coletado por drenagem do plexo retro orbital.

2. Estudo do efeito da suplementação da testosterona:

Camundongos CETP Tg e não-Tg, machos e fêmeas com 4 a 5 meses de idade, foram tratados com duas diferentes composições de testosterona, a saber, o Durateston® (Akzo Nobel Ltda, Divisão Organon, São Paulo, Brasil) e o Androgenol (Hertape®, Belo Horizonte, Brasil). A testosterona é rapidamente degradada no figado com meia-vida na circulação sanguínea de aproximadamente 10 minutos (Wu, 1992). Em preparações comerciais clinicamente úteis, a testosterona é esterificada na posição 17-hidroxi, resultando em compostos mais hidrofóbicos e liberados gradualmente do veículo. Uma vez na circulação, a testosterona é hidrolisada do éster e comporta-se metabolicamente de forma idêntica à testosterona natural. O Durateston contém propionato, fenilpropionato, isocaproato e decanoato de testosterona e o Androgenol contém apenas propionato de testosterona, de meia-vida mais curta que os outros ésteres do Durateston. Os animais receberam injeções subcutâneas diárias de 1 µg por grama de peso corporal, durante 14 dias e foram sacrificados no décimo quinto dia para obtenção do sangue total e peso dos órgãos.

Os seguintes grupos experimentais de camundongos foram estudados:

- 1- Machos não-Tg tratados com placebo (propileno glicol)
- 2- Machos não-Tg tratados com Durateston
- 3- Machos CETP Tg tratados com placebo
- 4- Machos CETP Tg tratados com Durateston
- 5- Machos CETP Tg tratados com Androgenol
- 6- Fêmeas CETP Tg tratadas com placebo

7- Fêmeas CETP Tg tratadas com Durateston

8- Fêmeas CETP Tg tratadas com Androgenol

Isolamento e marcação da HDL com colesterol radioativo:

Utilizou-se o método descrito anteriormente por Oliveira e Quintão (1996b) para a marcação da HDL com colesterol éster radioativo. Para tanto, obteve-se misturas de plasma de doadores normolipidêmicos que não estavam em jejum. Aproximadamente 10 mL da mistura plasmática foi ajustada à densidade 1,125 g/mL com KBr (0,202 g/mL) e ultracentrifugado no rotor 50 ti, 40.000 rpm, por 40 horas. Descartou-se os 2 mL sobrenadantes e dializou-se o infranadante ($d > 1,125$) que contém HDL3 e proteínas plasmáticas. 50 μ Ci de colesterol [1- 14 C] oleato (14 CCE) ou 3H-colesterol éster (3HCE) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) dissolvido em 100 μ L de etanol absoluto foi adicionado, gota-a-gota, aos 10 mL 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 CE radioativo 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 radioativamente. Essa foi exaustivamente dializada contra salina 0,15M e esterilizada em filtro Millipore 0,22 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA, E.U.A). A eficiência da marcação variou entre 25-30 %.

Atividade da CETP no plasma:

Ensaio exógeno: Uma mistura de VLDL + LDL obtida por ultracentrifugação (Havel et al., 1955) de plasma de doadores normolipidêmicos foi utilizada como lipoproteínas aceptoras.

HDL também obtida por ultracentrifugação de plasma de doadores normolipidêmicos foi marcada radioativamente com ^{14}C -colesteril-éster (14CCE). O ensaio isotópico consiste em uma reação contendo 50 μg de proteína de VLDL+LDL, 10000 dpm de $^{14}\text{CCE-HDL}$ e 10 μL do plasma diluído dos animais como fonte de CETP em um volume final de 100 μL . A mistura é incubada a 40°C por 2 horas. Em seguida, adiciona-se à mistura 400 μL de tampão tris (10 mM) / salina (150 mM) / EDTA (1 mM) e 50 μL de coquetel de precipitação das lipoproteínas que contém apoB (partes iguais de sulfato de dextrana 1,6 % e MgCl_2 1,0 M) e espera-se 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras são então centrifugadas à 12000 rpm por 30 minutos. Quatrocentos e cinquenta microlitros (450 μL) 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 VLDL+LDL: %CE transferido = $(\text{dpm blank} - \text{dpm amostra}) \times 100 / \text{dpm “blank”}$.

Ensaio endógeno: Atividade endógena de CETP é medida da seguinte maneira: 100 μL de plasma dos camundongos são separados por FPLC para obtenção das frações VLDL + LDL (pool das frações). Paralelamente, 100 μL de plasma são precipitados com 10 μL de coquetel de precipitação das lipoproteínas que contém apoB (partes iguais de sulfato de dextrana 1,6 % e MgCl_2 1,0 M) e depois de 10 minutos à temperatura ambiente, coleta-se 80 μL do sobrenadante (fração que contém HDL e CETP). Adiciona-se à fração de VLDL+LDL, (1.2 mL), 100000 dpm de $^3\text{HCE-HDL}$ e 80 μL do sobrenadante com HDL e CETP, totalizando um volume final de 1,3 mL. A mistura é incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, transfere-se as amostras para banho de gelo, adiciona-se à mistura 50 μg de LDL humana

como carreador, e adiciona-se 1/10 do volume de coquetel de precipitação e espera-se 15 minutos ainda em banho de gelo. As amostras são então centrifugadas à 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. 1,2 mL do sobrenadante são recuperados e misturados à 5 mL de solução cintiladora para determinação da radioatividade remanescente nas HDL. No ensaio são utilizados sempre 2 “blanks” que consistem em 80 µl de albumina 3,5 % + ³HCE-HDL + 1,2 mL de salina 0,85 %.

Determinação de lípides no plasma

Colesterol total no plasma foi determinado utilizando-se Kit enzimático da Roche® (Indianapolis, IN, E.U.A). Para triglicérides utilizou-se kit da Merck® (Darmstadt, Alemanha). Para ácidos graxos livres utilizou-se kit da Wako Chemicals® GmbH (Neuss, Alemanha), conforme instruções do fabricante.

Dosagem de insulina

A concentração plasmática de insulina foi determinada por radioimunoensaio com curva padrão confeccionada com insulina de rato (Scott *et al.*, 1981).

Dosagem de testosterona

As concentrações plasmáticas de testosterona total foram determinadas através de dois métodos, quimioluminescência com o kit de IMMULITE® DPC® (Los Angeles, CA, EUA) e fluorimétrico com o kit Perkin-Elmer® (Finlândia).

Fracionamento das Lipoproteínas

Foram feitos “pools” de plasma fresco dos animais tratados e controles. Esses foram submetidos à cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) utilizando-se uma coluna de Superose 6 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) 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 determinada a quantidade de colesterol total utilizando kit enzimático da Roche® (Indianapolis, IN, EUA) de acordo com as especificações do fabricante.

Atividade da lipase hepática (LH):

A atividade da enzima LH foi determinada de acordo com Ehnholm e Kuusi (1986) através de incubação do plasma 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. Os ácidos graxos livres liberados pela ação enzimática são extraídos com metanol/clorofórmio/heptana (1,4: 1,25: 1,0) em pH=10,5 para medida da radioatividade. A atividade da enzima lipoproteína lipase periférica (LPL) também presente no plasma, foi inibida pela presença de 2,0 M de NaCl no meio de incubação.

Estudos cinéticos de LDL e HDL marcadas com iodo radioativo.

LDL e HDL foram isoladas por ultracentrifugação sequencial de plasma de doadores normolipidêmicos de acordo com Havel et al. (1955). As frações de LDL e HDL obtidas foram exaustivamente dializadas contra salina 0,85 % e 2 mM de EDTA. As LDL e HDL foram marcadas com ^{131}I (IPEN, São Paulo, Brasil) e ^{125}I , (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra), respectivamente, utilizando-se as modificações feitas por Bilheimer et al. (1972) do método de monocloreto de iodo de MacFarlane (1958). 95 % da marcação foi precipitada com ácido tricloroacético a 5 %. Os animais receberam 1×10^6 dpm de cada lipoproteína em 0,2 mL da mistura de lipoproteínas contendo ^{131}I -LDL e ^{125}I -HDL, via intrapiretonial. Amostras de sangue foram coletadas pela ponta da cauda nos tempos: 0.17, 0.5, 1, 3, 5, 8 horas após a injeção. A taxa fracional de remoção das lipoproteínas marcadas, foi calculada como a inclinação da curva de

desaparecimento da radioatividade no plasma pelo ajuste de curva exponencial, utilizando-se o programa MicrocalTM OriginTM 4.1. O tempo de residência das LP na circulação foi calculado como a área sob a curva da radioatividade normalizada (Tai, 1994).

Tratamento estatístico:

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (ep). Utilizou-se o teste “t” de Student e análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey – Kramer para análise paramétrica e Mann-Whitney, para a análise de parâmetros com unidades relativas utilizando o programa estatístico InStat versão 3.00 da GraphPad Software. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efeito da deficiência da testosterona em camundongos CETP transgênicos e não-transgênicos.

Todas as avaliações foram realizadas 30 dias após a orquidectomia bilateral (castração) e a pseudo-cirurgia (sham) em camundongos com idade média de 4 meses (ANEXO I).

O peso corporal e de órgãos dos animais CETP Tg e não-Tg castrados e sham, estão apresentados na Tabela I. Houve uma redução significativa do peso corporal final e do peso relativo do tecido adiposo epididimal dos animais CETP Tg castrados quando comparados ao grupo CETP Tg sham ($p < 0,001$). Os pesos das adrenais e pesos relativos dos fígados apresentaram-se similares nos dois grupos CETP Tg, castrados e sham. O peso corporal e dos órgãos foram semelhantes entre os grupos de camundongos não-Tg castrados e sham.

