



ELIANE SOLER PARRA FERREIRA

COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE DA PROTEÍNA DE
TRANSFERÊNCIA DE COLESTEROL ESTERIFICADO E O
TAMANHO DA HDL NA ASSOCIAÇÃO COM A ATEROSCLEROSE
CAROTÍDEA

*COMPARISON BETWEEN CHOLESTERYL ESTER TRANSFER
PROTEIN AND HDL SIZE IN ASSOCIATION WITH CAROTID
ATHEROSCLEROSIS*

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ELIANE SOLER PARRA FERREIRA

COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE
COLESTEROL ESTERIFICADO E O TAMANHO DA HDL NA ASSOCIAÇÃO COM
A ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA

*COMPARISON BETWEEN CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN AND
HDL SIZE IN ASSOCIATION WITH CAROTID ATHEROSCLEROSIS*

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. ANDREI CARVALHO SPOSITO
COORIENTAÇÃO: Profa. Dra ELIANA COTTA DE FARIA

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em
Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

*Doctoral thesis presented to the Posgraduate Program of the Faculty of Medical Sciences,
State University of Campinas - UNICAMP, for obtainment of the Ph.D. degree in Medical
Sciences, specialization in Internal Medicine.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR ELIANE SOLER PARRA
FERREIRA, E ORIENTADO PELO PROF.DR. ANDREI
CARVALHO SPOSITO.
Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P247c Parra, Eliane Soler, 1981-
Comparação entre a atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado e o tamanho da HDL na associação com a aterosclerose carotídea / Eliane Soler Parra Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Andrei Carvalho Sposito.
Coorientador: Eliana Cotta de Faria.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lipoproteínas HDL. 2. Lipoproteínas HDL2. 3. Lipoproteínas HDL3. 4. Aterosclerose. 5. Proteínas de transferência de ésteres de colesterol. I. Sposito, Andrei Carvalho. II. Faria, Eliana Cotta de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparison between cholesteryl ester transfer protein and HDL size in association with carotid atherosclerosis

Palavras-chave em inglês:

HDL lipoproteins

HDL2 lipoproteins

HDL3 lipoproteins

Atherosclerosis

Cholesteryl ester transfer protein

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Andrei Carvalho Sposito [Orientador]

Orlando Petrucci Junior

José Roberto Matos Souza

Simone Nascimento dos Santos

Raul Cavalcante Maranhão

Data de defesa: 18-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ELIANE SOLER PARRA FERREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO

COORDINADORA: PROF. DR. ELIANA COTTA DE FARIA

MEMBROS:

1. PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO

2. PROF. DR. ORLANDO PETRUCCI JUNIOR

3. PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MATOS SOUZA

4. PROF. DR. SIMONE NASCIMENTO DOS SANTOS

5. PROF. DR. RAUL CAVALCANTE MARANHÃO

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18 de junho de 2014

Aos meus queridos pais Eugenio e Anizia,
e ao meu amado marido Claudinei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha vida e por colocar pessoas tão importantes no meu caminho.

Ao prof. Dr. Andrei Carvalho Sposito por ter me acolhido de braços abertos, por todos os ensinamentos, apoio, paciência e dedicada orientação.

À profa. Dra Eliana Cotta de Faria que me abriu as portas para a ciência, por dividir comigo parte do seu imenso conhecimento e por ter sido uma ótima orientadora.

Aos meus queridos pais, tão amáveis e bondosos, por serem exemplos de honestidade e luta. Os meus alicerces em todos os momentos.

Ao meu amável marido, presente de Deus, porto seguro, fonte das minhas alegrias e estímulo para a minha caminhada. Obrigada por todo apoio e compreensão.

À minha querida irmã Daiane que sempre esteve pronta a me ajudar em todos os momentos. Você é minha irmã preferida!

A todos os meus amigos e amigas em especial Natália Panzoldo e Vanessa Zago pelo carinho, atenção e principalmente pela amizade verdadeira, sentimento tão ilustre nos dias de hoje. Vocês foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Lípidos, especialmente Cidinha, Carminha, Érica, Isabela, Vitor, Felipe, Carol Beraldo, Fernanda, Taís, Daniel e tantos outros que passaram pelo laboratório e convocação dos nossos voluntários. Todos vocês

foram muito importantes para a realização deste trabalho e para minha vida pessoal. Vocês são os melhores!

Aos amigos do Aterolab, que juntamente com o professor Andrei, me acolheram e me ajudaram muito na finalização deste trabalho. É um prazer enorme estar com vocês!

A todos os funcionários da Seção de Bioquímica Clínica do HC da Unicamp, especialmente Mirian e Marielza que me forneceram as primícias da bioquímica e acreditaram no meu potencial; e também à Hildinha, Simone, Ronise, Ana, Wagner e Claudimeire por toda ajuda e disponibilidade.

Ao laboratório de Lípidos (LIM-10) da UPS, especialmente Dra Valéria Sutti Nunes, Dra Camila Leança, Dra Patrícia Cazita, Profa. Dra Edna Nakandakare e prof. Dr. Eder Quintão, pela constante colaboração.

Ao prof. Dr. Matti Jauhiainen e ao Dr. Jari Metso, do Instituto Nacional de Saúde e Bem-estar (NIHW), de Helsinki/Finlândia pela colaboração científica.

Ao Dr. Rui Nakamura e Dr. Jamal Bakkarat do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Unicamp pela parceria na realização dos exames de ultrassonografias.

À Dra Vera Sylvia Castanho, Dr. Sussumo Waki, Dra Angela de Souza Cassol e Dr. Marcelo Scarpari Dutra Rodrigues pelos exames clínicos.

À FAPESP, CNPQ e CAPES pelo auxílio e apoio científico.

A todos os voluntários, peças essenciais para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

“É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa. Mas graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Hélder Câmara

A lipoproteína de alta densidade (HDL) é um complexo heterogêneo e versátil de partículas com variações funcionais resultantes da integração de uma vasta gama de componentes, como apolipoproteínas, receptores, transportadores, enzimas e fosfolípidos, com ações indiretas ou diretas sobre o seu metabolismo. Além disso, as concentrações plasmáticas do colesterol da HDL (HDL-C) e seu tamanho representam importantes fatores inversos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, particularmente em indivíduos em prevenção primária. A proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) desempenha uma função importante no transporte reverso do colesterol (TRC) que é uma das principais funções antiaterogênicas da HDL. No entanto, a atividade da CETP é inversamente associada às concentrações de HDL-C e ao tamanho da partícula. Adicionalmente, HDL grande demonstra ser mais efetiva no efluxo do colesterol, parte integrante do TRC, comparada à partícula de HDL menor. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar, em indivíduos livres de doença aterosclerótica manifesta, a associação entre o tamanho da HDL e a redução da atividade da CETP induzida geneticamente com a carga aterosclerótica carotídea. Utilizamos para esse fim dois polimorfismos da CETP, TaqIB e I405V, que foram bem caracterizados funcionalmente e encontrados frequentemente na população. Assim, os objetivos desta tese foram: (i) investigar se a presença dos polimorfismos TaqIB e I405V do gene da *CETP* está associada às concentrações de HDL-C e à aterosclerose carotídea subclínica (n=207); (ii) pesquisar se, além das concentrações de HDL-C, o tamanho da partícula de HDL está associado à aterosclerose subclínica (n=284). Para estes estudos foram determinados os perfis lipídicos, lipoproteicos e apoproteicos, proteína C-reativa (PCR), anticorpos anti-LDL oxidada, atividades das proteínas CETP e de transferência de fosfolípidos (PLTP), HDL₂ e HDL₃ e o diâmetro da HDL. Os polimorfismos TaqIB e I405V da CETP também foram detectados. A espessura da camada íntima-medial da artéria carótida comum (EIMc) foi mensurada por ultrassonografia. Na presença do menor

alelo dos polimorfismos TaqIB e I405V da CETP, EIMc correlacionou-se inversamente com atividade da CETP e positivamente com atividade da PLTP e anticorpos anti-LDL oxidada. Na análise multivariada, a presença do menor alelo do polimorfismo TaqIB, mas não do I405V, foi associado a um aumento de 5,1 vezes de risco de maior EIMc. No entanto, a atividade da CETP não diferiu entre os grupos de presença e ausência do menor alelo do polimorfismo TaqIB. Com relação ao tamanho das partículas, HDL maiores foram associadas a menores EIMc e foram melhores indicadores de risco de aterosclerose carotídea subclínica comparadas às concentrações de HDL-C. Em conclusão, o aumento do tamanho da HDL tem associação independente com a carga aterosclerótica e, embora o polimorfismo TaqIB também se associe, sua interação parece ser independente da atividade da CETP.

High-density lipoproteins (HDL) are a group of heterogeneous and complex particles with versatile functional changes resulting from the integration of a wide range of components, such as apolipoproteins, receptors, transporters, enzymes and phospholipids with indirect or direct actions on your metabolism. In addition, plasma concentrations of HDL cholesterol (HDL -C) and its size are inversely related to the development of cardiovascular diseases, particularly in primary prevention in individuals. The cholesterol ester transfer protein (CETP) plays an important role in reverse cholesterol transport (RCT), which is one of the main functions of HDL. However, CETP activity is inversely related to HDL-C and particle size. Additionally, largest HDL particles have demonstrated a higher cholesterol efflux capacity. In this context, the aim of the study was to evaluate, in individuals free of manifest atherosclerotic disease, the association between the size of HDL and CETP activity genetically induced with carotid atherosclerosis burden. We used for this purpose, two polymorphisms of *CETP* TaqIB and I405V, which have been well characterized functionally and often found in the population. The objectives of this thesis were: (i) to investigate whether the presence of polymorphisms I405V and TaqIB of *CETP* gene is associated with HDL-C and subclinical carotid atherosclerosis (n= 207); (ii) to investigate if, in addition to HDL-C, the particle size of HDL is associated with atherosclerosis (n= 284). We determined lipid, lipoprotein profiles and apolipoprotein, C-reactive protein (CRP), antibodies against oxidized LDL, CETP and phospholipid transfer protein (PLTP) activities, HDL₂ and HDL₃ and HDL size. The TaqIB and I405V CETP polymorphisms were also analyzed. Common carotid artery intima-media thickness (cIMT) was measured using ultrasonography. In the presence of the minor alleles of the TaqIB and I405V polymorphisms of CETP, cIMT was inversely correlated with CETP activity and positively with PLTP activity and antibodies against oxidized LDL. In multivariate analysis, the presence of the minor allele of the TaqIB polymorphism, but not the I405V, was associated with a 5.1 times increased risk of

higher cIMT. However, CETP activity did not differ between the presence and absence of minor allele groups of the TaqIB polymorphism. Regarding HDL size, increased HDL size was associated with lower cIMT and was better marker of risk of subclinical carotid atherosclerosis compared to HDL-C. In conclusion, increased size of HDL is independently associated with atherosclerotic and, although TaqIB polymorphism is also associated, its interaction seems to be independent of CETP activity.

ABCA1: *ATP-binding cassette transporter A1*

ABCG1: *ATP-binding cassette transporter G1*

Apo: apolipoproteína

BPI: proteína de aumento da permeabilidade bactericida

CE: colesterol esterificado

CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado

CL: colesterol livre

DCV: doença cardiovascular

DLS: espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*)

EIMc: espessura da camada íntima-medial da artéria carótida

HDL: lipoproteína de alta densidade

HDL-C: HDL-colesterol

hrIM: técnica de mobilidade iônica de alta resolução

LBP: proteína ligante lipopolissacarídeo

LCAT: lecitina colesterol aciltransferase

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LH: lipase hepática

LPL: lipoproteína lipase

PCR: proteína c reativa

PLTP: proteína de transferência de fosfolípidos

PLUNC: *palate, lung and nasal epithelium clone*

PON-1: paraoxonase 1

RNM: ressonância nuclear magnética

SR-BI: receptor scavenger de classe B, tipo I

TG: triglicérides

TRC: transporte reverso do colesterol

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

Quadro 1: Descrição das atividades das subpopulações de HDL	34
--	----

Figura 1: As principais vias da formação e remodelamento da HDL.....	22
Figura 2: Composição da lipoproteína de alta densidade (HDL) esférica.....	23
Figura 3: Mecanismo molecular e funcional da CETP.....	28
Figura 4: Diferentes nomenclaturas para as subpopulações de HDL, determinadas pelos diferentes métodos de separação.....	38

<i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	- 19 -
1.1 <i>LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL-C) E O RISCO CARDIOVASCULAR</i>	20
1.2 <i>ORIGEM DA HDL E A REGULAÇÃO DAS SUAS SUBPOPULAÇÕES</i>	21
1.3 <i>MECANISMOS MOLECULARES E FUNCIONAIS DA CETP</i>	26
1.4 <i>CETP E A ATEROSCLEROSE</i>	29
1.5 <i>GENÉTICA DA CETP</i>	31
<i>POLIMORFISMO TAQIB E I405V DO GENE DA CETP</i>	32
1.6 <i>ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS SUBPOPULAÇÕES DE HDL</i>	33
1.7 <i>SEPARAÇÕES DAS SUBPOPULAÇÕES DE HDL</i>	36
1.8 <i>SUBPOPULAÇÕES DE HDL E O RISCO DE DCV</i>	39
1.9 <i>FATORES QUE AFETAM AS SUBPOPULAÇÕES DE HDL</i>	40
<i>OBJETIVOS</i>	41
<i>CAPÍTULO 1</i>	43
<i>CAPÍTULO 2</i>	50
<i>DISCUSSÃO GERAL</i>	74
<i>CONCLUSÃO GERAL</i>	80
<i>REFERÊNCIAS</i>	82

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL-C) E O RISCO

CARDIOVASCULAR

Conforme a Organização Mundial da Saúde (1)¹, as doenças cardiovasculares (DCVs) representam a principal causa de morte no mundo e inclusive no Brasil, segundo os dados do DATASUS (2)². De acordo com o portal de saúde do governo federal (3)³, as DCVs estão na primeira colocação das principais causas de morte desde 1980.