As concentrações plasmáticas de colesterol (COL), ácidos graxos livres (AGL), triglicérides (TG) e glicose (GLIC) não variaram em função da castração, tanto nos animais CETP Tg como nos não-Tg (Tabela II). Como foi descrito anteriormente que os níveis de testosterona livre em humanos podem estar correlacionados positivamente com a concentração de insulina (Stefanick et al., 1987), averiguamos este parâmetro nos grupos experimentais. As concentrações plasmáticas de insulina dos CETP Tg foram similares entre os grupos castrado e sham (Tabela II).

Os perfis das lipoproteínas plasmáticas, obtidos por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) dos animais CETP transgênicos (Figura 1) e não-transgênicos, castrados

e pseudo-operados, são apresentados, em valores absolutos, na Tabela II. Observou-se um aumento de 36 % da fração LDL-colesterol ($p=0,02$) e uma significativa redução paralela de 30 % da fração HDL-colesterol ($p=0,002$) nos animais CETP Tg castrados quando comparados aos CETP Tg sham (Tabela II e Figura 1). Resultados diferentes foram observados nos animais não-transgênicos castrados. Neste grupo, as modificações foram mais pronunciadas nas lipoproteínas que contêm apo B com um aumento de 73 % na fração VLDL-colesterol ($p=0,06$) e 79 % na fração LDL-colesterol ($p=0,001$) e uma redução modesta porém significativa de 11 % da fração HDL-colesterol ($p=0,003$) quando comparados aos não-transgênicos sham (Tabela II e Figura 1).

Medimos a atividade da lipase hepática em ambos os grupos, Tg e não-Tg, e a atividade da CETP apenas nos Tg. A atividade da CETP, medida com substrato exógeno, é indicativa da massa da proteína no plasma. Esta não variou nos dois grupos, castrados e sham (Tabela II e Figura 2). No entanto, a atividade da CETP determinada com os substratos endógenos estava 20 % aumentada no grupo CETP Tg castrado quando comparada ao grupo CETP Tg sham ($p=0,01$) (Tabela II e Figura 2). A atividade LH no plasma após a castração foi semelhante nos grupos CETP Tg e tenderam a aumentar nos não-Tg castrados ($p=0,06$) (Tabela II).

Para entender as alterações induzidas pela deficiência de testosterona sobre o metabolismo das LP plasmáticas, realizamos estudos cinéticos com LDL e HDL marcadas com isótopos radioativos e injetadas via intraperitoneal em camundongos machos CETP Tg castrados ou pseudo-operados. Avaliamos o tempo de residência e a taxa fracional de remoção plasmáticas das LDL e HDL, marcadas com ^{131}I e ^{125}I , respectivamente (Tabela III). Verificamos uma tendência de redução de taxa fracional de remoção de LDL (30 %) e do tempo de residência da HDL (15 %) nos animais castrados, as quais poderiam explicar

parcialmente a elevação da concentração de LDL e a redução de HDL, respectivamente, encontradas nestes animais.

Estudo da suplementação de testosterona em camundongos CETP transgênicos e não-transgênicos.

Camundongos CETP Tg e não-Tg intactos, machos e fêmeas, com idade média de 4 meses de idade, foram tratados com dois tipos de ésteres de testosterona, Durateston (DT) e Androgenol (AN) ou com veículo, propileno glicol (PL), durante 14 dias. Nenhum dos grupos tratados mostrou alterações nos seus pesos finais, quando comparados aos valores basais iniciais (Tabelas IV e V). Também o peso relativo do tecido adiposo perigonadal, do fígado e das gônadas foram semelhantes entre os grupos de camundongos tratados e respectivos controles PL. Somente o peso das adrenais das fêmeas CETP Tg tratadas com DT eram menores que as do grupo PL (Tabela IV).

O sangue retirado da cauda ao final do período de suplementação com testosterona foi utilizado para determinações bioquímicas das concentrações plasmáticas de triglicérides (TG), ácidos graxos livres (AGL), colesterol (COL) e glicose (Tabelas VI e VII). Observou-se que as concentrações de TG, AGL e glicose foram semelhantes entre os grupos tratados (DT e AN) e placebo (PL), em ambos os sexos. Inesperadamente, o nível plasmático de colesterol diminuiu significativamente no grupo de machos tratados com Androgenol em relação ao placebo (Tabela VII).

Não foram observadas diferenças nas concentrações de insulina plasmática nos camundongos machos e fêmeas tratados com Durateston e Androgenol (Tabelas VI e VII).

Nenhuma modificação das atividades da CETP (Figura 4) e LH foi observada nos animais machos (Tabela VII) e fêmeas suplementados com testosterona (Tabela VI).

Camundongos CETP Tg, tanto os machos (Tabela VII e Figura 3) quanto as fêmeas (Tabela VI), não exibiram alterações significativas da distribuição do colesterol nas frações de lipoproteínas plasmáticas após suplementação com testosterona. Fêmeas CETP Tg tratadas com DT apresentaram elevação de 35 % das VLDL (Tabela VI). Entretanto, camundongos não-Tg machos apresentaram uma elevação significativa de 72 % na fração de LDL-colesterol (Tabela VII e Figura 3) após suplementação com DT. Também a atividade da CETP, tanto no ensaio com substrato exógeno como endógeno, e a atividade da LH não se modificaram após a suplementação com testosterona (Tabelas VI e VII).

Tabela I. Peso corporal e de órgãos de camundongos CETP transgênicos (Tg) e não transgênicos (não-Tg) machos pseudo-operados (sham) e após 30 dias de castração.

	CETP Tg			não-Tg	
	sham n=8	castrado n=9	sham n=6	castrado n=6	
Peso corpóreo inicial (g)	23 ± 0,4	26 ± 0,4	24 ± 0,9	25 ± 1,0	
Peso corpóreo final (g)	24 ± 0,4	21 ± 1,4 ^a	29 ± 0,7	24 ± 2,5	
Par de adrenais (mg)	3,7 ± 0,8	4,2 ± 0,3	3,0 ± 0,4	3,6 ± 0,3	
Tecido adiposo epididimal (% peso do corpo)	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,3	1,5 ± 0,1	
Fígado (% peso do corpo)	4,2 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,2 ± 0,4	

Média ± ep. Teste de Mann Whitney para peso relativo e Teste “t” de Student para o peso absoluto: ^a p<0,0001 e ^b p<0,001, comparados aos sham.

Tabela II. Concentração plasmática de lipídeos, glicose, insulina, lipoproteínas, atividade da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e lipase hepática (LH) em camundongos CETP transgênicos (Tg) e não transgênicos (não-Tg), pseudo-operados (sham) e após 30 dias de castração.

	CETP Tg		não-Tg	
	sham	castrado	sham	castrado
COL (mg/dL)	58 ± 2,5 (8)	56 ± 3,0 (9)	101 ± 7,2 (6)	100 ± 7,3 (6)
AGL (nmol/L)	1,5 ± 0,1 (8)	1,4 ± 0,1 (9)	2,3 ± 0,2 (6)	1,9 ± 0,1 (6)
TG (mg/dL)	73 ± 4,2 (8)	70 ± 3,4 (9)	75 ± 1,2 (6)	72 ± 1,2 (6)
Glicose (mg/dL)	76 ± 3,5 (8)	79 ± 3,1 (9)	70 ± 6,4 (6)	77 ± 6,4 (6)
Insulina (ng/dL)	0,2 ± 0,04 (4)	0,3 ± 0,04 (5)		
VLDL-C (mg/dL)	3,5 ± 0,3 (3)	2,7 ± 0,6 (3)	3,7 ± 0,3 (3)	6,4 ± 0,7 (5) ^d
LDL-C (mg/dL)	10,7 ± 1,1 (3)	14,6 ± 0,2 (3) ^a	9,3 ± 0,1 (3)	16,7 ± 1,1 (5) ^e
HDL-C (mg/dL)	47,4 ± 1,9 (3)	33,1 ± 0,8(3) ^b	86,7 ± 0,9(3)	77,2 ± 1,6(5) ^f
CETP exo. (%)	30 ± 2,9 (8)	27 ± 3,8 (8)		
CETP end. (%)	44 ± 2,3 (6)	53 ± 2,1 (7) ^c		
LH (nmoles/mL/h)	392 ± 62 (6)	348 ± 59 (8)	606 ± 78 (3)	1183 ± 203 (4) ^g

COL e C:colesterol, AGL: ácidos graxos livres, TG: triglicérides, CETP exo.: atividade da CETP com substrato exógeno, CETP end.: atividade da CETP com substrato endógeno, LH: lipase hepática. Média ± ep, (n) representa o número de animais ou número de pools de amostras. Comparações entre sham vs. castrado de cada grupo. Teste "t" de Student: ^a p=0,025, ^b p=0,002, ^c p=0,06, ^d p=0,001, ^e p=0,003, ^f p=0,06, Mann Whitney: ^g p=0,01.

Tabela III. Tempo de residência e taxa fracional de remoção plasmática de HDL e LDL marcadas respectivamente com ^{125}I e ^{131}I injetadas intraperitonealmente em camundongos machos CETP Tg castrados e pseudo-operados (sham).

	Tempo de Residência		Taxa Fracional de Remoção	
	HDL	LDL	HDL	LDL
Sham	$4,4 \pm 0,2$ (5)	$5,0 \pm 0,1$ (4)	$0,170 \pm 0,04$ (5)	$0,114 \pm 0,03$ (4)
Castrados	$3,7 \pm 0,3$ (4)	$5,1 \pm 0,2$ (4)	$0,195 \pm 0,04$ (4)	$0,083 \pm 0,03$ (4)

HDL: Lipoproteína de alta densidade, LDL: Lipoproteína de baixa densidade. (n) número de animais
 O tempo de residência foi calculado como área sob a curva e a taxa fracional de remoção plasmática como a inclinação da porção descendente da curva de radioatividade no plasma ao longo do tempo.