Há tempos, lípides e lipoproteínas como colesterol total, a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL) e os triglicérides são associados positivamente para o desenvolvimento de DCVs. Entretanto, somente nas décadas de 70 e 80 ocorreram as primeiras publicações da coorte do *Framingham Study* (4, 5), um estudo decisivo na identificação dos fatores de risco para as DCVs, demonstrando a inversa relação entre o colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e a incidência das DCVs.

A HDL é um complexo heterogêneo e versátil de partículas de diferentes tamanhos, densidades e cargas, que possui pressuposta funções anti-inflamatória, antiapoptótica, antioxidante, antitrombótica, proteção endotelial, bem como propriedades de promoção do transporte reverso do colesterol (TRC) (6, 7). Essa complexidade de variações funcionais da HDL é resultante da integração de uma vasta gama de componentes, apolipoproteínas, receptores, transportadores,

¹ <http://apps.who.int/gho/data/node.main.887?lang=en>

² http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/Consolida_Sim_2011.pdf

³ http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/capitulo3_sb.pdf

enzimas e fosfolípidos, com ações específicas indiretas ou diretas sobre o metabolismo da HDL.

Embora estudos populacionais demonstrarem a inversa relação entre HDL-C e o risco de DCV, alguns trabalhos encontraram que altos níveis de HDL-C foram associados com aumento de risco cardiovascular, principalmente em pacientes com a doença manifestada (8, 9). Por outro lado, várias alterações monogênicas responsáveis por baixos níveis de HDL-C, não são necessariamente associadas com aumentos dos riscos (10).

As tentativas farmacológicas em aumentar os níveis plasmáticos de HDL-C para a proteção das DCVs também falharam (11) ou não demonstraram resultados consistentes (12). Além disso, a adição dos níveis de HDL-C ao SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation), um sistema de estimativa de risco recomendado pela sociedade europeia de cardiologia, causou apenas um modesto aumento de 2% na melhora da reclassificação do risco (13). Todos esses estudos sugerem o questionamento se os níveis plasmáticos de HDL-C são realmente as melhores medidas para os riscos de DCVs e, além disso, evidências emergem para a heterogeneidade funcional das subpopulações de HDL e que elas possam variar em termos de sua capacidade em proteger contra as DCVs.

1.2 ORIGEM DA HDL E A REGULAÇÃO DAS SUAS SUBPOPULAÇÕES

A HDL é originada como uma partícula discoide, que consiste de uma bicamada de fosfolípidos, com pequena quantidade de colesterol não esterificado, rodeada por um anel de duas ou mais apolipoproteínas. A biogênese da HDL no seu formato discoide envolve a associação de apolipoproteínas pobres em lípidos ou livres de lípidos, com fosfolípidos e colesterol não esterificado adquiridos das membranas celulares via *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) (14, 15). As apolipoproteínas livres de lípidos, envolvidas na biogênese da HDL, têm origem no fígado ou intestino (15), da dissociação das lipoproteínas ricas em triglicérides,

Este diagrama ilustra el metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y su papel en la regulación del colesterol y los lípidos en las células periféricas y el hígado.

Componentes y procesos:

- Células periféricas:**
 - ABCA-1:** Transportador que facilita la salida de lípidos (CL, FL) desde las células periféricas hacia el intestino y el hígado.
 - ABCG-1:** Transportador que facilita la salida de lípidos (CL, FL) desde las células periféricas hacia el hígado.
- Intestino y Hígado:**
 - Intestino:** Recibe lípidos (CL, FL) a través de ABCA-1 y ABCG-1. Los lípidos se incorporan a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).
 - Hígado:** Recibe lípidos (CL, FL) a través de ABCA-1 y ABCG-1. Los lípidos se incorporan a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).
- Procesos de transporte y transformación:**
 - Pre-β-HDL:** Se forma a partir de lípidos (CL, FL) y se transporta a través de la sangre.
 - LCAT:** Enzima que cataliza la esterificación de los lípidos en las lipoproteínas de alta densidad (HDL).
 - LPL:** Enzima que cataliza la hidrólisis de los lípidos en las lipoproteínas de alta densidad (HDL).
 - CETP:** Enzima que cataliza el intercambio de lípidos entre las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).
 - CE:** Colesterol éster.
 - TG:** Triglicéridos.
 - LDL:** Lipoproteína de baja densidad.
 - VLDL:** Lipoproteína de muy baja densidad.
 - IDL:** Lipoproteína de intermedia densidad.
 - HDL2:** Lipoproteína de alta densidad de tipo 2.
 - HDL3:** Lipoproteína de alta densidad de tipo 3.
- Receptores y transporte en el hígado:**
 - SR-B1:** Receptor que facilita la entrada de lípidos (CL, CE) desde las lipoproteínas de alta densidad (HDL) al hígado.
 - HDL-R:** Receptor que facilita la entrada de lípidos (CL, CE) desde las lipoproteínas de alta densidad (HDL) al hígado.
 - LDL-R:** Receptor que facilita la entrada de lípidos (CL, CE) desde las lipoproteínas de baja densidad (LDL) al hígado.

22

megalina; (5) hidrólise das lipoproteínas ricas em triglicérides pela lipoproteína lipase induzindo a transferência de constituintes da superfície para o pool plasmático de HDL; (6) remodelamento da HDL pela PLTP da hidrólise de triglicérides e fosfolípidos; (7) captação seletiva de colesterol esterificado via o SR-B1 hepático; (8) a HDL pode ser removida da circulação através da interação com receptores de HDL holopartículas; CL, colesterol livre; FL, fosfolípidos; CE, colesterol esterificado; LH, lipase hepática; LE, lipase endotelial, CE; colesterol esterificado; TG, triglicérides; LDL-R, receptor de LDL; HDL-R, receptor de HDL holopartículas. Adaptado de Kontush e Chapman, 20012 (17)

A apoA-I livre ou pobre em lípidos migra para a posição pré- β -1 (18) na separação de lipoproteínas por eletroforese em gel de agarose, com base na carga da sua superfície, que progressivamente adquire fosfolípidos e colesterol não esterificado das células expressando ABCA1, gerando HDL em formato discoide, que são significativamente maiores do que apoA-I pobre em lípidos, que migram para a posição pré- β -2 na eletroforese em gel de agarose (16). A HDL discoidal é rapidamente convertida pela ação da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) em partícula esférica com migração α , que é a forma predominantemente encontrada no plasma de humanos saudáveis (19). A HDL esférica consiste de um núcleo de lípidos neutros, colesterol esterificado, e em menor quantidade, de triglicérides, cercado por uma monocamada de fosfolípidos, colesterol não esterificado e apolipoproteínas (Figura 2) (16, 19).

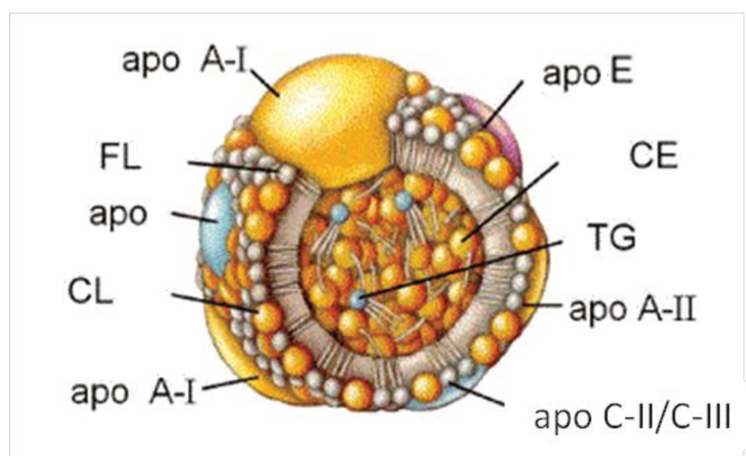


Figura 2, Composição da lipoproteína de alta densidade (HDL) esférica. Apo, apolipoproteína; FL, fosfolípidos; CL, colesterol livre; TG, triglicérides; CE, colesterol esterificado

A heterogeneidade das partículas de HDL esféricas é consequente dos contínuos remodelamentos por diversos fatores plasmáticos. O remodelamento pode ser definido como o conjunto de processos que mudam o tamanho, a carga da superfície e composição da HDL, e ainda causa a dissociação de apoA-I pobre de lípidos das partículas de HDL. Os principais fatores envolvidos no remodelamento da HDL são: LCAT, proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP), LH, e em menor escala, lipase endotelial e receptor scavenger de classe B, tipo I (SR-BI) (16, 20) (Figura 1).

A LCAT esterifica o colesterol das partículas de HDL discoides, gerando colesterol esterificado insolúvel em água que parte para o núcleo da partícula de HDL, e medeia a conversão de partículas de HDL discoides em HDL com formato esférico, contendo duas moléculas de apoA-I por partícula, e finalmente, em partículas de HDL esféricas maiores, contendo agora três moléculas de apoA-I por partícula (21, 22).

A ApoA-I pobre em lípidos pode se dissociar da HDL durante a conversão da partícula de HDL esférica e pequena em partícula de HDL esférica e grande. Isso ocorre paradoxalmente quando a disponibilidade da apoA-I pobre em lípidos é restrita. Sob essas circunstâncias, a LCAT medeia a fusão de duas partículas esféricas de HDL que contém cada uma duas moléculas de apoA-I para a geração de uma partícula grande e instável com quatro moléculas de apoA-I. Assim o produto da fusão passa por um rearranjo estrutural em partículas de HDL grandes e esféricas, com três moléculas de apoA-I, em um processo que é acompanhado pela dissociação de uma molécula de apoA-I (22).

A CETP é um membro da família das proteínas de transferência de lípidos, com função de transferência de colesterol esterificado da HDL para outras frações de lipoproteínas plasmáticas, e de triglicérides de lipoproteínas ricas em triglicérides para as HDL e LDL (23) que terá seu mecanismo mais detalhado a seguir. Em estado de hipertrigliceridemia e resistência insulínica, a transferência

de colesterol esterificado da HDL e triglicérides para HDL gera uma partícula pobre em colesterol esterificado e rica em triglicérides, que são um excelente substrato para LH. A LH é um membro da família do gene das lipases de triglicérides, com atividades de fosfolipase e atividade de lipase de triglicérides (24). A hidrólise de triglicérides da HDL rica em triglicérides pela LH esgota os lípidos do núcleo das partículas, gerando a despedimento dos componentes da superfície. Esse desequilíbrio é retificado com a dissociação de apoA-I e redução do tamanho da HDL (25). Estudos com HDL reconstituída revelaram que a CETP pode também remodelar a HDL em partículas pequenas sem a mediação da dissociação de apoA-I por um processo que envolve fusão da partícula e um rearranjo estrutural do produto de fusão (26).

A PLTP, um membro da mesma família de proteínas de transferência como a CETP, transfere fosfolípidos entre diferentes partículas de HDL, tão bem como entre HDL e lipoproteínas ricas em triglicérides. A PLTP remodela a HDL em partículas grandes e pequenas, por meio de um processo que é acompanhado pela dissociação da apolipoproteína A-I (27). Estudos com HDL reconstituída verificaram que o remodelamento da HDL em partículas grandes e pequenas mediada pela PLTP, e a dissociação de apoA-I, prossegue por meio de fusão das partículas, e uma reorganização estrutural do produto de fusão (28).

Lipase endotelial é outro membro da família genética das LHs. Ela tem alta atividade de fosfolipase e menor atividade de lipase de triglicérides (29). Como os fosfolípidos da HDL são predominantemente substrato para esta enzima, e devido à sua capacidade limitada de esgotar os lípidos do núcleo da HDL, a lipase endotelial pode apenas mediar uma modesta redução do tamanho da HDL, e não a promoção da dissociação de apoA-I pobre em lípidos (30).

O receptor SR-BI tem uma importante função na captação seletiva do colesterol esterificado da HDL, no estágio final da via do TRC. Esse colesterol esterificado é tanto direcionado para secreção na bile ou utilizados no fígado para a montagem de uma nova lipoproteína. A remoção do colesterol esterificado da

HDL pelo SR-BI é acompanhada pela redução do tamanho da partícula, sem a dissociação de apolipoproteína A-I (31). As partículas resultantes com o núcleo pobres de lípidos são posteriormente remodeladas em grandes partículas de HDL, pelo processo que presumivelmente envolve a LCAT (32). Também foi descrito que a captação seletiva de colesterol esterificado da HDL pelo SR-BI é regulada pela composição de apolipoproteínas das partículas. Por exemplo, o colesterol esterificado é removido seletivamente das HDL reconstituíntes que contém apoA-I tão bem como apoA-II (a segunda apolipoproteína mais abundante na HDL) mais efetivamente do que quando comparado às partículas de HDL reconstituídas que contém apenas apoA-I (33). O receptor SR-BI foi descrito também, como um removedor de colesterol esterificado mais efetivo das partículas de HDL₂ do que das partículas de HDL₃ (34).

1.3 MECANISMOS MOLECULARES E FUNCIONAIS DA CETP

Com descrito acima, a CETP desempenha uma função crítica no TRC, facilitando a transferência bidirecional de colesterol esterificado da HDL para as VLDL e LDL, o qual segue para captação hepática através dos receptores de LDL (35), em um processo que também inclui a transferência de triglicérides da VLDL e LDL para a HDL (35).

A CETP é uma glicoproteína hidrofóbica de 476 resíduos de aminoácidos, de massa molecular de aproximadamente 74 kDa (23), com sua estrutura em formato de bumerangue, cuja curvatura é adequada para interagir com as partículas de HDL, e uma conformação mais reta quando se liga as partículas maiores como a VLDL (36).