Tabela IV. Peso corporal e de órgãos de camundongos CETP transgênicos machos e fêmeas, tratados com placebo (PL), Androgenol (AN) e Durateston (DT).

	Machos			Fêmeas		
	PL	AN	DT	PL	AN	DT
Peso corpóreo inicial (g)	23 ± 0,4	22 ± 0,5	23 ± 0,8	20 ± 0,5	19 ± 0,4	20 ± 0,4
Peso corpóreo final (g)	24 ± 0,4	23 ± 0,3	24 ± 0,7	20 ± 0,5	19 ± 0,3	20 ± 0,2
Par de adrenais (mg)	4,7 ± 0,2	4,1 ± 0,4	3,8 ± 0,4	6,7 ± 0,3	5,4 ± 0,6	5,0 ± 0,4 ^a
Tecido adiposo perigonadal (% peso do corpo)	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Fígado (% peso do corpo)	4,3 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1
Par de testículos (% peso do corpo)	0,9 ± 0,03	0,9 ± 0,02	0,8 ± 0,01			
Par de ovários (mg)				5,9 ± 0,9	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,3
número de animais utilizados	6	7	8	6	7	7

Média ± ep. ANOVA: p=0,0499, seguida do teste de Tukey-Kramer: ^a p<0,05, DT vs. PL

Tabela V. Peso corporal e de órgãos de camundongos não transgênicos machos, tratados com placebo (PL) e Durateston (DT).

	PL	DT
Peso corpóreo inicial (g)	27 ± 1,7	28 ± 1,1
Peso corpóreo final (g)	26 ± 1,2	26 ± 0,7
Par de adrenais (mg)	3,5 ± 0,1	4,2 ± 0,4
Tecido adiposo perigonadal (% peso do corpo)	0,3 ± 0,07	0,4 ± 0,1
Fígado (% peso do corpo)	4,1 ± 0,05	4,1 ± 0,04
Par de testículos (% peso do corpo)	0,7 ± 0,01	0,7 ± 0,05
número de animais utilizados	4	5

Média ± ep.

Tabela VI. Concentração plasmática de lipídeos, glicose, insulina, lipoproteínas, atividade da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e lipase hepática (LH) em camundongos CETP transgênicos fêmeas tratadas com placebo (PL), Androgenol (AN) e Durateston (DT).

	PL	AN	DT
COL (mg/dL)	66 ± 3,1 (6)	67 ± 2,0 (7)	67 ± 1,6 (7)
AGL (nmol/L)	1,8 ± 0,1 (6)	1,3 ± 0,2 (7)	1,4 ± 0,2 (7)
TG (mg/dL)	92 ± 8,0 (6)	64 ± 13 (7)	74 ± 6,8 (7)
Glicose (mg/dL)	94 ± 5,4 (6)	94 ± 6,0 (7)	81 ± 6,6 (7)
Insulina (ng/dL)	0,30 ± 0,08 (6)	0,20 ± 0,02 (7)	0,30 ± 0,02 (7)
VLDL-C (mg/dL)	4,6 ± 0,3 (3)	4,7 ± 0,9 (3)	6,2 ± 0,5 (3)
LDL-C (mg/dL)	19,2 ± 1,1 (3)	19,6 ± 0,5 (3)	21,1 ± 2,6 (3)
HDL-C (mg/dL)	42,6 ± 1,0(3)	41,7 ± 0,7(3)	40,2 ± 2,6(3)
CETP exo. (%)	20 ± 2 (6)	17 ± 2 (7)	29 ± 5 (7)
LH (nmoles/mL/h)	1442 ± 110 (6)	1503 ± 120 (7)	1424 ± 70 (7)

COL e C: colesterol, AGL: ácidos graxos livres, TG: triglicérides, CETP exo.: atividade da CETP com substrato exógeno, LH: lipase hepática. Média ± ep, (n) representa o número de animais ou número de pools de amostras.

Tabela VII. Concentração plasmática de lipídeos, glicose, insulina, lipoproteínas, atividade da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e lipase hepática (LH) em camundongos machos CETP transgênicos (nTg) e não transgênicos (não-Tg) tratados com placebo (PL), Androgenol (AN) e Durateston (DT).

	CETP Tg			Não-Tg		
	PL	AN	DT	PL	DT	
COL (mg/dL)	74 ± 1,1 (6)	65 ± 1,5 (8) ^a	71 ± 2,9 (7)	95 ± 3,7 (4)	103 ± 7,3 (5)	
AGL (nmol/L)	1,2 ± 0,1 (6)	1,3 ± 0,1 (8)	1,2 ± 0,1 (7)	1,0 ± 0,1 (4)	0,8 ± 0,1 (5)	
TG (mg/dL)	72 ± 6,4 (6)	63 ± 5,0 (8)	90 ± 15 (7)	59 ± 5,0 (4)	60 ± 3,1 (5)	
Glicose (mg/dL)	94 ± 7,1 (6)	98 ± 5,6 (8)	92 ± 4,8 (9)	86 ± 8,8 (4)	105 ± 9,3 (5)	
Insulina (ng/dL)	0,25 ± 0,06 (5)	0,20 ± 0,04 (8)	0,30 ± 0,04 (7)			
VLDL-C (mg/dL)	3,1 ± 0,6 (4)		2,5 ± 0,3 (4)	1,9 ± 0,9 (4)	2,7 ± 0,7 (5)	
LDL-C (mg/dL)	16,8 ± 1,6 (4)		17,5 ± 1,7(4)	8,1 ± 2,1 (4)	14 ± 0,8 (5) ^b	
HDL-C (mg/dL)	54,0 ± 2,2 (4)		51,1 ± 2,1(4)	85 ± 2,4 (4)	86,7 ± 1,1 (5)	
CETP exo. (%)	18 ± 2,0 (6)	23 ± 2,0 (8)	28 ± 5,0 (7)			
CETP end. (%)	42 ± 2,9 (3)		49 ± 3,0 (3)			
LH (nmoles/mL/h)	1446 ± 89 (6)	1503 ± 120 (7)	1424 ± 70 (7)	613 ± 139 (4)	425 ± 36 (6)	

COL e C: colesterol, AGL: ácidos graxos livres, TG: triglicérides, CETP exo.: atividade da CETP com substrato exógeno, CETP end.: atividade da CETP com substrato endógeno, LH: lipase hepática. Média ± ep, (n) representa o número de animais ou número de amostras.

^a ANOVA, p=0,01 seguida do teste Tukey-Kramer, AN vs. PL, p<0,05.

^b Teste "t" de Student, p=0,03.

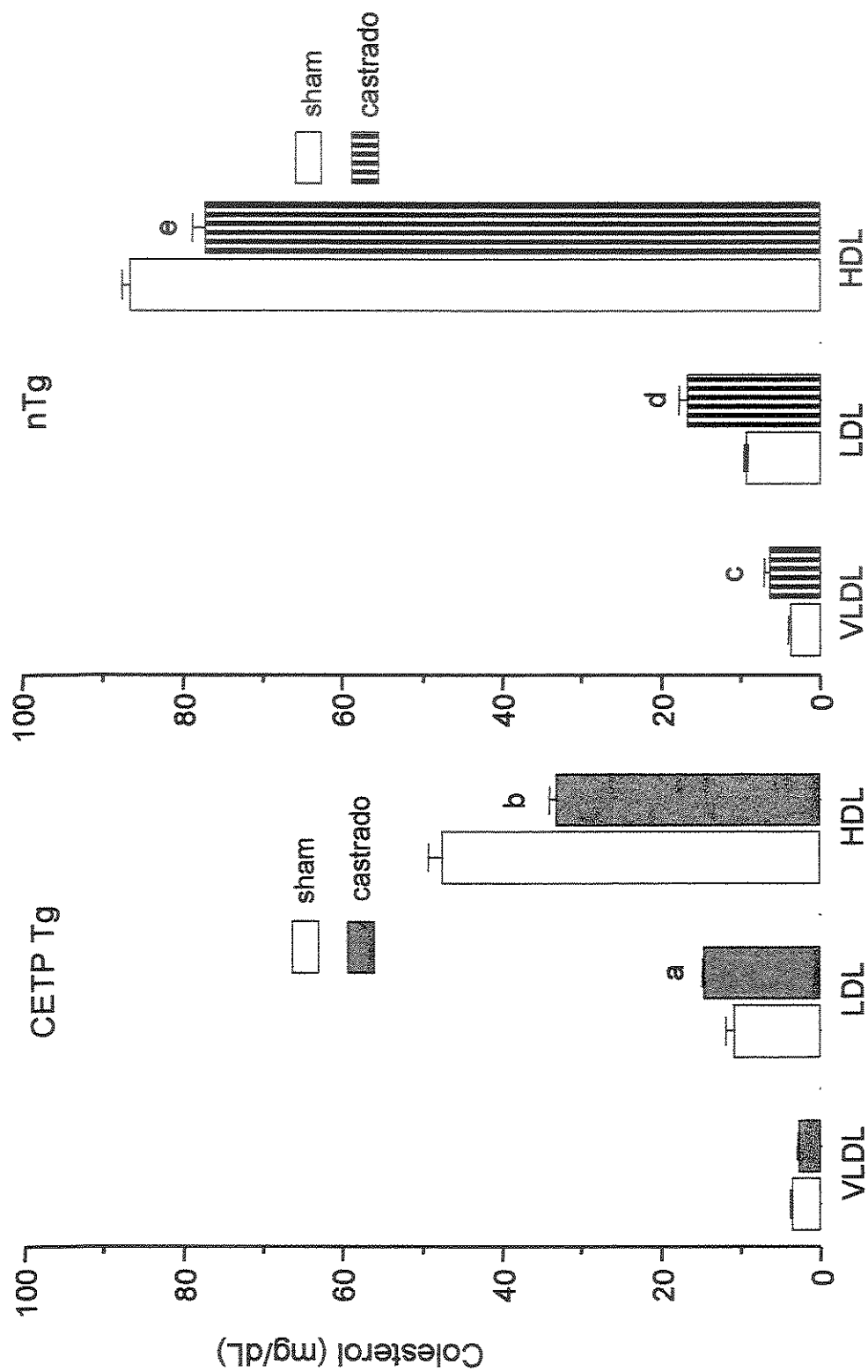


Figura 1- Perfil lipoprotéico de camundongos CELP Tg e nTg machos castrados e sham-operados. Teste "t" de Student: a $p=0,02$, b $p=0,002$, c $p=0,06$, d $p=0,001$, e $p=0,003$.

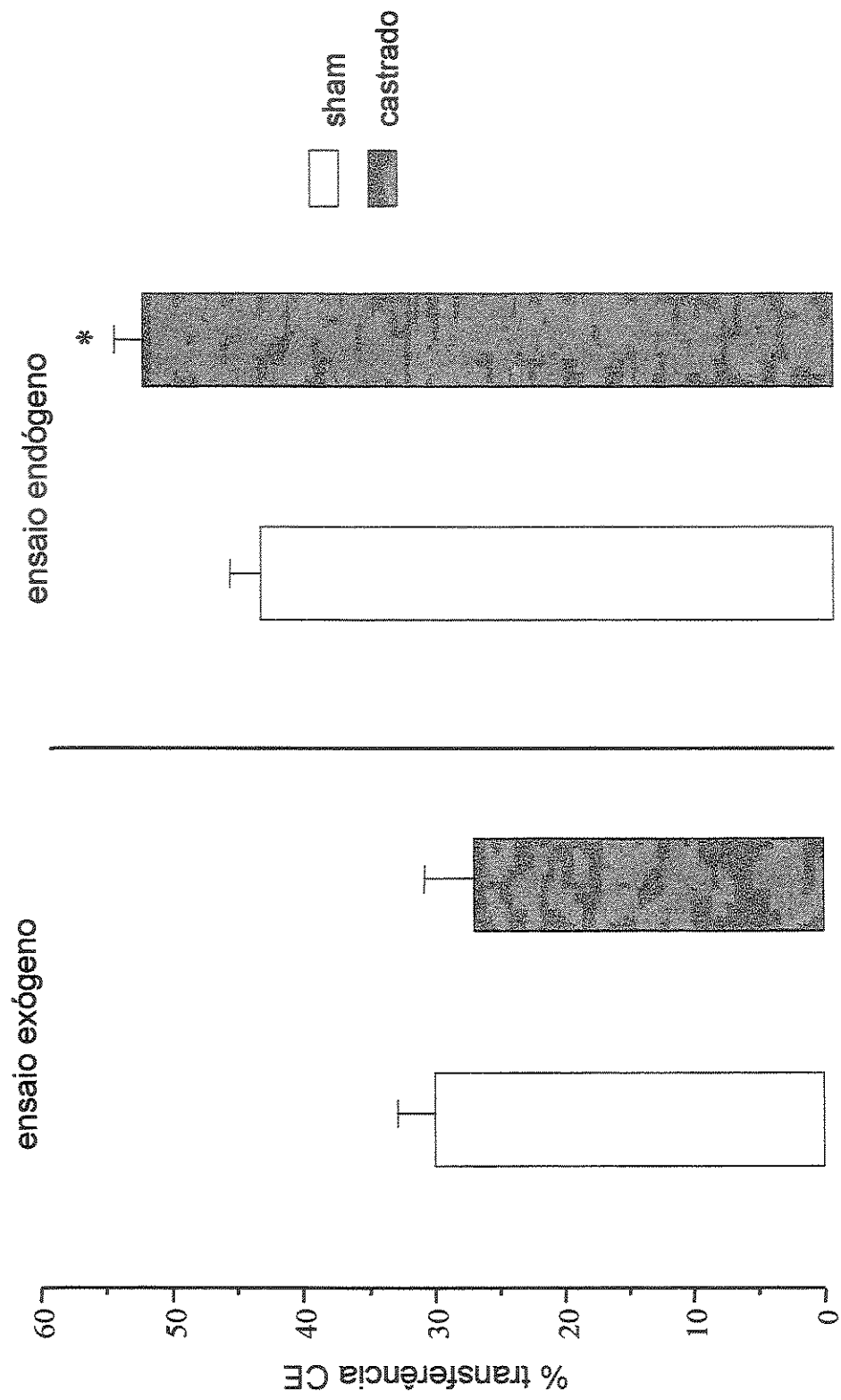
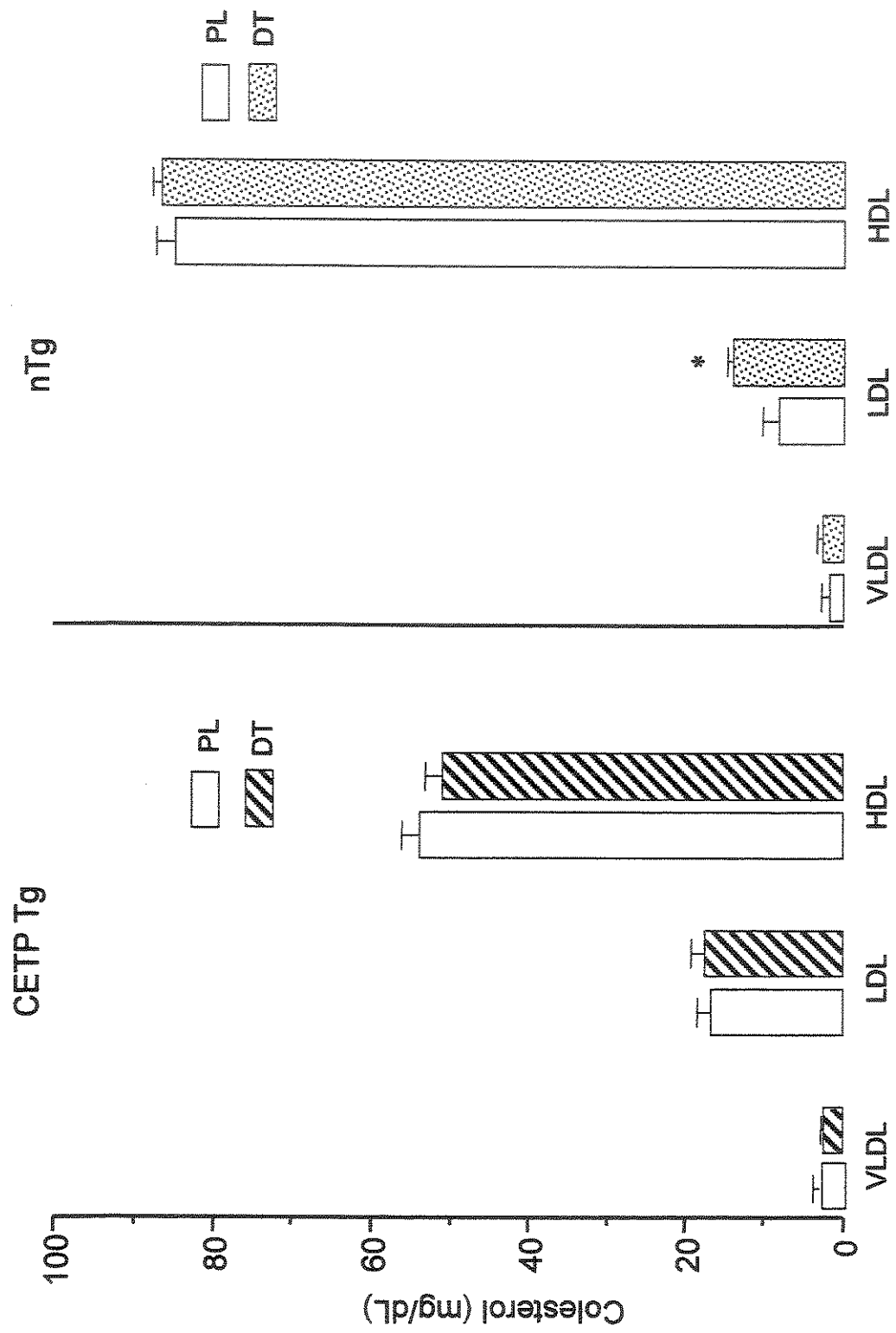


Figura 2-Atividade da CETP no plasma de camundongos CETP Tg machos castrado e sham-operados. Mann Whitney *p=0,01



32 Figura 3- Perfil lipoprotéico de camundongos CETP Tg e nTg machos suplementados com Durateston (DT) e propileno glicol (PL)
 Teste "t" de Student: * p=0,03