Em humanos, os órgãos com o maior conteúdo do RNAm da *CETP* são o fígado, baço, e tecido adiposo e com menores níveis de expressão, no intestino delgado, rim, adrenal e coração (23). Há também expressão significativa da CETP em macrófagos e em medula óssea, e localmente na parede arterial e no cérebro (37-39). Quantidades abundantes de massa de CETP são encontradas em células

espumosas derivadas de macrófagos de seres humanos com lesões ateroscleróticas, mas não na parede arterial saudável (38).

Charles e Kane em 2012 (40), a partir de observações de trabalhos em cristalografia de raio-X (36), microscopia eletrônica (41) e bioinformática, descreveram e modelaram as relações físicas da CETP com o processo de transferência de lípidos entre as lipoproteínas, conforme resumido na Figura 3.

Primeiramente, antes da participação da CETP no processo de transferência lipídica, ela reconhece e detecta as superfícies das potenciais lipoproteínas doadoras ou aceptoras, para que em seguida, se infiltre na sua superfície e/ou núcleo (40) (Figura 3, B).

Conforme estudos de cristalografia da CETP, para a troca equimolar de lípidos, isto é de duas moléculas de colesterol esterificado por duas moléculas de triglicérides, mediada pela CETP, aparentemente existem dois poros ocupados por uma molécula de fosfolípidos, localizadas em torno de 60Å e 45Å a partir do final dos domínios N- e C-terminais respectivamente. Esses poros se comunicam com a cavidade central, que se comunica com o ambiente externo aquoso através destes poros, assim, a CETP forma um túnel para a troca lipídica (36).

Por microscopia eletrônica (Figura 3, C e D), foi possível a visualização da formação de um complexo ternário (HDL-CETP-LDL/VLDL) que é uma hipótese para a transferência de lípidos pela CETP (40). Essa troca de lípidos pode ocorrer também entre partículas de LDL doadoras e aceptoras e entre partículas de HDL (42); porém, evidências dos estudos de microscopia eletrônica, sugerem que esses complexos ternários de apenas HDLs e CETP ou LDLs e CETP são extremamente raros (41).

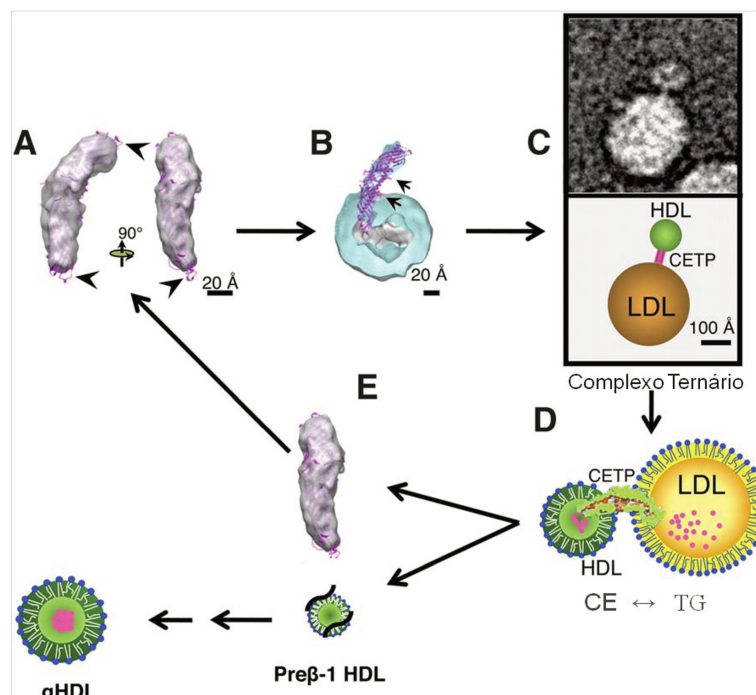


Figura 3, Mecanismo molecular e funcional da CETP adaptado de Charles e Kane, 2012. **A**, estrutura tridimensional molecular da CETP em ângulos de 90°; **B**, penetração e encaixe da CETP na HDL esférica; **C**, formação do complexo ternário, acima uma imagem de microscopia eletrônica e abaixo um diagrama que demonstra a ligação da CETP (ponte) com a HDL pequena e esférica e com a LDL grande e esféricas; **D**, troca de lípidos, CE da HDL para LDL, e TG da LDL para HDL. (a ligação das duas lipoproteínas com a CETP causa uma força termodinâmica que faz com que a molécula de CETP sofra uma torção nos dois domínios e essa torção seria a chave de abertura do túnel para a transferência dos lípides entre as lipoproteínas); **E**, dissociação da CETP e da HDL relativamente pobre em colesterol esterificado, pré-β-1 HDL, que é subsequentemente convertida em uma partícula madura de HDL (α-HDL). CE, colesterol esterificado; TG, triglicérides.

Outra hipótese para os mecanismos de transferência de lípidos, é que a CETP circule livre no plasma e encaixe seus dois poros na superfície da lipoproteína doadora, recebendo dois lípidos neutros, e finaliza por dissociar-se desta lipoproteína. Então, a CETP mais uma vez livre no plasma, acopla os dois poros na superfície da lipoproteína aceptora, gerando assim a troca do lípidos. Neste perfil, a CETP trabalharia de transportadora de lípidos neutros para troca, porém, essa hipótese é de difícil afirmação, já que a CETP livre no plasma está

em baixa disponibilidade, seriam necessárias mais provas diretas para confirmar essa hipótese (36, 40).

Com relação à dissociação da HDL, em ambos os experimentos de microscopia eletrônica e cromatografia de exclusão de tamanho, o complexo binário, formado pela HDL e a CETP, são destinados à dissociação com a liberação das partículas de apoA-I (Figura 3, E). Essa dissociação forma espontaneamente classes de pré- β -HDL, as quais podem regenerar em partículas de α -HDL (43). Em outro cenário, a HDL torna-se enriquecida de triglicérides das LDL/VLDL, e o complexo binário HDL-CETP é potencialmente delipidado pela LH, resultando em liberação e dissociação da apoA-I e/ou redução do tamanho para remanescentes de HDL que são removidos pelos receptores hepáticos (44).

Outras funções também são atribuídas a CETP, como a proteção contra oxidação da LDL (45, 46) e habilidades anti-inflamatórias, já que ela pertence à família de proteínas com essa função (47-49). Estudos sugerem também que a CETP pode ser antiadipogênica, pela sua abundante expressão no tecido adiposo humano, e pela promoção da captação seletiva de colesterol esterificado da HDL nos adipócitos, tanto *in vitro* (50) como *in vivo* (51). A CETP também é expressa no cérebro, e estudos investigam se variantes da CETP podem contribuir para a susceptibilidade à doença de Alzheimer (52).

1.4 CETP E A ATEROSCLEROSE

Estudos sobre os efeitos da inibição ou deficiência da CETP sobre a aterosclerose, tanto em humanos como em modelos animais que expressam naturalmente CETP (coelhos), ou ainda, em modelos transgênicos para expressão de CETP humana (camundongos e ratos), apresentam em seus resultados tanto desfechos antiaterogênicos como aterogênicos.

A CETP demonstrou ser aterogênica quando sua expressão está elevada em camundongos transgênicos (53), ou hipercolesterolêmicos por deleção dos genes da apoE e dos receptores de LDL (54), em ratos hiperlipidêmicos com hipertensão (55), e em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol, onde a inibição da CETP reduziu a lesão aterosclerótica (56-58).

Por outro lado, a CETP foi antiaterogênica em camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (59), com superexpressão de CETP (60), com expressão de LCAT humana (61), com aumento de apoB e com deficiência da lipoproteína lipase, com diabetes e obesidade (62, 63) e com deficiência do receptor SR-BI (64).

Em estudo prospectivo, foi observado que menores atividades plasmáticas da CETP foram associadas com grandes riscos de DCV (65). No entanto em outro estudo, essa associação foi encontrada inexplicavelmente limitada apenas aos homens (66).

Apesar da relação da CETP com aterosclerose e DCV permanecerem incertas, baixas concentrações plasmáticas de CETP são associadas com aumentos dos níveis plasmáticos de HDL-C (67). Esta associação da CETP com HDL-C levou, e ainda estimula, o desenvolvimento de inibidores da CETP, como uma potencial terapia para redução da aterosclerose (11). Apenas cinco medicamentos inibidores da CETP chegaram ao estágio de ensaio clínico que são: Torcetrapib, Anacetrapib, Dalcetrapib, também conhecido como JTT-705, o Evacetrapib e o BAY 60-5521(11).

A pesquisa com o Torcetrapib foi interrompida na fase III devido ao aumento de mortalidade por causas cardíacas e não cardíacas (68). O Dalcetrapib obteve aumentos de 31 a 40% nos níveis de HDL-C, porém, não foi efetivo em reduzir o risco de novos eventos cardiovasculares recorrentes (69), enquanto os inibidores Evacetrapib e Anacetrapib ainda estão passando pela fase III de testes (70). Resultados preliminares do mais novo inibidor da CETP, BAY 60-552,

sugerem que ele é um agente clinicamente seguro e bem tolerado, sem efeitos sobre frequência cardíaca ou pressão arterial (71).

1.5 GENÉTICA DA CETP

Análises de variantes genéticas da CETP sobre a aterosclerose são também uma forma valiosa de ponderar os aumentos ou reduções de CETP na população humana. O estudo “*Honolulu Heart Study*” sugeriu que heterozigotos para defeitos no gene da *CETP* tem um aumento do risco para DCV (72), mas não foi confirmado em análise prospectiva dentro do mesmo estudo (73). Deficiência de CETP, em Japoneses, apesar de associada à hiperalfalipoproteinemia, foi mais frequente no grupo de pacientes com DCV comparado com o grupo controle (74).

O gene da *CETP* consiste de 16 éxons, abrangendo cerca de 25 Kpb de DNA genômico (75), residentes na região 16q 12-21 do braço longo do cromossomo 16, próximo ao locus da *LCAT* (76). Assim como a PLTP, a CETP pertence à superfamília das proteínas BPI (proteína de aumento da permeabilidade bactericida), LBP (proteína ligante à lipopolissacarídeo) e PLUNC (*palate, lung and nasal epithelium clone*) (47).

A deficiência genética de CETP foi descoberta em familiares Japoneses com aumento nos níveis de HDL (77, 78). Na completa ausência da função da CETP, a falha na transferência de colesterol esterificado da HDL para outras lipoproteínas leva ao acúmulo de colesterol esterificado na fração da HDL, sendo associada geralmente ao aumento nos níveis de HDL-C de duas a cinco vezes quando comparado aos indivíduos controles (79, 80), além de reduções dos níveis de LDL-C e apoB (81). As partículas de HDL destes indivíduos são grandes e ricas em colesterol esterificado e apoE, além de demonstrarem um aumento na habilidade de promover efluxo dos macrófagos de forma dependente do transportador *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1) (82).

Em algumas mutações heterozigotas, a atividade da CETP pode ser reduzida de 35 até 70%, com aumentos substanciais de 25 a 130% nos níveis plasmáticos de HDL-C em relação aos sujeitos controles sem a mutação (72, 83).

Uma revisão publicada em 2008 por Thompson e colaboradores (84), avaliou as associações de genótipos e fenótipos da CETP, os níveis de lípides e os riscos de DCV, em 102 estudos entre os anos de 1970 e 2008, e descreveu o TaqIB e o I405V como sendo os polimorfismos mais comuns já estudados no gene da *CETP*.

POLIMORFISMO TAQIB E I405V DO GENE DA CETP

O polimorfismo TaqIB (rs708272) é resultado de uma troca silenciosa de bases, afetando o nucleotídeo na posição +279, através da troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) no primeiro íntron do gene da *CETP* (84).

A presença do menor alelo, B2, é associada com maiores concentrações plasmáticas de HDL-C, com maiores tamanhos de HDL e menores atividades e massa de CETP comparados com a ausência deste alelo (86, 87). Em vários estudos, essa associação parece ser modificada por fatores metabólicos e ambientais como o gênero, consumo de álcool, obesidade, tabagismo e níveis de insulina (88-91).

Além do aumento dos níveis de HDL-C, a presença do genótipo B2B2 foi associada a menores riscos de DCV (87, 92, 93) e a longevidade (94). A presença do alelo B2 também se associou a menor espessura da camada íntima-medial da artéria carótida interna em homens (95). Adicionalmente, a frequência do genótipo B1B1 foi significativamente maior nos indivíduos que apresentam histórico familiar de DAC comparado aos indivíduos sem histórico da doença (96).

Já o polimorfismo I405V (rs5882) é uma mutação *missense* posicionada no éxon 14 do gene da *CETP*, no qual ocorre a substituição de uma isoleucina (I) por

uma valina (V) no códon 405, próxima à região C-terminal da proteína. A frequência desta mutação ocorre acima de 25% dentre todas as populações examinadas na revisão efetuada por Boekholdt e Thompson de 2003 (97).

Em vários estudos, a presença do menor alelo, V, reduz os níveis plasmáticos de CETP entre 9 e 23%, e em homozigotos (VV) têm maiores níveis de HDL-C, de aproximadamente 2 mg/dL, comparado com os homozigotos sem o menor alelo (II) (97).

Em homens hipertrigliceridêmicos, a presença do menor alelo do polimorfismo I405V foi associada a maior prevalência de doença coronariana, mesmo com maiores níveis de HDL-C (98). Enquanto em mulheres brancas sem tratamento hormonal com presença do menor alelo V, tiveram aumento de risco de 1,4 e 2,1 vezes para doença isquêmica do coração respectivamente em heterozigotos e homozigotos para o menor alelo (99).

Neste contexto de dependência, um estudo realizado em uma população de judeus de Ashkenazi, que frequentemente tem maior longevidade comparada a outras populações, a frequência de homozigotos para o menor alelo V foi significativamente maior em indivíduos com longevidades excepcionais e entre os seus descendentes. Além disso, esses indivíduos com genótipo VV também apresentavam significantes aumentos do tamanho das partículas de HDL e LDL e menores concentrações de CETP (100).

Com toda essa gama de informações surge o questionamento se a ação anti ou próaterogênica da CETP é dependente do seu efeito sobre o tamanho e composição da partícula de HDL. Modelos genéticos de reduções de atividade da CETP podem ajudar o estudo desta relação.

1.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS SUBPOPULAÇÕES DE HDL

Muitos estudos apresentam convincentes evidências de que os níveis de HDL-C não refletem totalmente todas as facetas das propriedades ateroprotetora da HDL (101, 102). Essas atividades biológicas da HDL, também amplamente nomeadas como funcionalidade da HDL, não necessariamente acompanham as concentrações de HDL-C, e podem ser muito importantes para determinar a gama de capacidades ateroprotetoras da HDL.

A heterogeneidade composicional das partículas de HDL sugere a diversidade funcional entre as partículas. Apesar de todas as subpopulações de HDL praticamente exibirem várias atividades biológicas, muita dessas atividades podem ser especialmente potentes em determinadas classes de partículas de HDL. Portanto, várias funções biológicas da HDL podem ser mediadas por subespécies distintas, definidas por ligações de proteínas específicas (20, 103) (Quadro 1).

Quadro 1, Descrição das atividades das subpopulações de HDL

Atividade Biológica	Subpopulações de HDL	Características	Componentes da HDL
Efluxo do colesterol	Pequena e densa	Potente efluxo dos macrófagos Potente efluxo via ABCA1 Potente ativação da LCAT	Diferentes conformações da apoA-I, redução do conteúdo de FL e outros lípides;
	Grande e leve ^a	Potente efluxo via ABCG1 e SR-B1	Elevação do conteúdo de FL, conformação da apoA-I
Antioxidante	Pequena e densa	Potente proteção da LDL de danos oxidativos Potente inativação de LOOH e outros fosfolípidos oxidados	Depleção de SM e enriquecimento de apoA-I e enzimas hidrolíticas
Anti-inflamatória	Pequena e densa	Inibição da expressão de	Diferentes

		moléculas de adesão em células endoteliais	conformações da apoA-I e composição de FL
		Capacidade imunomoduladora em relação aos neutrófilos	Proteínas relacionadas com fator H
Citoprotetora	Pequena e densa	Potente proteção das células endoteliais da apoptose induzida por LDL oxidada	Enriquecimento em apoA-I e S1P
Vasodilatadora	Grande e leve ^a	Produção atenuada de tromboxano A ₂	
Antitrombótica	Grande e leve ^a	Inibição da agregação plaquetária	Enriquecimento em apoE
	Pequena e densa	Potente atividade anticoagulante	Enriquecimento em TFPI e S1P
Anti-infecciosa	Densa ^b	Fator de lise de tripanosoma	Complexo de apoL-1, Hrp e apoA-II
	Pequena e densa	Potente integrina mediano células de adesão de neutrófilos em resposta LPS mediado por CD14	Proteínas relacionadas com fator H, apoA-I, LBP

^aLeve, menos densa; ^b, menor população densa da HDL; HDL, lipoproteína de alta densidade; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; LCAT, lecitina colesterol aciltransferase; apoA, apolipoproteína; FL, fosfolípidos; ABCG1, ATP binding cassette transporter G1; SR-B1, receptor scavenger de classe B, tipo 1; LDL, lipoproteína de baixa densidade; SM, esfingomielina; LOOH, hidroperóxido lipídico; S1P, esfingosina 1 fosfato; TFPI, inibidor da via do fator tecidual; LPS, lipopolissacarídeo; Hrp, proteína relacionada haptoglobina; LBP, proteína ligante de LPB; Quadro adaptado de Camont et al., 2011 (20)

Apesar do transportador ABCA1 e as pequenas partículas de HDL serem os maiores protagonistas do efluxo do colesterol das células carregadas de lípidos, as vias de promoção do efluxo para as partículas grandes de HDL, SR-B1 e ABCG1, também podem contribuir significativamente para a rede de efluxo de

colesterol (104). Além disso, partículas de HDL grandes e ricas em lípidos representam o ligante mais eficiente para captação celular de colesterol esterificado mediado pelo SR-B1, comparado com as partículas de HDL pequenas e pobre em lípidos (34, 104). De maneira semelhante, o SR-B1 medeia maior efluxo de colesterol para as partículas grandes de HDL (HDL₂) comparado às pequenas HDL (HDL₃) (34). O maior conteúdo de fosfolípidos nas grandes partículas de HDL (105) que resulta em uma maior superfície lipídica, e a conformação da apoA-I associada com o tamanho da partícula (34) provavelmente estão por trás destas observações. Em contraste, as diferentes subclasses de HDL parecem representar similaridade na capacidade aceptora por difusão passiva, independente de receptor (104).

Ao verificar o Quadro 1, observamos que as partículas menores detêm maiores efeitos sobre a maioria das funções atribuídas à HDL, porém, quando comparamos as propriedades do efluxo de colesterol das subpopulações de HDL, é essencial ter em mente a concentração base para tal comparação. Assim como as partículas menores e mais densas são mais potentes em promover efluxo, as partículas grandes e menos densas são mais efetivas (34, 105).

A multiplicidade de atividades biológicas expressas por HDL levanta a questão da avaliação da funcionalidade da HDL em humanos, e também da forma de avaliar os benefícios clínicos de tais atividades. Um ensaio integrativo, com um único denominador comum refletindo as múltiplas funções da HDL, poderia ser ideal para refletir as principais facetas da funcionalidade das partículas de HDL.

1.7 SEPARAÇÕES DAS SUBPOPULAÇÕES DE HDL

Como alternativa para a função da HDL, que está longe de ser viável, reprodutiva e padronizável no laboratório clínico, a estrutura da HDL é explorada como um promissor biomarcador de risco cardiovascular (106, 107). Juntamente com o metabolismo intravascular da HDL, vários tipos de partículas que diferem

em forma, tamanho e conteúdo lipídico e propriedades antiaterogênicas estão em um equilíbrio dinâmico (20, 108). Portanto, a relativa proporção de subclasses de HDL em amostra plasmática é um reflexo do metabolismo da HDL e, ao mesmo tempo, pode contribuir importantemente para a avaliação do risco de DCV associado a essas lipoproteínas.

HDL e suas subclasses são atualmente separadas por vários métodos, todos baseados nas suas diferentes propriedades físico-química (densidade, tamanho, mobilidade eletroforética, conteúdo de apolipoproteínas, etc.), cada um dos quais são determinados por concentrações de lípidos e/ou proteínas das diferentes partículas. A nomenclatura das subpopulações de HDL varia de acordo com a técnica de separação empregada (**Figura 4**).

A HDL foi tradicionalmente definida com uma densidade fracional entre 1,063 – 1,21 g/mL na separação por ultracentrifugação ou de lipoproteínas com α -mobilidade por eletroforese em papel. Porém, mais recentemente, laboratórios usando eletroforese de agarose revelaram a presença de HDLs com pré- β -mobilidade, α -mobilidade lenta, α -mobilidade e pré- α -mobilidade, enquanto aquelas separações utilizando ultracentrifugação demonstram que algumas HDL podem ser encontradas na fração de densidade $>1,063\text{g/mL}$ (HDL contendo apoE) e mesmo na fração de densidade $<1,21\text{g/mL}$ (apoA-I pobremente lipídada e apoC-III). Com a disponibilidade de anticorpos monoespecíficos, HDL tem sido separada em muitas subclasses distintas, com base no seu conteúdo de apolipoproteínas através de cromatografia de imunoafinidade. Várias apolipoproteínas, da apoA-I a apoO, tem sido identificados por anticorpos monoespecíficos. Novos métodos, dos quais cromatografia líquida rápida, eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, ressonância nuclear magnética (RNM) e técnica de mobilidade iônica de alta resolução (hrIM), medem várias subclasses de HDL por diferentes propriedades. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante é o mais laborioso e ainda proporciona a resolução mais elevada entre todos os métodos de separação da HDL, mas a utilização de anticorpos monoespecíficos permite

que o conteúdo de apolipoproteínas em várias subclasses de HDL, possa ser quantitativamente definido (109).

Além de todas as técnicas descritas acima, o diâmetro da HDL também pode ser determinado por técnica de espalhamento dinâmico de luz (dynamic light scattering – DLS) conforme descrito por Lima e Maranhão, 2004(110), após precipitação das lipoproteínas que contém apoB. A técnica se baseia no movimento aleatório das partículas suspensas em líquido ou gás devido à colisão irregular das moléculas do meio (movimento browniano). Para obtenção das informações do diâmetro das partículas, o equipamento de DLS utiliza espectroscopia de correlação de fótons, a partir da diferença de velocidades exibidas pelos diferentes diâmetros das partículas, que em seguida é calculado em razão da intensidade de luz variável pelo tempo, sendo que partículas pequenas se movem mais rapidamente comparado às partículas maiores, com taxa de dispersão de luz também maiores (111).

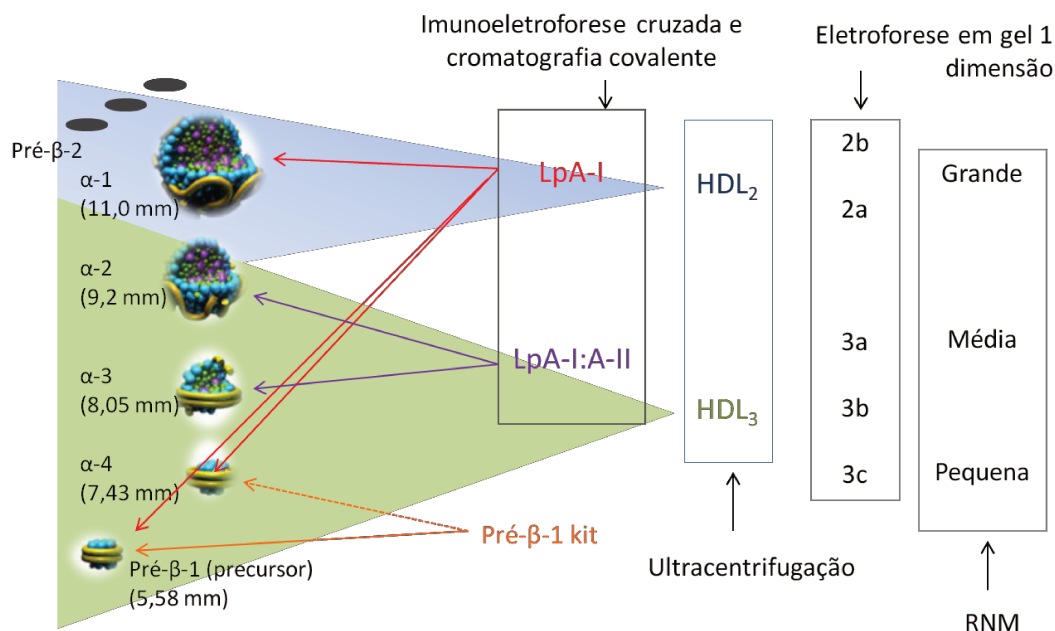


Figura 4, Diferentes nomenclaturas para as subpopulações de HDL, determinadas pelos diferentes métodos de separação (adaptado Asztalos et al., 2011(107)).

A detecção do diâmetro das partículas de HDL por DLS, após precipitação química das lipoproteínas contendo apoB, é mais rápida, simples e de baixo custo comparado às outras técnicas (110), e apresenta resultados similares a outras técnicas, podendo ser utilizada em grande escala tanto na pesquisa como na clínica.

1.8 SUBPOPULAÇÕES DE HDL E O RISCO DE DCV

Numerosos estudos populacionais sugerem que as partículas de HDL₂, que são partículas maiores de HDL, podem ser mais cardioprotetoras que as partículas menores, que são as subfrações de HDL₃ (112, 113). Porém, outros estudos sugerem que as duas frações são igualmente cardioprotetoras (114, 115), enquanto HDL₃ confere reforçada cardioproteção em relação HDL₂. (116). Ainda mais, em estudos de RNM, concentrações de HDL de diâmetro grande, de 9,4 a 14 nm, foram negativamente associadas com risco cardiovascular, enquanto HDL de diâmetro pequeno, de 7,3 a 8,2 nm, foi associada positivamente com o risco de DCV (117-119).

Pacientes com aterosclerose, documentada por escore de cálcio coronário maior que o percentil 75 para idade e gênero, apresentaram baixos níveis plasmáticos de colesterol das partículas grandes de HDL (HDL_{2b} e HDL_{2a}) (120). Esses dados realçam o potencial de avaliar o risco de DCV em estágio inicial da doença, quantificando o colesterol nas diferentes subclasses de HDL.

A inflamação crônica também foi descrita como relacionada com alteração da distribuição do tamanho das partículas de HDL. Baixas concentrações de pequenas partículas de HDL foram encontradas em pacientes com calcificação coronária e com artrite, e em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (121, 122).

Discrepâncias entre o tamanho das partículas de HDL e o risco de DCV podem estar relacionadas ao tipo de população estudada, condição metabólica destes indivíduos, presença ou não de DCV, que muito provavelmente refletem

nas complexas relações entre as subpopulações de HDL, segundo suas propriedades físico-químicas. Calabresi et al. (108) em sua revisão descreve que na visão geral, predominantemente as partículas grandes de HDL são associadas com menor risco de DCV, porém, permanece sem identificação qual seria essa cardioproteção.