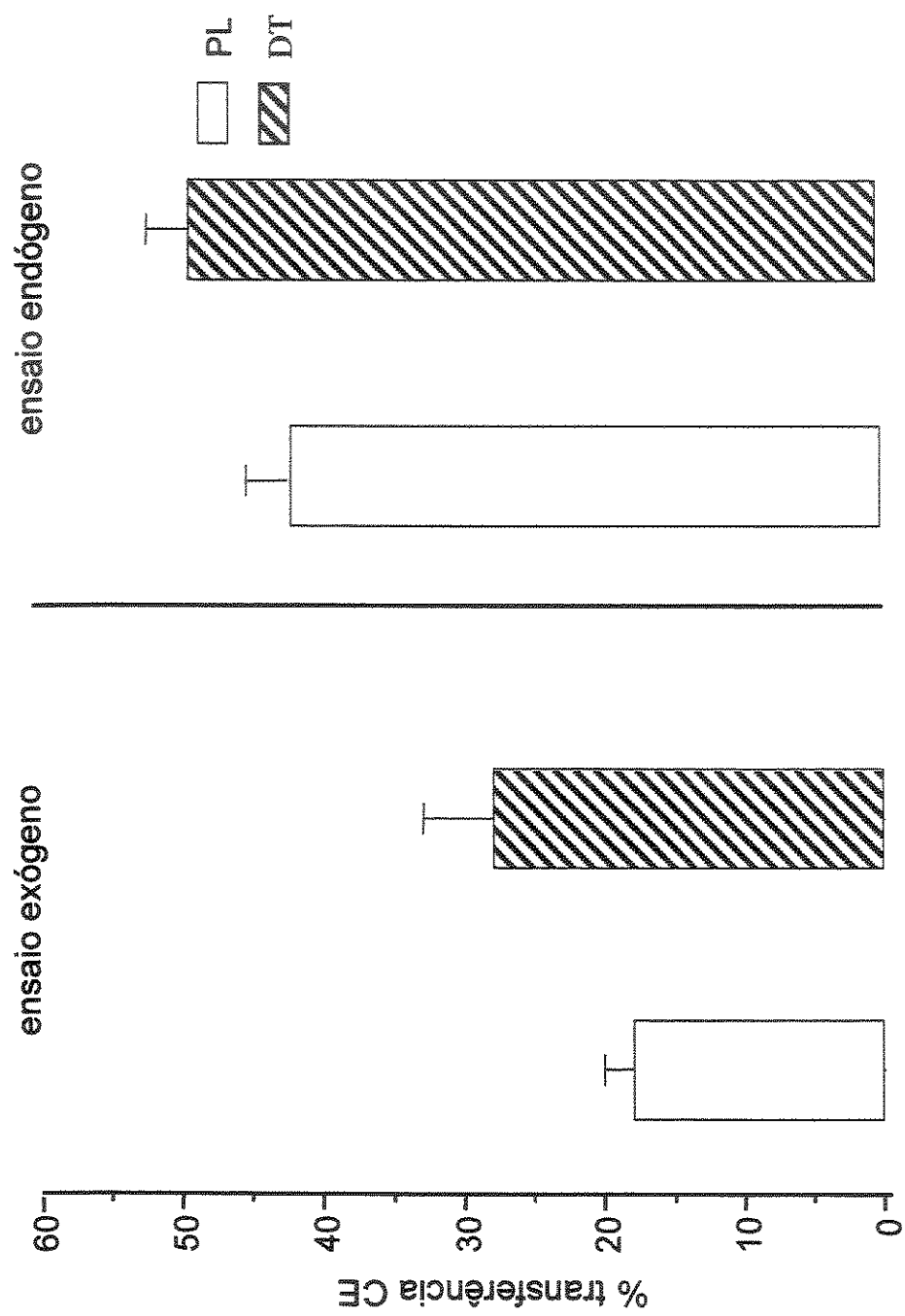


Figura 4- Atividade da CETP no plasma de camundongos CETP Tg machos suplementados com Durateston (DT) e propileno glicol (PL). CE: colesteril-éster

DISCUSSÃO

O gênero é considerado um determinante independente de risco de doenças cardiovasculares em seres humanos. Mulheres pré-menopausadas têm menor risco de desenvolver doença cardiovascular que homens, os quais possuem níveis mais altos de triglicérides e VLDL-colesterol e menor concentração de HDL-colesterol que mulheres (Heiss et al. 1980).

Em estudos epidemiológicos (Gordon e Rifkind, 1989) e em modelos animais (Paszty et al. 1994, Rubin et al. 1991) têm-se demonstrado que níveis reduzidos de HDL plasmático aumentam os riscos de formação de lesões ateroscleróticas. A HDL tem uma função importante na homeostase do colesterol devido a sua habilidade de removê-lo das membranas celulares para o compartimento plasmático e subsequentemente para o fígado, único sítio de eliminação do colesterol do organismo (Fielding e Fielding, 1995). Em contraste, elevados níveis plasmáticos de LDL-colesterol e apolipoproteína B são fatores de risco primários para desenvolvimento de aterosclerose (Heiss et al., 1980; Kannel et al., 1988; Pedersen et al., 2001).

Ratos e camundongos diferem dos seres humanos em vários aspectos do metabolismo das LP. Eles têm maior número de receptores de LDL, não expressam CETP, e exibem níveis elevados de PLTP e de LPL e LH circulantes (Nunes et al., 2001). Neles, a alta razão da HDL para LDL pode contribuir para a resistência natural destas espécies à formação de lesões vasculares com acúmulo lipídico.

Neste trabalho, investigamos os efeitos da testosterona sobre os níveis de lípidos e lipoproteínas plasmáticas em camundongos transgênicos que expressam a proteína CETP, resultando em um perfil lipídico mais semelhante ao dos seres humanos. O estado de deficiência da testosterona foi induzido por orquidectomia, enquanto o excesso da

testosterona foi estudado em machos e fêmeas tratados com doses suprafisiológicas deste hormônio. Os dois estados experimentais não levaram a variações significativas dos níveis de colesterol total, triglicérides, ácidos graxos livres e glicose no plasma. No entanto, tanto a deficiência como a suplementação de testosterona, induziram modificações qualitativas na distribuição do colesterol nas frações de lipoproteínas plasmáticas.

Verificamos que em termos relativos, a deficiência de testosterona nos animais não-Tg teve um efeito potente em modificar o nível das apo B – LP: aumento de 73 % da VLDL e 79 % da LDL, enquanto uma pequena mas significativa redução de 11 % foi observada na fração HDL. Nos animais CETP Tg castrados observamos aumento de 36 % da LDL e redução de 30 % da HDL.

Vários autores (Oppenheim et al., 1989; Alexandersen et al., 1999; Haug et al., 1985; Uyanik et al., 1997; Heiss et al., 1980) relataram aumento da fração LDL-colesterol em situações de deficiência de testosterona em diferentes espécies, tais como seres humanos hipogonádicos, coelhos e ratos castrados. Camundongos deficientes em apo E (*knockout*) castrados, machos e fêmeas, apresentaram maior concentração de LDL-colesterol quando comparados aos castrados e tratados, respectivamente, com testosterona e estradiol (Elhage et al. 1997). No entanto, nos machos castrados não houve variação da HDL-colesterol. Os fatores que poderiam teoricamente estar envolvidos na elevação de LDL são: 1) diminuição da sua captação tecidual por diminuição de seus receptores específicos e 2) aumento da conversão de VLDL em LDL no plasma através das enzimas lipoprotéica lipase periférica (LPL) e lipase hepática (LH). Em nosso trabalho não detectamos alteração da LH nos animais CETP Tg castrados, mas uma tendência de elevação da LH foi verificada nos não-Tg castrados. A concentração plasmática de TG no jejum é um indicador direto da atividade da LPL. Como não houve alteração de TG com a

castração, deduzimos que a atividade da LPL não estava alterada. Em estudo cinético das lipoproteínas marcadas radioativamente verificamos que a taxa fracional de remoção plasmática da LDL estava diminuída em 30 % nos animais CETP Tg castrados, sugerindo que os níveis plasmáticos desta fração estavam aumentados, por diminuição de seus receptores hepáticos. No entanto, Tang et al. (1991) mostraram que o RNAm do receptor de LDL não estava alterado por tratamento com testosterona em camundongos C57Bl/6 castrados. Também, Croston et al. (1997) mostraram que a transcrição do gene do receptor da LDL não é modificada por agonistas de receptores de andrógenos, porém estes suprimem a estimulação da transcrição mediada por estrógenos.

Os níveis de HDL podem ser negativamente influenciados pela atividade da CETP (Tall, 1995) e da LH (Thuren, 2000). Tanto a CETP (ensaio exógeno) como a LH não variaram nas situações experimentais. Assim, a diminuição da concentração da HDL nos animais CETP Tg castrados não pode ser atribuída à variação da quantidade de CETP ou atividade da LH. Entretanto, a atividade endógena da CETP estava aumentada em 20 %. Este ensaio reflete a influência dos substratos na reação da CETP, indicando que o aumento de LP aceptoras (LDL) levou a um aumento da reação de transferência de CE, resultando em diminuição mais pronunciada da LP doadora (HDL). A diminuição da fração de HDL-colesterol observada poderia ainda ser atribuída a outros fatores independentes da CETP e da LH. Tang *et al.* (1991) relataram uma diminuição da síntese hepática da apolipoproteína A-I em camundongos machos castrados, o que reduziria a secreção de HDL para o plasma. Quando fêmeas de duas linhagens, C57Bl/6J e C3H/HeJ, foram castradas e tratadas com testosterona (Tang et al. 1991 a e 1991 b) houve aumento da expressão da apo AI por aumento do RNAm polissomal e consequente da síntese de apo AI, porém não houve alteração da concentração plasmática de HDL-colesterol em relação aos controles (fêmeas

castradas e tratadas com placebo). Todavia, segundo Breslow (1989), as diferenças nos níveis de HDL na população geral são inversamente relacionadas com a velocidade de catabolismo da apo-AI e apo-AII e não associadas com suas velocidades de síntese. Para investigar este aspecto, injetamos HDL marcada com ^{125}I e acompanhamos seu desaparecimento do plasma. Embora os resultados não tenham atingido significância estatística, houve um aumento de 15 % da taxa fracional de remoção da HDL e redução de 15 % do tempo de residência desta partícula no plasma dos camundongos CETP Tg castrados. Juntos, a elevação da velocidade de remoção plasmática (+15 %) e o aumento da reação mediada pela CETP (+20 %) podem explicar a redução da concentração de HDL no plasma dos animais CETP Tg castrados (-30%). Assim, podemos também deduzir que nos animais não-Tg, a variação da concentração de HDL foi menor (-11 %) em consequência de alteração apenas da velocidade de remoção da HDL, já que eles não expressam CETP. Poderíamos especular que o aumento da remoção da HDL pode ser consequência do aumento dos receptores da partícula inteira ou de remoção especificamente de seu colesterol esterificado, processo denominado de captação seletiva de colesterol esterificado, o qual é mediado pelos receptores SR-BI. No entanto, a regulação da expressão do SR-BI envolve combinações variadas e complexas de fatores de transcrição em diferentes tipos celulares. Por exemplo, o estrógeno induz ativação da expressão do SR-BI em macrófagos hepáticos enquanto a suprime nos próprios hepatócitos (Trigatti et al. 2000). Por outro lado, as gonadotrofinas (hCG, FSH, LH) estimulam a expressão do SR-BI nos testículos mas não no fígado e adrenais (Landschulz et al. 1996).