1.9 FATORES QUE AFETAM AS SUBPOPULAÇÕES DE HDL

Em mulheres com diabetes tipo 2 foi encontrado que partículas grandes de HDL são menos abundantes (123), enquanto que as partículas pequenas de HDL foram um preditor independente da conversão do diabetes melitus tipo 2, durante o seguimento por um período de 5 anos (124). Aumentos da proporção de pequenas partículas de HDL e menores proporções de grandes partículas são identificáveis em crianças com diabetes tipo 2 e com resistência insulínica (125). Como esperado, essas anormalidades correlacionam com o grau de resistência insulínica determinada pelo índice do HOMA-IR (125)

A inflamação crônica também foi descrita como relacionada com alteração da distribuição do tamanho das partículas de HDL. Baixas concentrações de pequenas partículas de HDL foram encontradas em pacientes com calcificação coronária e com artrite, e em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (121, 122).

Além da etnia (126), gênero e idade (127, 128), fatores ambientais também podem afetar as subclasses de HDL como dieta (129), consumo regular de álcool (130), exercício (131), entre outros.

Considerando todos esses estudos, é possível levantar a hipótese que o tamanho da partícula de HDL ou suas subpopulações tem efeito inverso sobre o risco de DCV.

OBJETIVOS

Capítulo 1

Investigar se a presença de dois polimorfismos frequentes do gene da *CETP*, TaqIB e o I405V, modificam a aterosclerose subclínica medida por ultrassonografia das artérias carótidas em uma população adulta saudável (n=207), e seus efeitos sobre os níveis plasmáticos de HDL-C e suas subpopulações de partículas, HDL₂ e HDL₃.

Capítulo 2

Avaliar em indivíduos saudáveis livre de doença aterosclerótica manifesta (n=284) se o tamanho da HDL poderia ser um melhor preditor de doença aterosclerótica carotídea, também medidas por ultrassonografia, quando comparada aos níveis plasmáticos de HDL-C.

CAPÍTULO 1

SHORT REPORT

Open Access

The I405V and Taq1B polymorphisms of the CETP gene differentially affect sub-clinical carotid atherosclerosis

Eliane Soler Parra^{1†}, Natália Baratella Panzoldo^{1†}, Denise Kaplan¹, Helena Coutinho Franco de Oliveira², José Ernesto dos Santos³, Luiz Sérgio Fernandes de Carvalho⁴, Andrei Carvalho Sposito⁴, Magnus Gidlund⁵, Ruy Tsutomu Nakamura⁶, Vanessa Helena de Souza Zago¹, Edna Regina Nakandakare⁷, Eder Carlos Rocha Quintão⁷ and Eliana Cotta de Faria^{1,8*}

Abstract

Background: Cholesteryl ester transfer protein (CETP) plays a major role in lipid metabolism, but studies on the association of CETP polymorphisms with risks of cardiovascular disease are inconsistent. This study investigated whether the CETP gene I405V and Taq1B polymorphisms modified subclinical atherosclerosis in an asymptomatic Brazilian population sample.

Methods: The polymorphisms were analyzed using polymerase chain reaction in 207 adult volunteers. Serum lipid profiles, oxLDL Ab titers, C-reactive protein and tumor necrosis factor- α concentrations and CETP and phospholipid transfer protein (PLTP) activities were determined, and common carotid artery intima-media thickness (cIMT) was measured using ultrasonography.

Results: No differences in cIMT were observed between the presence or absence of the minor B2 and V alleles in either polymorphism. However, inverse correlations between mean cIMT and CETP activity in the presence of these polymorphisms were observed, and positive correlations of these polymorphisms with PLTP activity and oxLDL Ab titers were identified. Moreover, logistic multivariate analysis revealed that the presence of the B2 allele was associated with a 5.1-fold (CI 95%, OR: 1.26 – 21.06) increased risk for cIMT, which was equal and above the 66th percentile and positively interacted with age. However, no associations with the V allele or CETP and PLTP activities were observed.

Conclusions: None of the studied parameters, including CETP activity, explained the different relationships between these polymorphisms and cIMT, suggesting that other non-determined factors were affected by the genotypes and related to carotid atherosclerotic disease.

Keywords: Carotid atherosclerosis, Carotid intima-media thickness, Cholesteryl ester transfer protein, Genetic polymorphism

* Correspondence: cottadefaria@gmail.com

[†]Equal contributors

¹Lipids Laboratory, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Rua 5 de Junho, 350, Campinas, SP 13083-877, Brazil

⁸Departamento de Patologia Clínica, FCM-UNICAMP, P.O. Box 6111, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, Barão Geraldo SP 13084-971, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Atherosclerotic disease is a complex multifactorial process that leads to the deposition and accumulation of cholesterol along the arterial wall [1]. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) plays a major role in cholesterol metabolism [2], and polymorphisms within this gene may underlie the susceptibility to atherosclerosis [3].

The I405V (rs5882) and Taq1B (rs708272) polymorphisms and their respective minor alleles, V and B2, are associated with decreased CETP activity and increased high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels [4]. However, studies on the association of these polymorphisms with risks of cardiovascular disease (CVD) are inconsistent [5], and their association with subclinical CVD are less well characterized.

Therefore, this study investigated whether I405V and Taq1B polymorphisms modified subclinical atherosclerosis in an asymptomatic Brazilian adult sample population.

Methods

Study subjects

A total of 207 asymptomatic volunteers of both sexes (20–75 years) were recruited at the Lipid Outpatient Clinic at the State University (Unicamp) Hospital in Campinas, SP, Brazil.

The following exclusion criteria were used: body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m²; a diagnosis of endocrinological, liver or kidney disease; use of drugs that alter the lipid profile; excessive use of alcohol (>75 g/day) [6]; meeting the “present CVD” criteria (acute myocardial infarction and angina pectoris, as established by electrocardiogram, cardiac-specific enzyme levels, coronary angiography and/or a history of coronary angioplasty or myocardial revascularization).

The local Medical School Ethics Committee approved this study, and all participants signed an informed consent form.

Biochemical analysis

The following blood measurements were performed using Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) reagents in an automated system: total cholesterol (CHOD-PAP), triglycerides (TG, GPO-PAP), HDL-C (HDL-C plus 3rd generation), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C plus 2nd generation for TG >400 mg/dL and Friedewald's equation for TG ≤ 400 mg/dL). Apolipoproteins AI (NAS-ApoA1), B100 (NAS-ApoB) and lipoprotein (a) were obtained from Siemens (USA). C-reactive protein (CRP) was measured using the Tina-quant[®] CRP (latex) high sensitivity assay (Roche Diagnostics, Switzerland). Plasma levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) were measured using ELISA (Cayman Chemical, USA).

HDL₂ and HDL₃ sub-fractions were obtained using sequential micro-ultracentrifugation [7].

CETP [8] and phospholipid transfer protein (PLTP) activities [9] in plasma were determined using radioassays with exogenous substrates.

Antibodies against oxidized LDL (oxLDL Ab) titers were determined using an in-house ELISA [10].

Polymorphism detection

Genomic DNA was extracted [11] and amplified using polymerase chain reaction to identify the Taq1B [12] and I405V [13] polymorphisms.

Measurement of cIMT

A single trained sonographer, who was blind to the subject's identity, performed high-resolution B-mode common carotid ultrasonography using a 6–9 MHz linear array ultrasound imaging system (ATL HDI 1500 Ultrasound System, Advanced Technology Laboratories Ultrasound, USA). Longitudinal measurements of segments of the common carotid arteries at the distal wall and 1 cm from the bifurcation were performed according to a standardized method [14]. The mean common carotid artery intima-media thickness (cIMT) was calculated as the average of five measurements on each side (right and left) and expressed in millimeters.

Statistical analysis

Mann–Whitney U and Chi-Squared tests compared variables, and the Spearman test was performed for correlations. Univariate and multivariate logistic regression analyses, with stepwise criteria of the variables of interest, the presence of the V and B2 allele, gender, age, HDL-C, BMI and systolic blood pressure (SBP), were performed to verify the relationships of these variables with higher cIMT values, which was defined as above or below the established cutoff value of 0.795 mm and corresponding to cIMT equal and above the 66th percentile values of the studied population.

All the analyses were performed using the SAS[®], version 9.1.3 and SPSS 11.5 for Windows. Haploview, v 4.2[®] was used for the linkage disequilibrium (LD) analysis [15].

Results

The frequencies of I405V and Taq1B genotypes in our population sample, represented by the presence (VV, IV) and absence (II) of the V allele and the presence (B2B2, B1B2) and absence (B1B1) of the B2 allele, are presented in Table 1. The frequencies of the II, IV and VV genotypes were 28%, 53% and 19%, respectively, and the frequencies of the B1B1, B1B2 and B2B2 were 33%, 41% and 26%, respectively.

Allele frequencies were consistent with Hardy–Weinberg equilibrium for the I405V polymorphism ($p=0.36$) but not the Taq1B ($p=0.02$), and the MAFs

Table 1 Biochemical parameters in the presence and absence of minor alleles

Parameters	A. I405V Genotypes		
	II (n=32-59)	V carriers (n=70-148)	p value ≤
Frequency (%)	29	71	
CETP (%)	14.5 ± 9.0	11.0 ± 7.2	0.015
HDL-C (mg/dL)	72 ± 24	74 ± 18	0.192
HDL ₂ -C (mg/dL)	15 ± 6	17 ± 6	0.030
PLTP (%)	22.3 ± 11.9	15.8 ± 9.9	0.001
Lipoprotein (a) (mg/dL)	27 ± 30	32 ± 36	0.477
OxLDL Ab (OD)	0.33 ± 0.16	0.38 ± 0.19	0.405
Parameters	B. Taq1B Genotypes		
	B1B1 (n=32-68)	B2 carriers (n=70-139)	p value ≤
Frequency (%)	33	67	
CETP (%)	13.4 ± 8.2	11.3 ± 7.7	0.103
HDL-C (mg/dL)	74 ± 26	73 ± 16	0.584
HDL ₂ -C (mg/dL)	17 ± 6	17 ± 5	0.657
PLTP (%)	17 ± 11	18 ± 11	0.860
Lipoprotein (a) (mg/dL)	24 ± 30	33 ± 36	0.014
oxLDL Ab (OD)	0.33 ± 0.17	0.38 ± 0.18	0.230

Data are presented as means ± standard deviation; (sample number): n = minimum and maximum of subjects with determined parameters; p values = Mann-Whitney U test for comparisons between the presence and absence of the minor alleles (V and B2). Significant differences: p ≤ 0.05 in bold. CETP (%) = activity of cholesterol ester transfer protein; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; PLTP (%) = activity of phospholipid transfer protein; oxLDL Ab = antibodies against oxidized LDL titers; (OD) = optical density.

(minor allele frequency) were <45% and <46%, respectively. The linkage disequilibrium between the two polymorphisms was very weak, as evidenced by the $D' = 0.17$.

Clinical and anthropometric characteristics and biochemical data of the investigated population are presented in Tables 2 and 1.

Table 3 presents the significant correlations between mean cIMT, oxLDL Ab titers and CETP and PLTP activities.

The univariate analyses (Table 4) indicated that the female gender, age, HDL-C, BMI and SBP were significantly associated (p value ≤ 0.05) with higher cIMT.

The multivariate analysis (Table 5) demonstrated that age and the presence of the B2 allele were positively related to higher cIMT. Individuals with increased risk exhibited the B2 allele (5.1-fold increase) and higher age (21.2% increase/each year of age).

A Chi-Square analysis indicated an interaction between the presence of the B2 allele and age. The combination between age, categorized in ≥ and <50 years (median value), and the presence or absence B2 allele formed 4 groups of individuals who were crossed with cIMTs above and below 0.795 mm (data not shown).

Table 2 Clinical and anthropometric characteristics in the presence and absence of minor alleles

Parameters	A. I405V Genotypes		
	II (n=34-59)	V carriers (n=83-148)	p value ≤
Age (years)	47 ± 14	49 ± 15	NS
Male (%)	24	26	NS
BMI (kg/m ²)	25 ± 6	25 ± 5	NS
WC (cm)	76 ± 11	81 ± 12	0.008
SBP (mmHg)	120 ± 13	127 ± 16	0.002
DBP (mmHg)	77 ± 10	82 ± 10	0.001
Mean cIMT (mm)	0.74 ± 0.19	0.79 ± 0.23	NS
Parameters	B. Taq1B genotypes		
	B1B1 (n=37-68)	B2 carriers (n=80-139)	p value ≤
Age (years)	49 ± 15	48 ± 14	NS
Male (%)	35	21	0.026
BMI (kg/m ²)	25 ± 4	25 ± 6	NS
WC (cm)	81 ± 12	79 ± 12	NS
SBP (mmHg)	127 ± 14	124 ± 16	NS
DBP (mmHg)	82 ± 11	79 ± 10	NS
Mean cIMT (mm)	0.73 ± 0.20	0.79 ± 0.23	NS

Data presented as means ± standard deviation; (sample number): n = minimum and maximum of subjects with determined parameters; p values = Mann-Whitney U test for comparisons between the presence and absence of the alleles (V and B2); gender comparisons, Chi-Square test. Significant differences: p ≤ 0.05 in bold. BMI = Body Mass Index; WC = waist circumference; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; cIMT = carotid intima-media thickness.

Discussion

This study investigated whether the I405V and Taq1B polymorphisms modify subclinical atherosclerosis in an asymptomatic population sample.