Haug et al. (1985) demonstraram que em ratos castrados, os níveis de apolipoproteína E estavam aumentados na fração HDL2b. Esta apolipoproteína possui uma grande afinidade pelos receptores de LDL e LRP. Isso poderia levar a um aumento da

captação da HDL plasmática por estas vias. No entanto, isso não é provável, uma vez que levaria a uma redução de todas as LP e não apenas da HDL.

A suplementação com testosterona em machos e fêmeas CETP Tg não modificou significativamente seus perfis de lipoproteínas plasmáticas, exceto por um discreto aumento de 35 % na fração de VLDL-colesterol das fêmeas. Contudo, os machos não-Tg responderam à suplementação com testosterona elevando significativamente a concentração de LDL-colesterol.

Buckler et al. (1997) mostraram que mulheres pré-menopausa tratadas com baixas doses de testosterona apresentaram níveis de VLDL-colesterol aumentados e diminuição dos níveis de HDL-colesterol e apo A-I. Redução dos níveis de HDL-colesterol após suplementação com testosterona também tem sido consistentemente observada em homens saudáveis e atletas (Bagatell et al., 1994; Anderson et al., 1995; Webb et al., 1984).

Em camundongos, o efeito da testosterona é dependente do gênero e da linhagem genética. Testosterona administrada em camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6, sejam intactas (Paigen et al. 1987) ou castradas (Tang et al. 1991a), não induziu qualquer modificação da concentração de HDL-colesterol, embora tenha resultado em aumento de síntese hepática de apo AI (Tang et al. 1991a, 1991b). Em contrapartida, fêmeas C3H castradas e tratadas com testosterona exibiram redução da concentração de HDL-colesterol (Tang et al. 1991a).

Por outro lado, van Vlijmen et al. (1996) mostraram que a administração de testosterona a fêmeas hiperlipidêmicas que expressam uma apo E mutada, a apoE3 Leiden, promoveu aumento do clearance de VLDL e redução da concentração de VLDL+LDL, sem alterar a concentração de HDL. Ainda, fêmeas hiperlipidêmicas por deficiência de apo E,

quando castradas e tratadas com testosterona, mostraram aumento de HDL-colesterol (Elhage, 1997).

A discrepância entre todos estes resultados muito provavelmente deve-se aos mesmos fatores genéticos que levam as diferentes linhagens de camundongos a exibirem perfis de lipoproteínas plasmáticas distintos na condição basal.

As razões pelas quais a expressão da CETP protegeu os camundongos transgênicos contra a elevação das LDL observada nos não-transgênicos em resposta à suplementação com testosterona não são claras e merecem investigações adicionais.

É importante lembrar que os resultados obtidos neste e nos vários estudos citados podem ser consequência de metabólitos da testosterona, isto é, de estrógenos derivados da aromatização da testosterona pela enzima aromatase, a qual ocorre não só no ovário mas também no fígado, tecido adiposo, córtex da adrenal e parede arterial (Wilson et al., 1998; Simpson et al., 1999). Friedl et al. (1990) observaram aumento de estradiol em homens tratados com testosterona quando comparados aos tratados com testosterona + testolactona (inibidor da aromatização da testosterona) ou com metiltestosterona (andrógeno que não é metabolizado em estradiol). Recentemente, Nathan et al. (2001) mostraram que a administração de um inibidor da aromatização de testosterona a camundongos machos hipercolesterolêmicos aumentou a formação de lesões ateroscleróticas tanto quanto a castração destes animais. Em contraprova, a administração de testosterona aos animais castrados reduziu a formação das lesões tanto quanto a administração de estradiol. Estes resultados indicam que a testosterona atenuou o desenvolvimento da aterosclerose por ser convertida em estrógeno pela aromatase expressa na parede do vaso.

CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos resultados mostram que a resposta do perfil lipídico de camundongos às variações da concentração plasmática de testosterona é dependente da expressão da CETP. A deficiência da testosterona provoca aumento de lipoproteínas que contém apo B e, dependendo da presença de CETP, também ocorre redução pronunciada de HDL. Por outro lado, doses supra-fisiológicas de testosterona elevam as lipoproteínas que contém apo B somente em camundongos que não expressam a CETP. Estas modificações do perfil de lipoproteínas plasmáticas observadas, tanto frente à deficiência quanto ao excesso de testosterona, são consideradas aterogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGELLON, L.B.; WALSH, A.; HAYEK, T. *et al.* (1991). Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J. Biol.Chem.* **266**:10796-10801.
- ALEXANDERSEN, P.; HAARBO, J.; BYRJALSEN, I.; LAWAETZ, H.; CHRISTIANSEN, C. (1999). Natural androgens inhibit male atherosclerosis. A study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.* **84**:813-819.
- ANDERSON, R.A.; WALLACE, E.M.; WU, F.C.M. (1995). Effect of testosterone enanthate on serum lipoproteins in man. *Contraception.* **52**:115-119.
- ASSMANN, G. (2001). Pro and con: high-density lipoprotein, triglycerides, and other lipid subfractions are the future of lipid management. *Am. J. Cardiol.* **87**:2B-7B.
- BAGATELL, C.J.; KNOPP, R.H.; VALE, W.W.; RIVIER, J.E.; BREMNER, W.J. (1992). Physiologic testosterone levels in normal men suppress high-density lipoprotein cholesterol levels. *Ann. Int. Med.* **116**:967-973.
- BAGATELL, C.J.; HEIMAN, J.R.; MATSUMOTO, A.M.; RIVIER, J.E.; BREMNER, W.J. (1994). Metabolic and behavioral effects of high-dose, exogenous testosterone in healthy men. *J.Clin. Endocr. Metab.* **79**:561-567.

- BAGATELL, C.J. & BREMNER, W.J. (1995). Androgen and progestagen effects on plasma lipids. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **38**:255-271.
- BARRETT-CONNOR, E. (1992). Lower endogenous androgen levels and dyslipidemia in men with non-insulin-dependent *diabetes mellitus*. *Ann. Intern. Med.* **117**: 807-811.
- BHATNAGAR, D.; DURRINGTON, P.N.; CHANNON, K.M.; PRAIS, H.; MACKNESS, M.I. (1993). Increased transfer of cholesteryl ester from high density lipoprotein to low density and very density lipoproteins in patients with angiographic evidence of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. **98**:25-32.
- BILEZIKIAN, J.P.; MORISHIMA, A.; BELL, J.; GRUMBACH, M.M. (1998). Increased bone mass as a result of estrogen therapy in man with aromatase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **339**:599-603.
- BILHEIMER, D.W.; EISENBERG, S.; LEVY, R.I. (1972). The metabolism of very low density lipoprotein proteins. Preliminary *in vitro* observations. *Biochim. Biophys. Acta*. **260**:212-221.
- BOUCHARD, C.; DESPRES, J.P.; MAURIEGE, P. (1993). Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr. Rev.* **14**:72-93.

- BRESLOW JL. (1989). In: *The metabolic basis of inherited disease*. Scriver CR & Beaudet AL (eds.), Mc Graw-Hill, N.York.
- BRESLOW JL. (1993) Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:8314-8318.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. **232**:34-47.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1997). The SREBP pathway regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. **89**:331-340.
- BUCKLER, H.M.; McELHONE, K.; DURRINGTON, P.N.; MACHNESS, C.A.; LUDLAM, C.A.; WU, F.C.W. (1997). The effects of low-dose testosterone treatment on lipid metabolism, clotting factors and ultrasonographic ovarian morphology in women. *Clin. Endocrinol.* **49**:173-178.
- CARANI, C.; QIN, K.; SIMONI, M.; FAUSTINI-FUSTINI, M.; SERPENTE, S.; BOYD, J.; KORACH, K.; SIMPSON, E.R. (1997). Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *New Engl. J. Med.* **337**:91-95.
- COHEN, J.; VEGA, G.L.; GRUNDY, S.M. (1999). Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr. Opin. Lipidol.* **3**:259-268.

- CONTE, F.A.; GRUMBACH, M.M.; ITO, Y.; FISHER, C.R.; SIMPSON, E.R. (1994). A syndrome of female pseudohermaphroditism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**:1287-1292.
- CROSTON, G.E.; MILAN, L.B.; MARSCHKE, K.B.; REICHMAN, M.; BRIGGS, M.R. (1997). Androgen receptor-mediated antagonism of estrogen-dependent low density lipoprotein receptor transcription in cultured hepatocytes. *Endocrinol.* **138**:3779-3786.
- EHNHOLM, C. & KUUSI, T. (1986). Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol.* **129**:716-738.
- EISENBERG, S. (1984). High density lipoprotein metabolism *J. Lipid Res.* **25**:1017-1058.
- ELHAGE, R.; ARNAL, J.F.; PIERAGGI, M.T.; DUVERGER, N.; FIÉVET, C.; BAYARD, F. (1997). 17 β -Estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* **17**:2679-2684.
- FIELDING, C.J. & FIELDING, P.E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **36**:211-28.