Previous studies present controversial data on the role of Taq1B and I405V in atherosclerosis and CVD. The B2 allele is associated with lower internal carotid artery IMT in men [16], but other studies do not identify associations between the Taq1B polymorphism and cIMT [17,18]. The present study demonstrated that cIMT did not differ between either allele of the polymorphisms. However, inverse correlations between cIMT and CETP activity were demonstrated in both polymorphisms (Table 3), which suggest a potential atheroprotective role for CETP in these individuals. A potential anti-inflammatory role for CETP was demonstrated previously [19] wherein the induction of acute inflammation produced lower mortality due to sepsis and lower cytokine circulation in mice that express human CETP. Reductions in CETP concentrations in human patients with sepsis are more pronounced in non-survivors [20].

We identified positive correlations between cIMT and PLTP and oxLDL Ab in the presence of the V and B2 alleles. Previous studies have suggested that PLTP

Table 3 Significant correlations between cIMT, oxLDL Ab, CETP (%) and PLTP (%) in the presence of minor alleles

cIMT versus	V carriers		cIMT versus	B2 carriers	
	r	p value ≤		r	p value ≤
CETP (%) n=88	-0.363	0.0001	CETP (%) n=87	-0.427	0.0001
oxLDL Ab (OD) n=54	0.409	0.002	oxLDL Ab (OD) n=51	0.432	0.002
PLTP (%) n=85	0.322	0.003	PLTP (%) n=84	0.315	0.004

r = Spearman's coefficient; Significant differences: p ≤ 0.05 in bold. cIMT = carotid intima-media thickness; oxLDL Ab = antibodies against oxidized LDL titers; (OD) = optical density; CETP(%) = activity of cholesteryl ester transfer protein; PLTP (%) = activity of phospholipid transfer protein.

increases the risk of cardiovascular disease in humans [21], and the balance of evidence suggests a pro-atherogenic role for oxLDL Ab titers [22] in the development of atherosclerosis. These positive correlations and the lack of correlations of these variables in both common B1B1 and II allele homozygotes (CETP p ≤ 0.318 and 0.091, oxLDL Ab p ≤ 0.709 and 0.386 and PLTP p ≤ 0.823 and 0.470, respectively) (data not shown) suggest a possible pro-atherogenic role of these markers associated with the polymorphisms. Our sample size was relatively small and different between groups. Therefore, further studies are underway in our lab to further confirm these correlations.

The presence of the V allele was associated with lower CETP (24%) and PLTP (29%) activities and higher HDL₂-C (13%) concentrations. Patients with coronary disease typically exhibit fewer large HDL particles (HDL₂), and the concentration of these large particles is a better predictor of future cardiovascular events than HDL-C concentration [23].

Lipoprotein (a) plasma levels were also significantly increased in the presence of the B2 allele. High levels of lipoprotein (a) are significantly associated with the presence, severity and extent of carotid atherosclerosis [24],

but this increase was not observed as a possible pro-atherogenic factor.

No significant differences in CETP activity and HDL-C levels were observed in Taq1B polymorphism, despite a 15.4% reduction in CETP activity in presence of the B2 allele. These results are consistent with a previous study in another Brazilian population, in which no association between Taq1B genotypes and HDL-C levels was observed [25].

A univariate analysis (Table 4) followed by a multivariate logistic stepwise analysis (Table 5) demonstrated that the presence of the B2 allele was independently associated with a mean 5.1-fold increased risk for higher cIMT and age interacted with the allele effect. The presence of the B2 allele in the ≥ 50 years age group exhibited the highest risk of higher cIMT in the Chi-Square analysis (data not shown).

The effects of the Taq1B variant on circulating plasma lipids may be related to other functional mutations within the CETP gene locus that are in LD [26], which may explain the association in our study. However, other factors than the CETP activity may exert different atherosclerotic repercussions in Taq1B and I405V polymorphisms. A multivariate analysis was performed to verify the independence of the associations between the qualitative binary variable cIMT above or below 66th percentile (0.795mm), CETP and PLTP plasma activities and the potential confounding factors, including gender, age, BMI, SBP and HDL-C. Only age exhibited a significant statistical association (OR: 1.247, CI 95%OR: 1.129 – 1.377), which was a strong determinant of cIMT (data not shown). The absence of interactions of other tested parameters with higher cIMT in this study suggests that

Table 4 Univariate Logistic Regression analyses for higher cIMT (above 66th percentile) (n=118)

Variables	Categories	p value ≤	OR	CI 95% OR
Presence of V allele	No (ref.)	0.303	1.00	—
	Yes		1.57	0.67 – 3.69
Presence of B2 allele	No (ref.)	0.150	1.00	—
	Yes		1.87	0.80 – 4.36
Gender	Male (ref.)		1.00	—
	Female	0.048	2.48	1.01 – 6.10
Age (years)	(cont.)	0.001	1.195	1.116 – 1.279
HDL-C (mg/dL)	(cont.)	0.035	1.024	1.002 – 1.047
BMI (kg/m ²)	(cont.)	0.009	1.105	1.025 – 1.191
SBP (mmHg)	(cont.)	0.003	1.043	1.014 – 1.072

cIMT below and above the 66th percentile, <0.795 (n=76) and >0.795 (n=42), respectively. (ref.)=reference level. (cont.)= continue variable. OR= Odds ratio for higher cIMT, above the 66th percentile value (0.795 mm). CI 95% OR= Confidence interval of 95% for the Odds ratio. Significant differences: p ≤ 0.05 in bold; B2 = minor allele of Taq1B polymorphism, V = minor allele of I405V polymorphism, HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol, BMI: body mass index, SBP: systolic blood pressure.

Table 5 Multivariate Logistic Regression* analyses for higher cIMT (above 66th percentile) (n=114)

Variables	Categories	p value ≤	OR	CI 95% OR
Age (years)	(cont.)	0.001	1.212	1.126 – 1.304
Presence of B2 allele	No (ref.)	0.023	1.00	—
	Yes		5.14	1.26 – 21.06

*Stepwise criteria for selection of variables. cIMT below and above 66th percentile, <0.795 (n=73) and >0.795 (n=41), respectively. (ref.)= reference level; (cont.)=continue variable. OR= Odds ratio for higher cIMT above the 66th percentile value (0.795 mm). CI 95% OR= Confidence interval of 95% for Odds ratio. Significant differences: p ≤ 0.05 in bold; B2 = minor allele of Taq1B polymorphism.

other non-determined factors were affected by the genotypes and related to carotid atherosclerotic disease.

Our results focused on several biomarkers that were assessed for the first time in the Brazilian population, and the results were partially based on the correlations between a relatively small numbers of individuals. These results merit further exploration due to the high frequency of the investigated polymorphisms in the present Brazilian sample. Identifying the impact of these polymorphisms is an ongoing aim of our research group.

Conclusions

The I405V and Taq1B polymorphisms were differently associated with subclinical atherosclerosis because only the presence of the minor B2 allele, but not the V allele, was independently associated with higher cIMT. We demonstrated that none of the studied parameters explained the different relationships between these polymorphisms and cIMT, which leads us to speculate that the association between the B2 allele and cIMT is due to other non-studied factors. Ongoing studies are underway in our laboratory to determine the modulation factors that are involved.

Abbreviations

CETP: Cholesteryl Ester Transfer Protein; HDL-C: High-Density Lipoproteins Cholesterol; CVD: Cardiovascular Disease; BMI: Body Mass Index; TG: Triglycerides; LDL-C: Low-Density Lipoprotein Cholesterol; Apo: Apolipoprotein; CRP: C-Reactive Protein; TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α ; PLTP: Phospholipid Transfer Protein; oxLDL Ab: Antibodies titers against oxidized LDL; cIMT: common Carotid Artery Intima-Media Thickness; SBP: Systolic Blood Pressure; LD: Linkage Disequilibrium; MAF: Minor Allele Frequency.

Competing interests

The authors state that they have no conflicts of interest.

Authors' contributions

ESP worked hard on the data analysis, manuscript preparation, and editing. NBP wrote and reviewed the final manuscript. DK participated in the selection of participants, collection of all clinical and laboratory data and clinical examinations. HCFO and JES assisted in the execution of the experimental protocol for the polymorphism detection. LSFC and ACS performed additional statistical analyses and critical discussion. MG conducted the immunological experiments. RTN performed the carotid ultrasonography. VHSZ, ERN and ECRQ critically revised all text and complemented the discussion. ECF designed the study, implemented the clinical arm and coordinated the work. All authors read an approved the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP" (grant number 2006/00585-9) and "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES" for the financial support; Mirian Danelon, from the Clinical Biochemistry Laboratory, and Aparecida Sousa from the Lipids Laboratory/Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental of the School of Medical Sciences (FCM)/Unicamp for the technical support; Helymar Machado from FCM's Research Chamber for the statistical analysis.

Author details

¹Lipids Laboratory, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Rua 5 de Junho, 350, Campinas, SP 13083-877, Brazil. ²Lipids Laboratory, Biology Institute, State University of Campinas, Rua Monteiro Lobato, 255,

Campinas, SP 13083-862, Brazil. ³Faculty of Medicine, University of São Paulo, Av Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14039-900, Brazil. ⁴Cardiology Division, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, SP 13083-887, Brazil. ⁵Immunology Department, University of São Paulo, Av Prof. Lineu Prestes, 2415, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. ⁶Department of Radiology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, SP 13083-887, Brazil. ⁷Lipids Laboratory (LIM 10), Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo, Av Dr Arnaldo, 455, São Paulo, SP 01246-903, Brazil. ⁸Departamento de Patologia Clínica, FCM-UNICAMP, P.O. Box 6111, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, Barão Geraldo SP 13084-971, Brazil.

Received: 26 July 2012 Accepted: 29 September 2012

Published: 5 October 2012

References

- Glass CK, Witztum JL: Atherosclerosis the road ahead. *Cell* 2001, **104**:503-516.
- Parra ES, Urban A, Panzoldo NB, Nakamura RT, Oliveira R, De Faria EC: A reduction of CETP activity, not an increase, is associated with modestly impaired postprandial lipemia and increased HDL-cholesterol in adult asymptomatic women. *Lipids Health Dis* 2011, **10**:87.
- Kolovou G, Vasiladis I, Kolovou V, Karakosta A, Mavrogeni S, Papadopolou E, Papamantzopoulos S, Giannakopoulou V, Marvaki A, Degiannis D, Biliannou H: The role of common variants of the cholesteryl ester transfer protein gene in left main coronary artery disease. *Lipids Health Dis* 2011, **10**:156.
- Boekholdt SM, Thompson JF: Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. *J Lipid Res* 2003, **44**:1080-1093.
- Oliveira HC, De Faria EC: Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, **31**:248-257.
- Savolainen MJ, Hannuksela M, Seppanen S, Kervinen K, Kesäniemi YA: Increased high-density lipoprotein cholesterol concentration in alcoholics is related to low cholesteryl ester transfer protein activity. *Eur J Clin Invest* 1990, **20**:593-599.
- Eyre J, Hammett F, Miller NE: A micro-method for the rapid ultracentrifugal separation of human plasma high density lipoprotein subfractions, HDL2 and HDL3. *Clin Chim Acta* 1981, **114**:225-231.
- Lagrost L: Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* 1998, **110**:231-241.
- Darmon J, Regts J, Scherphof G: Transfer of [14C]phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta* 1982, **712**:444-452.
- Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H: Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Biol Res* 1996, **29**:1625-1628.
- Salazar LA, Melo CE, Cavalli SA, Hinuy HM, Hirata MH, Hirata RDC: Micrométodo para extração de DNA genômico útil no diagnóstico molecular da Hipercolesterolemia Familiar. *Rev bras anal clin* 2001, **33**:111-116.
- Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague L, Ricard S, Poirier O, Jemaa R, Evans A, Arveiler D, Marques-Vidal P, et al: Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest* 1995, **96**:1664-1671.
- Gudnason V, Kakkio S, Nicaud V, Savolainen MJ, Kesäniemi YA, Tahvanainen E, Humphries S: Cholesteryl ester transfer protein gene effect on CETP activity and plasma high-density lipoprotein in European populations. The EARS Group. *Eur J Clin Invest* 1999, **29**:116-128.
- Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, Van der Graaf Y: Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation* 1999, **100**:951-957.
- Barnett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005, **21**:263-265.

16. Elosua R, Cupples LA, Fox CS, Polak JF, D'Agostino RA Sr, Wolf PA, O'Donnell CJ, Ordovas JM: Association between well-characterized lipoprotein-related genetic variants and carotid intimal medial thickness and stenosis: The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2006, **189**:222-228.
17. Soyat SM, Sandhofer A, Hahne P, Oberkofler H, Felder T, Iglseder B, Miller K, Krempler F, Patsch JR, Paulweber B, Patsch W: Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase gene polymorphisms: Effects on hepatic mRNA levels, plasma lipids and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011, **216**:374-380.
18. Tsai MY, Johnson C, Kao WH, Sharrett AR, Arends VL, Kronmal R, Jenny NS, Jacobs DR Jr, Arnett D, O'Leary D, Post W: Cholesteryl ester transfer protein genetic polymorphisms, HDL cholesterol, and subclinical cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008, **200**:359-367.
19. Cazita PM, Barbeiro DF, Moretti AI, Quintao EC, Soriano FG: Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP. *Shock* 2008, **30**:590-595.
20. Grion CM, Cardoso LT, Perazola TF, Garcia AS, Barbosa DS, Morimoto HK, Matsuo T, Carrilho AJ: Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. *Eur J Clin Invest* 2010, **40**:330-338.
21. Jarvik GP, Rajagopalan R, Rosenthal EA, Wolfbauer G, McKinstry L, Vaze A, Brunzell J, Motulsky AG, Nickerson DA, Heagerty PJ, et al: Genetic and nongenetic sources of variation in phospholipid transfer protein activity. *J Lipid Res* 2010, **51**:983-990.
22. Chen HW, Kuo CL, Huang CS, Kuo SJ, Liu CS: Oxidized low-density lipoproteins, autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and carotid intima media thickness in a clinically healthy population. *Cardiology* 2008, **110**:252-259.
23. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, Robins SJ, Schaefer EI: Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**:2185-2191.
24. Kim BS, Jung HS, Bang OY, Chung CS, Lee KH, Kim GM: Elevated serum lipoprotein(a) as a potential predictor for combined intracranial and extracranial artery stenosis in patients with ischemic stroke. *Atherosclerosis* 2010, **212**:682-688.
25. Relvas WG, Izar MC, Helfenstein T, Fonseca MI, Colovati M, Oliveira A, Ihara SS, Hani SW, Las Casas AA Jr, Fonseca FA: Relationship between gene polymorphisms and prevalence of myocardial infarction among diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis* 2005, **178**:101-105.
26. Klerks AH, Tanck MW, Kastelein JJ, Molhuizen HO, Jukema JW, Zwinderman AH, Kuivenhoven JA: Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked -629C->A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration. *Hum Mol Genet* 2003, **12**:111-123.

doi:10.1186/1476-511X-11-130

Cite this article as: Parra et al.: The I405V and Taq1B polymorphisms of the CETP gene differentially affect sub-clinical carotid atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease* 2012 **11**:130.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CAPÍTULO 2

**HDL size is more accurate than HDL cholesterol to predict carotid
subclinical atherosclerosis in individuals classified as at low
cardiovascular risk**

Eliane Soler Parra^a, Natalia Baratella Panzoldo^a, Vanessa Helena de Souza Zago^a, Daniel Zanetti Scherrer^a, Fernanda Alexandre^a, Valeria Sutti Nunes^b, Edna Regina Nakandakare^b, Eder Carlos Rocha Quintão^b, Eliana Cotta de Faria^a, Andrei C. Sposito^c.