FOGER, B.; CHASE, M.; AMAR, M.J.; VAISMAN, B.L.; SHAMBUREK, R.D.; PAIGEN, B.; FRUCHART-NAJIB, J.; PAIZ, J.A.; KOCH, C.A.; HOYT, R.F.; BREWER, H.B.; SANTAMARIA-FOJO, S. (1999). Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoprotein and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **274**:36912-36920.

FRANCONE, O.L.; GONG, E.L.; NG, D.S.; FIELDING, C.J.; RUBIN, E.M. (1995).

Expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase in transgenic mice. Effect of human apolipoprotein AI and human apolipoprotein AII on plasma lipoprotein cholesterol metabolism. *J. Clin. Invest.* **96**:1440-1448.

FREEDMAN, D.S.; O'BRIEN, T.R.; FLANDERS, W.D.; DE STEFANO, F.; BARBORIAK, J.J. (1991). Relation of serum testosterone levels to high density lipoprotein cholesterol and other characteristics in men. *Arterioscler. Thromb.* **11**:307-315.

FRISCH, F. & SUMIDA, K.D. (1999). Temporal effects of testosterone propionate injections on serum lipoprotein concentrations in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* **31**:664-669.

FRIEDL, K.E.; HANNAN, C.J.; JONES, R.E.; PLYMATE, S.R. (1990). High-density lipoprotein cholesterol is not decreased if an aromatizable androgen is administered. *Metabolism.* **39**:69-74.

- GORDON, D.J.; RIFKIND, B.M. (1989). Current concepts: high density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N. Engl. J. Med.* **321**:1311-1316.
- GRAINGER, D.J.; WITCHELL, C.M.; METCALFE, J.C. (1995). Tamoxifen elevates transforming growth factor- β and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat. Med.* **1**:1067-1073.
- GREGER, N.G.; INSULL, W.; PROBSTFIELD, J.L.; KEENAN, B.S. (1990). High-density lipoprotein response to 5- α -dihydrotestosterone and testosterone in *Macaca fascicularis*: A hormone-responsive primate model for the study of atherosclerosis. *Metabolism.* **39**:919-924.
- HADDAD, I.A.; ORDOVAS, J.M.; FITZPATRICK, T.; KARATHANASIS, S.K. (1986). Linkage, evolution, and expression of the rat apolipoprotein A-I, CIII, and A-IV genes. *J. Biol. Chem.* **261**:13268-13277.
- HAUG, A.; HOSTMARK, A.T.; SPYDEVOLD, O. (1985). Responses of plasma apolipoproteins to gonadectomy and androgen substitution in male rats. *Horm. Metabol. Res.* **17**:641-645.
- HAVEL RJ., EDER HA., GRAGDON JH.. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J.Clin. Invest.* **34**: 1345-1353.

- HAYEK, T.; MASUCCI-MAGOULAS, L.; JIANG, X.; WALSH, A.; RUBIN, E.;
BRESLOW, J.L.; TALL, A.R. (1995). Decreased early atherosclerosis lesions in
hypertriglyceridemic mice expressing ester transfer protein transgene. *J. Clin. Invest.*
96:2071-2074.
- HEISS, G.; TAMIR, I.; DAVIS, C.E.; *et al.* (1980). Lipoprotein-cholesterol distribution in
North American populations: The Lipid Research Clinics program prevalence study.
Circulation. **61**:302-315.
- HERZ, J.; HAMANN, U.; ROGNE, S.; MYKLEBOST, O.; GAUSEPOHL, H.;
STANLEY, K.K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kDa
liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological
role as lipoprotein receptor. *EMBO. J.* **7**:4119-4127.
- HINKEL, G.K.; HANEFELD, M.J.; JAROSS, W.; LEONHARDT, W.; TRÜBSBACH, A.
(1985). Effects of high doses of oestrogens and androgens on lipoproteins:
observations in the treatment of excessive growth with sexual hormones. *Exp. Clin.*
Endocrinol. **86**:17-25.
- HIRANO, K.; YAMASHITA, S.; MATSUZAWA, Y. (2000). Pros and cons of inhibiting
cholesterol ester transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**:589-596.

- HOFMANN, S.L.; RUSSEL, D.W.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L.; HAMMER, R.E. (1988). Overexpression of low density lipoprotein (LDL) receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. *Science*. **239**:1277-1281.
- HUSSAIN, M.M. & ZANNIS, V.I. (1990). Intracellular modification of human apolipoprotein AII (apoAII) and sites of apoAII mRNA synthesis: comparison of apoAII with apoCII and apoCIII isoproteins. *Biochemistry*. **29**:209-217.
- HUUSKONEN, J. & EHNHOLM, C. (2000). Phospholipid transfer protein in lipid metabolism.. *Curr.Opin. Lipidol*. **11**:285-289.
- INAZU, A.; KOIZUMI, J.; MABUCHI, H. (2000). Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol*. **11**:389-396.
- JIANG, X.C.; AGELON, L.B; WALSH, A.; *et al.* (1992). Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *J. Clin. Invest*. **90**:1290-1295.
- JIAO, S.; COLE, T.G; KITCHENS, R.T; PFLEGER, B.; SCHONFELD, G. (1990). Genetic heterogeneity of lipoprotein in inbred strain of mice: analysis by gel-permeation chromatography. *Metab. Clin. Exp*. **39**:155-160.
- KANNEL, W.B. (1988). Cholesterol and risk of coronary heart disease and mortality in men and women. *Clin.Chem*. **34**:B53-B59.

- KIRKLAND, A.H.; KEENAN, B.S.; PROBSTFIELD, J.L.; *et al.* (1987). Decrease in plasma high density lipoprotein cholesterol levels at puberty in boys with delayed adolescence. *JAMA*. **257**:502-507.
- KWITEROVICH, P.O.JR. (2000). The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am. J. Cardiol.* **86**:5L-10L.
- LANDSCHULZ, K.T.; PATHAK, R.K.; RIGOTTI, A.; KRIEGER, M.; HOBBS, H.H. (1996). 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**:984-995.
- LEGATO, M.J. (2000). Dyslipidemia, gender, and the role of high-density lipoprotein cholesterol: implications for therapy. *Am. J. Cardiol.* **86**:15L-18L.
- LIBBY, P. (2000). Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.* **247**:349-358.
- LUSIS, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*. **407**:233-241.
- MAROTTI, K.R.; CASTLE, C.K.; BOYLE, T.P.; LIN, A.H.; MURRAY, R.W.; MELCHIOR, G.W. (1993). Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature*. **364**:73-75.

- MASUCCI-MAGOULAS, L.; PLUMP, A.; JIANG, X.C.; WALSH, A.; BRESLOW, J.L.; TALL, A.R. (1996). 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**:154-161.
- McFARLANE, A.S. (1958). Efficient trace-labelling of protein with iodine. *Nature.* **182**:53.
- MORISHIMA, A.; GRUMBACH, M.M.; SIMPSON, E.R.; FISHER, C.; QIN, K. (1995). Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**:3689-3698.
- NATHAN, L.; SHI, W.; DINH, H.; MUKHERJEE, T.K.; WANG, X.; LUSIS, A.J.; CHAUDHURI, G. (2001). Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: Critical role of aromatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**:3589-3593.
- NAVAB, M.; BERLINER, J.A.; WATSON, A.D.; HAMA, S.Y.; TERRITO, M.C.; LUSIS, A.J.; SHIH, D.M.; van LENTEN, B.J.; FRANK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; FOGELMAN, A.M.. (1996). The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **6**:831-842.

NUNES, V.S.; QUINTÃO, E.C.R.; CAZITA, P.M.; HARADA, L.M.; FARIA, E.C.; OLIVEIRA, H.C.F. (2001). Plasma lipase and lipid transfer proteins phospholipid but not free cholesterol transfer from lipid emulsion to high density lipoproteins. *BMC Biochemistry*. 2:1-10.

OKAMOTO, H.; YONEMORI, F.; WAKITANI, K.; MINOWA, T.; MAEDA, K.; SHINKAI, H. (2000). A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature*. 406:203-207.

OLIVEIRA, H.C.F.; CHOUINARD, R.A.; AGELLON, L.B.; *et al.* (1996a). Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'distal sequences. *J. Biol.Chem.* 271:31831-31838.

OLIVEIRA, H.C.F. & QUINTÃO, E.C.R. (1996b). "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.

OPPENHEIM, D.S.; GREENSPAN, S.L.; ZERVAS, N.T.; SCHOENFELD, D.A.; KLIBANSKI, A. (1989). Elevated serum lipids in hypogonadal men with and without hyperprolactinemia. *Ann. Int. Med.* 111:288-292.

- OZATA, M.; YIDIRIMKAYA, M.; BULUR, M.; YILMAZ, K.; BOLU, E.; CORAKCL, A.; GUNDOGAN, M.A. (1996). Effects of gonadotropin and testosterone treatments on lipoprotein(a), high density lipoprotein particles, and other lipoprotein levels in male hypogonadism. *J. Clin. Endocr. Metab.* **81**:3372-3378.
- PAIGEN, B.; HOLMES, P.A.; MITCHELL, D.; ALBEE, D. (1987). Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c and C3H. *Atherosclerosis.* **64**:215-221.
- PASQUALI, R.; CASIMIRRI, F.; CANTOBELLI, S.; MELCHIONDA, N.; MORSELLI LABATE, A.M.; FABBRI, R.; CAPELLI, M. (1991). Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism.* **40**:101-104.
- PASZTY, C.; MAEDA, N.; VERSTUYFT, J.; RUBIN, E.M. (1994). Apolipoprotein A1 transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* **94**:899-903.
- PEDERSEN, T.R. (2001). Pro and con: low-density lipoprotein cholesterol lowering is and will be the key to the future of lipid management. *Am. J. Cardiol.* **87**:8B-12B.
- PEELMAN, F.; VANDEKERCKHOVE, J.; ROSSENEU, M. (2000). Structure and function of lecithin cholesterol acyl transferase: new insights from structural predictions and animal models. *Curr.Opin. Lipidol.* **11**:155-160.