^aDepartment of Clinical Pathology, Lipid Laboratory and Center for Medicine and Experimental Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

^bLipid Laboratory, Faculty of Medical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^cDepartment of Cardiology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

***Corresponding author**

Professor Andrei C Sposito
Cardiology Division, Faculty of Medical Sciences,
State University of Campinas (Unicamp),
13084-971, Campinas, Sao Paulo, Brazil
Tel 55 191 3521 7098
Fax 55 19 3289 4107
Email: andreisposito@gmail.com

Abstract

Objective: Consistent data has demonstrated the limited accuracy of HDL cholesterol in predict the burden of atherosclerotic disease. In parallel, HDL size has been shown to be a better marker of cholesterol efflux capacity than its cholesterol content. Thus, objective this study was investigate whether HDL size would improve the predictive value of HDL in the identification of subclinical carotid atherosclerotic disease.

Methods: 284 individuals (40-75 years) at low cardiovascular risk were selected from those who seek primary prevention care centers in Brazil between 2008 and 2011. Apolipoprotein B-containing lipoproteins were precipitated by polyethylene glycol and HDL-size was measured by dynamic light scattering technique. Participants were classified in tertiles of HDL-size (<7.57; 7.57-8.22; >8.22nm). cIMT were measurements by high resolution B-mode carotid ultrasonography. Multivariate ordinal logistic regression models were used to assess the association between cIMT across HDL-size and levels of lipid parameters.

Results: In contrast to HDL cholesterol, HDL-size >8.22nm was independently associated with cIMT<0.90 mm in unadjusted and adjusted models by age, gender and HOMA2S, ethnicity and body surface area (Odds ratio 0.23; 95% confidence interval 0.07-0.73, p=0.013). LDL and non-HDL cholesterol were also positively associated with cIMT.

Conclusion: The mean HDL size estimated with DLS constitutes a better predictor for subclinical carotid atherosclerosis than the conventional measurements of plasma HDL-C in individuals at low cardiovascular risk.

Keywords: HDL-size, HDL-C, cIMT, subclinical atherosclerosis,

Introduction

Algorithm-based categorization as low cardiovascular risk has been observed in up to 72% of individuals who are admitted with ST-elevation myocardial infarction¹. Although multicausality of atherogenesis and limitations related to extrapolation algorithms are virtually insurmountable barriers, some risk markers may be particularly useful for individuals in this extract of risk. In this context, recent evidence showed that the discriminatory power of high-density lipoproteins cholesterol (HDL-C) is more robust in low-risk individuals than in their counterparts². From the mechanistic point of view, this phenomenon has been attributed to increased proportion of dysfunctional HDL as it increases the cardiovascular risk. Eventhough, the inclusion of HDL-C in risk evaluation is expected to improve risk reclassification in only 2.2%³. Hence, it became evident that simple feasible estimations of HDL functionality must be developed particularly to those individuals classified as at low cardiovascular risk.

Cholesterol efflux capacity of HDL has been shown to be a step forward in discriminating individuals with or without coronary or carotid atherosclerosis when compared with HDL-C^{4,5}. Such improvement in the predictive value has been mainly attributed to phenotypic changes in HDL, particularly the lipoprotein size. Indeed, studies using either native HDL or reconstituted HDL particles demonstrated that cholesterol efflux capacity is directly proportional to HDL size^{6,7}. As the diameter of HDL is enlarged, changes occur in the conformation of the central region of the apolipoprotein (apo) A-I increasing its affinity for scavenger

receptor class B type I (SRBI) and, by this way, the cell cholesterol efflux to HDL^{6, 7}.

Cholesterol efflux assessment however is a complex, labor-intensive procedure that remains hard to be performed in clinical setting. The assessment of HDL diameter, on the other hand, has been accomplished by a straightforward, accessible and fast throughput technology.

In our study, we used DLS to measure HDL particles isolated after precipitation of apo B-containing lipoproteins by PEG 8000, which validation is published elsewhere¹⁸. This technical approach made this assessment simple, less expensive and broadly accessible as compared with NMR or even polyacrylamide gradient gel electrophoresis.

Thus, in the present study we aimed to investigate whether HDL-size would improve the predictive value of HDL-C in the identification of subclinical carotid atherosclerotic disease.

Methods

Subjects

Participants were selected from a database of 598,288 lipid profiles of individuals who spontaneously sought governmental primary care centers for cardiovascular risk estimation between 2008 and 2011 in the cities of Campinas and Americana, SP, Brazil (Figure 1). Our goal was to select individuals aged of 40 years or older without regular use of lipid-lowering treatment or secondary causes for reduced HDL-C. In the first step, we selected medical reports from individuals with (i) low-density lipoprotein (LDL-C) ≤ 130 mg/dL, (ii) triglycerides ≤ 150 mg/dL, and (iii) of both genders. In this phase, 53,491 individuals were considered eligible for telephone interview. We then excluded individuals who self-reported: (i) body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m², (ii) regular use of medical treatments, (iii) smoking habit, (iv) daily intake of alcohol >14 g or (v) intensive daily physical exercise. From 1,536 individuals who were selected and invited for in-person clinical evaluation and blood exams, 919 individuals attended the second step evaluation. Additional exclusion criteria were the measured BMI, LDL-C and triglycerides values as above reported or (i) urea >71 mg/dL, (ii) creatinine >1.20 mg/dL, (iii) glucose >100 mg/dL, (iv) alanine aminotransferase >50 U/L, (v) aspartate aminotransferase >33 U/L, (vi) gamma-glutamyltransferase >71 U/L, (vii) thyroid stimulating hormone <0.41 or >4.5 uUI/mL, (viii) metabolic syndrome as defined by the International Diabetes Federation (IDF) criteria. The Ethics Committee in Medical Sciences of the University of Campinas approved this study (409/2010) and all participants

signed an informed consent form. The study is registered at ClinicalTrials.Gov by the following identification NCT02106013.

Clinical and anthropometric data

Weight, height, BMI, waist (WC) and hip circumference, body surface area (BSA), systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP, respectively) were obtained and confirmed by duplicated assessments. The ethnicity was self-reported, and categorized in white or non-white. Estimated lipid accumulation product (LAP, for men= (waist circumference - 65) x triglycerides) for women= (waist circumference - 58) x triglycerides)) was used for describing lipid overaccumulation according to Kahn ⁸.

Biochemical analysis

Blood samples were drawn after a 12-h fast for serum and EDTA plasma separation by centrifugation (4°C, 1000 x g, 10 minutes), and stored at -80°C until analysis. Total cholesterol, triglycerides, HDL-C and glucose measurements were performed in an automated chemical analyzer Modular® Analytics Evo (Roche Diagnostics, Burgess Hill, West Sussex, UK), using Roche Diagnostics® reagents (Mannheim, Germany). LDL-C was calculated by Friedewald's equation ⁹. Apo A-I, apo B and lipoprotein (a) were determined by nephelometry in a BNII automated system and reagents from Dade-Behring® (Marburg, Germany). C-reactive protein (CRP) was measured using the Tina-quant® CRP (latex) high sensitivity assay (Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany) by immunoturbidimetry. Plasma

insulin was determined by ELISA (Human Insulin ELISA kit, Millipore Corporation, MA, USA).

The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation estimated glomerular filtration rate (GFR). The Homeostasis Model Assessment 2 (HOMA2) Calculator version 2.2 was used to estimate β cell function (HOMA2B) and insulin sensitivity (HOMA2S) ¹⁰. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) ¹¹ and phospholipid transfer protein (PLTP) activities in plasma were determined using radioassays with exogenous substrates and PLTP mass was measured by ELISA as previously describe ¹². Paraoxonase-1 (PON-1) activity was measured using paraoxon (diethyl-*p*-nitrophenylphosphate, Sigma, St. Louis, MO, USA) as substrate ¹³. Plasma exogenous lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity measurements (nmolCE/mL/h) were performed using a recombinant HDL ¹⁴, and endogenous activity (% cholesterol ester) through the rate of esterification of ¹⁴C-free cholesterol by LCAT in the subject's HDL ¹⁵. Lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL) were assessed in post-heparin plasma samples, based on fatty acid release, using a radiolabeled triolein emulsion as substrate and NaCl 1M as LPL inhibitor¹⁶.

HDL particle size analysis

HDL particle size was measured after chemical precipitation of apo B-containing lipoproteins with polyethylene glycol (PEG) 8000 (400 g/L) in glycine solution 0.2 mol/L, adjusted to pH 10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)¹⁷. Measurements of HDL particle size were made using the Nanotracer Particle Size

Analyzer (Microtrac, North Largo Florida, USA) by dynamic light scattering (DLS) technique, as described by Lima & Maranhão ¹⁸.

Cardiovascular risk and carotid atherosclerotic burden estimation

The 10-year risk of coronary fatal or nonfatal myocardial infarction or fatal or nonfatal stroke, and peripheral arterial disease of supposed atherosclerotic origin was estimated by the Atherosclerosis Cardiovascular Disease (ASCVD) risk score ¹⁹. Measurement of the intima-media thickness (cIMT) of the left and right common carotid arteries was obtained at the far wall and 1 cm from the bifurcation ²⁰ by using a high resolution B-mode carotid ultrasonography (ATL HDI 3500, 6-9 MHz linear transducer, ATL Ultrasound, Bothell, EUA), by a single trained sonographer, according to standardized method. Individual results correspond to the mean of the left and right cIMT in mm.

Statistical analysis

Normal distribution of the variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. The participants were grouped in tertiles of their HDL-size (<7.57nm; 7.57–8.22nm; and >8.22nm). Comparative analyses were performed using Kruskal-Wallis for non-normal data, expressed as median (interquartile range), and analysis of variance (ANOVA) for normal data, expressed as mean $\pm$ standard deviation. Bonferroni's test or Mann-Whitney test were used for post-hoc analysis. Chi-Square test was used for categorical variables. Analysis of covariance (ANCOVA) adjusted by gender and age was used to compare CRP and cIMT between groups. Multivariate ordinal logistic regression models were used to

assess the association between cIMT $\geq 80^{\text{th}}$ percentile (0.90mm) across increasing levels of lipid parameters. In order to minimize the effect of the differences in magnitudes of the absolute values and make comparable the association between the independent variables and the odds ratios (OR), tertiles of HDL-size, HDL-C, LDL-C, non-HDL-C and apo A-I were used as independent variables with reference group being those in the lowest tertile. We included in the models age, gender, HOMA2S, ethnicity and BSA as covariates. A two-sided p-value ≤ 0.05 was considered as statistically significant. Analyses were performed using SPSS Statistics version 17.0.

Results

Clinical characteristics and biochemical data

As shown in Table 1, individuals in the 1st tertile of HDL size presented higher BMI, WC, BSA and LAP than those in the 2nd tertile and both were higher than those in 3rd tertile of HDL size. Individuals in the 1st tertile of HDL size had lower levels of HDL-C and apo A-I, HOMA2S, PLTP mass and activity of PON-1 and had higher levels of insulin, HOMA2B and higher activities of endogenous LCAT and HL as compared with their counterparts. Plasma triglycerides were lower in 3rd tertile group as compared with the others groups. Apo B and non-HDL-C were lower in 3rd tertile group as compared with 2nd tertile. CRP levels and cIMT were also lower in 3rd tertile when compared with others groups. The median 10 years ASCVD risk was below 2% in the three groups and only 17% of study participants had a risk $\geq 7.5\%$. There was no significant difference in the mean risk among the HDL size tertiles.

HDL-size and atherosclerosis

Binary logistic regressions were performed to estimate the degree of association between the presence of cIMT $\geq$ the 80th percentile and the independent variables expressed in tertiles: HDL-size, HDL-C, LDL-C and non-HDL-C. Table 2 displays the 3 models for each variable: (1) unadjusted; (2) adjusted by age, gender and HOMA2S; (3) adjusted by age, gender, HOMA2S, ethnicity and BSA. HDL particle size $>8.22\text{nm}$ was independently associated with low cIMT in unadjusted and in the adjusted models. The same was not observed

when we tested HDL-C values. Apo A-I was not significantly associated with cIMT ($p=0.24$). LDL-C > 98 mg/dL and non-HDL-C > 113 mg/dL were both independently associated with higher cIMT in the three models. The association between HDL-size and cIMT remained significant after the addition of LDL-C to the third model ($p=0.019$). Due to the presence of colinearity it was not possible to test together HDL-size and HDL-C.