- PHILLIPS, G.B. (1993). Relationship between serum sex hormones and the glucose-insulin-lipid defect in men with obesity. *Metabolism*. **42**:116-120.
- PLUMP, A.S.; MASUCCI-MAGOULAS, L.; BRUCE, C.; BISGAIER, C.L.; BRESLOW, J.L.; TALL, A.R. (1999). Increased atherosclerosis in Apo E and LDL receptor gene Knockout mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**:1105-1110.
- RADER, D.J. & JAYE, M. (2000). Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol.* **11**:141-147.
- RECKLESS, J.; METCALFE, J.C.; RAINGER, D.J. (1997). Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*. **95**:1542-1548.
- REDGRAVE, T.G. (1983). Formation and metabolism of chylomicrons. *Int. Rev. Physiol.* **28**:103-130.
- RITTERSHAUS, C.W.; MILLER, D.P.; THOMAS, L.J.; et al. (2000). Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity *in vivo* and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**:2106-2112.

RUBIN, E.M.; KRAUSS, R.M.; SPRANGLER, E.A.; VERSTUYFT, J.G.; CLIFT, S.M.;(1991). Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A1. *Nature*. **353**:265-267.

ROSS, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. **362**:801-809.

SANTAMARIA-FOJO, S.; LAMBERT, G.; HOEG, J.M.; BREWER, H.B.JR. (2000). Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol*. **11**:267-276.

SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. (1981). A method for the simultaneous measurement of insulin release and B-cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. **21**:470-475.

SEIDELL, J.C.; BJORNTORP, P.; KVIST, H.; SANNERSTEDT, R. (1990). Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism*. **39**:897-901.

SIMON, D.; PREZIOSI, P.; BARRET-CONNOR, E.; ROGER, M.; SAINT-PAUL, M.; NAHOUL, K.; PAPO, Z.L. (1992). The influence of aging on plasma sex hormones in men: the Telecom Study. *Am. J. Epidemiol*. **135**:783-791.

SIMPSON, E.; RUBIN, G.; CLYNE, C.; ROBERTSON, K.; O'DONNELL, O.; DAVIS, S.; JONES, M. (1999). Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrinol. Rel. Can.* **6**:131-137.

SOLYOM, A. (1971). Effect of androgens on serum lipids and lipoproteins. *Lipids.* **7**:100-105.

SORVA, R.; KUUSI, T.; TASKINEN, M.R.; PERHEENTUPA, J.; NIKKILA, E.A. (1988). Testosterone substitution increases the activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase in hypogonadal males. *Atherosclerosis.* **69**:191-197.

SRINIVASAN, G.S.; SUNDARAM, G.S.; WILLIAMSON, G.D.; WEBBER, L.S.; BERENSON, G.S. (1985). Serum lipoproteins and endogenous sex hormones in early life: observations in children with different lipoprotein profiles. *Metabolism.* **34**:861-867.

STEFANICK, M.L.; WILLIAMS, P.T.; KRAUSS, R.M.; TERRY, R.B.; VRANIZAN, K.M.; WOOD, P.D. (1987). Relationships of plasma estradiol, testosterone, and sex hormone-binding globulin with lipoproteins, apolipoproteins, and high density lipoprotein subfractions in men. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* **64**:723-729.

SUGANO, M.; MAKINO, N.; SAWADA, S.; et al. (1998). Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbit. *J. Biol. Chem.* **273**:5033-5036.

- TAI, M.M. (1994). A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care*. **17**:152-154.
- TALL, A.R. (1995). Plasma lipid transfer protein. *Ann. Rev. Biochem.* **64**:235-237.
- TAN, K.C.B.; SHIU, S.W.M.; PANG, R.W.C.; KUNG, A.W.C. (1998). Effects of testosterone replacement on HDL subfractions and apolipoprotein A-I containing lipoproteins. *Clin. Endocrinol.* **48**:187-194.
- TANG, J.; KRUL, E.S.; SCHONFELD, G. (1991a). *In vivo* regulation of apolipoprotein A-I gene expression by estradiol and testosterone occurs at the translational level in inbred strains of mice. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **181**:1407-1411.
- TANG, J.; SRIVASTAVA, R.A.K.; KRUL, E.S.; BAUMANN, D.; PFEGER, B.A.; KITCHENS, R.T.; SCHONFELD, G. (1991b). *In vivo* regulation of apolipoprotein A-I gene expression by estradiol and testosterone occurs by different mechanisms in inbred strains of mice. *J. Lipid Res.* **32**: 1571-1585.
- THOMPSON, P.D.; CULLINANE, E.M.; SADY, S.P.; CHENEVERT, C.; SARITELLI, A.L.; SADY, M.A.; HERBERT, P.N. (1989). Contrasting effects of testosterone and stanozolol on serum lipoprotein levels. *JAMA*. **261**:1165-1168.
- THUREN, T. (2000). Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**:288-283.

- TRIGATTI, B.; RIGOTTI, A.; KRIEGER, M. (2000). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 11:123-131.
- UYANIK, B.S.; ARI, Z.; GÜMÜS, B.; YIGITOGLU, M.R.; ARSLAN, T. (1997). Beneficial effects of testosterone undecanoate on the lipoprotein profiles in healthy elderly men . A placebo controlled study. *Jpn. Heart J.* 38:73-82.
- van VLIJMEN, B.J.M.; van 't HOF, H.B.; MOL, M.J.T.M.; van der BOOM, H.; van der ZEE, A.; FRANTS, R.R.; HOFKER, M.H.; HAVEKES, L.M. (1996). Modulation of very low density lipoprotein production and clearance contributes to age-and gender-dependent hyperlipoproteinemia in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97:1184-1192.
- VERMEULEN, A. & DESLYPERE, J.P. (1985). Long-term transdermal dihydrotestosterone therapy: effects on pituitary gonadal axis and plasma lipoproteins. *Maturitas.* 7:281-287.
- VERMEULEN, A. (1980). Sex hormone status of the postmenopausal woman. *Maturitas.* 2:81-89.

- von ECKARDSTEIN, A.; KLIESCH, S.; NIESCHLAG, E.; CHIRAZI, A.; ASSMANN, G.; BEHRE, H.M. (1997). Suppression of endogenous testosterone in young men increases serum levels of high density lipoprotein subclass lipoprotein A-I and lipoprotein(a). *J. Clin. Endocr. Metab.* **82**:3367-3372.
- WEBB, O.L.; LASKARZEWSKI, P.M.; GLUECK, C.I. (1984). Severe depression of high-density lipoprotein cholesterol levels in weight lifters and body builders by self-administered exogenous testosterone and anabolic-androgenic steroids. *Metabolism.* **33**:971-975.
- WILSON JD., FOSTER DW., KRONENBER HM., LARSEN PR. (1998). Willians textbook of Endocrinology, 9th edition. W.B. Saunders Company, p521.
- ZHONG S., GOLDBERG II., BRUCE C., RUBEN E., BRESLOW JL., TALL A. (1994). Human ApoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **94**:2457-2467.
- ZHONG, S.; SHARP, D.S.; GROVE, J.S.; BRUCE, C.; YANO K.; CURB, J.D.; TALL, A.R. (1996). Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J. Clin. Invest.* **97**:2917-2923.

ANEXO I

A concentração de testosterona no plasma dos animais castrados e sham-operados foi determinada em três ocasiões independentes utilizando-se dois kits diferentes, de fluorimétrico (AVALIAÇÃO I) e de quimiluminescência (AVALIAÇÃO II e III). Observou-se que estas medidas não têm valor discriminatório dos grupos. Segundo Fisher et al., as concentrações de testosterona no plasma de camundongos intactos variam entre 0,2 e 10,5 ng/mL. Segundo Tang et al., camundongos machos castrados apresentam 0,12 ng/mL e fêmeas castradas 0,10 ng/mL de testosterona circulante.

FISHER, C.R.; GRAVES, K.H.; PARLOW, A.F.; SIMPSON, E.R. (1998).

Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 6965-6970.

TANG, J.; SRIVASTAVA, R.A.K.; KRUL, E.S.; BAUMANN, D.; PFEGER, B.A.;

KITCHENS, R.T.; SCHONFELD, G. (1991b). *In vivo* regulation of apolipoprotein A-I gene expression by estradiol and testosterone occurs by different mechanisms in inbred strains of mice. *J. Lipid Res.* **32**: 1571-1585.

Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) em camundongos C57 Bl/6.

AVALIAÇÃO I	Castrados	Sham	
Camundongos			
1	<0,14	0,51	
2	<0,14	0,15	
3	<0,14	0,16	
4	<0,14	<0,14	
5	0,38		
6	<0,14		
7	<0,14		
8	<0,14		
9	<0,14		
10	0,09		
AVALIAÇÃO II	Castrados	Sham	Intactos
Camundongos			
1	<0,20	0,45	49,3
2	<0,20	0,21	<0,20
3	<0,20	<0,20	0,50
4	<0,20	<0,20	0,44
5	<0,20	<0,20	<0,20
6	<0,20	<0,20	0,26
7			31,7
8			1,45
9			1,1
10			<0,20
AVALIAÇÃO III			
Camundongos	Fêmeas intactas	Machos intactos	
1	<0,20	0,30	
2	<0,20	<0,20	

AVALIAÇÃO I: Endoclínicas de São Paulo S/C Ltda., II: Prevelab, III: Laboratório de Patologia Clínica da UNICAMP.