Discussion

The present study was designed to compare the predictive role of HDL-C and HDL particle size for the presence of subclinical carotid atherosclerosis in primary prevention setting. Our main finding is that HDL particle size but not HDL-C is inversely associated with cIMT. This association remains significant after adjustment for LDL-C, insulin sensitivity and other traditional cardiovascular risk factors.

In nuclear magnetic resonance (NMR) studies, plasma concentration of large HDL (9.4–14 nm) is inversely associated with cardiovascular risk, whereas that of small HDL particles (7.3–8.2 nm) is positively associated with this risk ²¹⁻²³. As HDL subpopulations differ in size, and concentrations of large HDL particles are consistently associated with reduced cardiovascular risk, mean HDL-size may represent an integrative measure of HDL particle profile. Consistently, mean HDL-size obtained by NMR was inversely associated with cIMT in individuals with familial hypercholesterolaemia and in asymptomatic volunteers ²⁴.

In our study, we used DLS to measure HDL particles isolated after precipitation of apo B-containing lipoproteins by PEG 8000, which validation is published elsewhere ¹⁸. This technical approach made this assessment simple, less expensive and broadly accessible as compared with NMR or even polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Consistently, we also found an inverse association between HDL-size and cIMT in asymptomatic, low-risk individuals of both genders in primary prevention setting. The association was

independent of insulin sensitivity, age and LDL-C. As expected, both LDL-C and non-HDL-C were strong predictors for increased cIMT, confirming the accuracy of the study design.

Although metabolic syndrome as defined by the IDF was considered an exclusion criterion, individuals with lower HDL-size had higher triglycerides levels, WC and lower insulin sensitivity than those in the other tertiles. Endogenous LCAT and exogenous HL activities were both increased among individuals from the first tertile, which may have contributed to the reduced HDL-size and may have been favored by the decline in insulin sensitivity²⁵⁻²⁷. Likewise, PLTP activity has also been inversely related to insulin sensitivity and is involved in the remodeling of HDL²⁸. Consistently with prior studies²⁹, we found that PLTP mass differed between groups but PLTP activity did not. By consequence, PLTP specific activity, which reflects the relative proportion of active and inactive isoforms, was lower among individuals in the last tertile of HDL-size. Although PLTP activity has been associated to both the increase and decrease of HDL size, specific PLTP activity seems to be more clearly related to the decreasing effect on HDL size³⁰. Thus, it is conceivable that such metabolic trait comprising the decline in insulin sensitivity is, independently, a considerable stimulus for decreasing the size of HDL and increasing the plasma levels of CRP and cIMT. In this context, we performed multivariate analysis and found that the association of HDL-size with cIMT or CRP goes beyond its indirect link through the decline in insulin sensitivity.

Although specific PON-1 activity has been reported to be higher in small HDL particles ³¹, the overall plasma PON-1 activity was also associated with larger HDL-size in the studied individuals. Such an increase in plasma PON-1 activity in individuals with high HDL-size is likely a result of the positive association between HDL-size and the number of HDL particles. In fact, when the ratio of PON-1 and apo A-I were compared between groups, the statistical significance disappeared.

In conclusion, the present study indicates that the mean HDL size estimated by DLS constitutes a better predictor for subclinical carotid atherosclerosis than the conventional measurement of plasma HDL-C in individuals classified by the current guidelines as at low cardiovascular risk.

Disclosures: The authors state that they have no conflict of interest.

Acknowledgments: Prof. Sposito and Nadruz were supported by a fellowship grant of productivity in research from the Brazilian National Research Council (CNPq). This work was supported by the State of São Paulo Research Foundation (Fapesp), grant numbers 2006/60585-9 and 2011/16476-9, and by the CNPq, grant number 143384/2011-2. We are grateful Prof Matti Jauhiainen and Jari Metso from the National Institute for Health and Welfare, Helsinki, Finland for the analyses of PLTP and exogenous LCAT activities.

Study association: This article is part of a doctoral degree thesis by Eliane Soler Parra.

Figure 1. Flow-diagram of the study

Legend: ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; GGT: gamma-glutamyltransferase; TSH: thyroid stimulating hormone

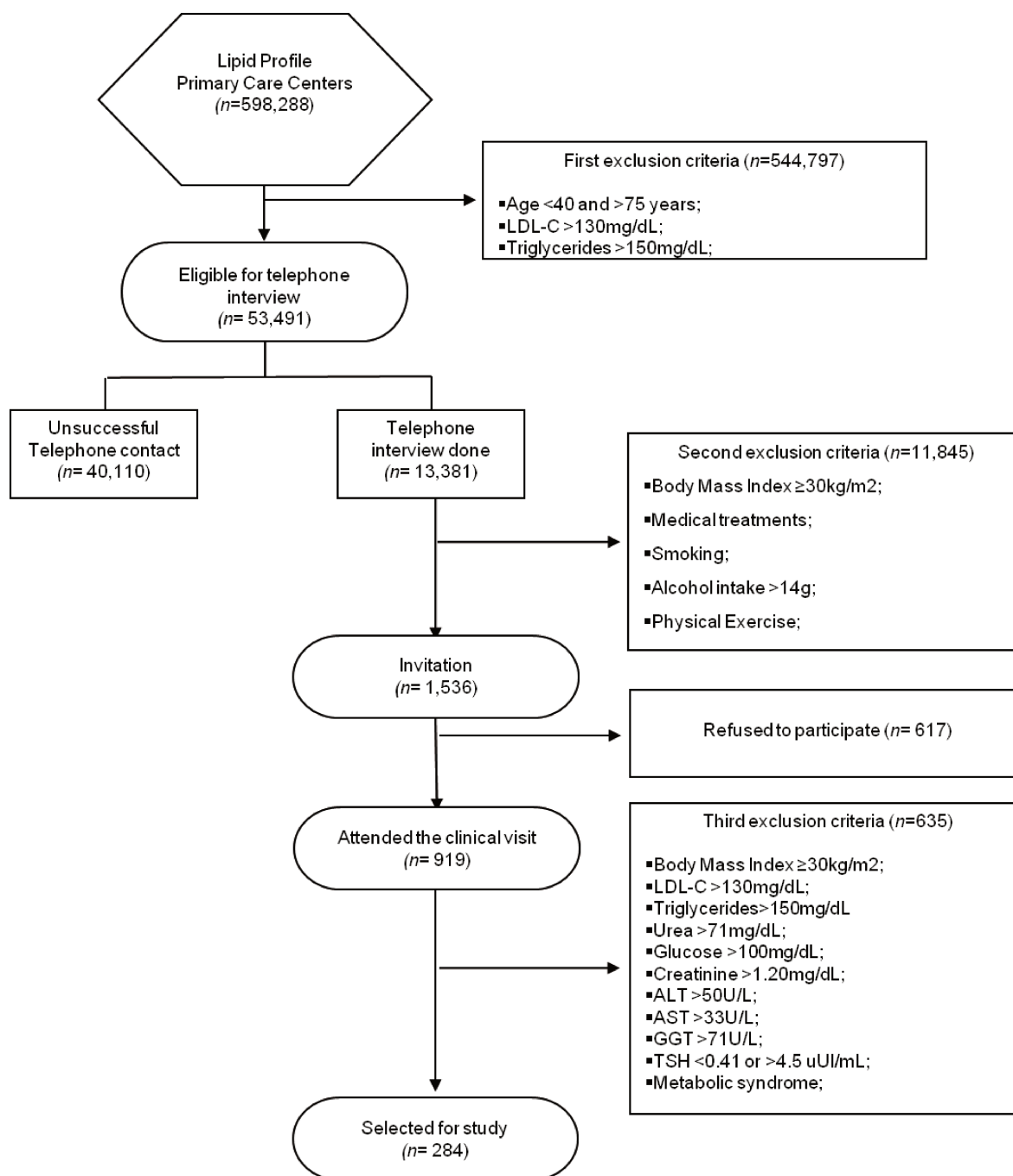


Table 1. Baseline characteristics according to the tertiles of HDL size

	1 st tertile (< 7.57nm)	2 nd tertile (7.57-8.22nm)	3 rd tertile (>8.22nm)	<i>p</i>
<i>N</i>	92	93	99	
HDL-size, nm	7.24 (0.36)	7.86 (0.34)	8.51 (0.42)	-
Female, %	49	54	64	0.112
Ethnic group				
White/non-white, %	77/23	75/25	79/21	0.802
Age, years	49 (13)	51 (14)	52 (13)	0.115
Body mass index, kg/m ²	24.8 ± 3.1	23.9 ± 2.8	23.4 ± 2.6	0.004 ^a
Waist circumference, cm	82 ± 11	78 ± 9	75 ± 9	0.0001 ^{a,b}
Body surface area, m ²	1.76 ± 0.18	1.72 ± 0.16	1.65 ± 0.17	0.0001 ^{a,c}
Lipid accumulation product - LAP, cm.mmol/L	17 (22)	15 (12)	10 (9)	0.0001 ^{a,c}
Systolic blood pressure, mmHg	120 (20)	120 (15)	120 (20)	0.969
Diastolic blood pressure, mmHg	80 (0)	80 (11)	80 (3)	0.940
HDL-C, mg/dL	39 (22)	63 (25)	75 (13)	0.0001 ^{a,b,c}
Non-HDL-C, mg/dL	124 ± 26	126 ± 27	116 ± 24	0.022 ^c
Triglycerides, mg/dL	85 (49)	81 (41)	66 (28)	0.0001 ^{a,c}
LDL-C, mg/dL	106 ± 25	109 ± 24	102 ± 22	0.099

Glucose, mg/dL	87 ± 8	85 ± 10	85 ± 7	0.324
Insulin, uU/mL	5.29 (5.15)	3.70 (3.63)	3.66 (2.95)	0.001 ^{a,b}
HOMA2S, %	169 (148)	239 (279)	232 (250)	0.002 ^{a,b}
HOMA2B, %	81 ± 36	65 ± 28	60 ± 25	0.001 ^{a,b}
Apo A-I, mg/dL	124 ± 29	157 ± 40	178 ± 29	0.0001 ^{a,b,c}
Apo B, mg/dL	82 ± 18	83 ± 19	77 ± 18	0.043 ^c
Lipoprotein (a), mg/dL	10.4 (25.0)	17.1 (21.0)	10.7 (23.0)	0.066
GFR, ml/min/1.73m ²	90 (23)	90 (18)	87 (20)	0.868
CETP, %	14 ± 6	13 ± 6	12 ± 5	0.206
PLTP activity, μmolPC/mL/h	5.74 ± 2.53	5.83 ± 2.49	6.11 ± 2.35	0.564
PLTP mass, mg/L	5.62 ± 1.20	6.54 ± 1.42	6.87 ± 1.23	0.0001 ^{a,b}
PLTP specific activity (μmol/mg/L)	1.07 ± 0.37	0.98 ± 0.30	0.91 ± 0.25	0.019 ^a
Hepatic lipase, μmolFFA/mL/h	6.27 (4.98)	4.34 (2.86)	4.12 (4.02)	0.002 ^{a,b}
Lipoprotein lipase, μmolFFA/mL/h	3.29 (3.87)	3.28 (3.79)	4.13 (3.35)	0.408
Exogenous LCAT, nmolCE/mL/h	17 ± 9	17 ± 9	17 ± 8	0.957
Endogenous LCAT, %CE	3.88 ± 1.52	2.86 ± 1.08	2.63 ± 1.10	0.0001 ^{a,b}

PON-1, $\mu\text{mol}/\text{min}$	19 (31)	31 (33)	36 (48)	0.008 ^{a,b}
C-reactive protein, mg/L	1.30 (1.50)	1.06 (1.60)	0.83 (1.30)	0.007 ^{a,c}
PON-1/Apo A-I	0.16 (0.27)	0.20 (0.26)	0.22 (0.26)	0.947
cIMT, mm	0.80 (0.35)	0.71 (0.24)	0.70 (0.19)	0.0001
10-Year ASCV Risk, %	1.25 (2.70)	1.10 (2.60)	0.90 (1.15)	0.156

HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; HOMA2S: homeostasis modeling assessment 2 for insulin sensitivity; HOMA2B: HOMA2 for insulin secretion; Apo: apolipoprotein; GFR: glomerular filtration rate estimated by Modification of Diet in Renal Disease equation; CETP: cholesteryl ester transfer protein; PLTP: phospholipids transfer protein; PC: phosphatidylcholine; LCAT: lecithin cholesterol acyltransferase; CE: cholesteryl ester; PON-1: paraoxonase 1; cIMT: carotid intima-media thickness; normal and non-normal data presented as mean $\pm$ standard deviation or median (interquartile range) respectively; p values were obtained by ANOVA or Kruskal-Wallis. cIMT comparisons were made by ANCOVA adjusted by age and gender. Significant *a posteriori* differences were obtained by Bonferroni or Mann-Whitney test and were indicated as: a= 1st tertile $\neq$ 3rd tertile; b= 1st tertile $\neq$ 2nd tertile; and c 2nd tertile $\neq$ 3rd tertile.

Table 2. Multivariate ordinal logistic regression analysis using cIMT < and ≥ 0.90 mm (80th percentile) as dependent variable

HDL-size	<7.57 nm N=92	7.57-8.22 nm N=93	>8.22 nm N=99
Model 1	Ref group	0.57 (0.23-1.43) p=0.229	0.40 (0.17-0.97) p=0.042
Model 2	Ref group	0.57 (0.19-1.71) p=0.316	0.23 (0.07-0.70) p=0.010
Model 3	Ref group	0.49 (0.16-1.53) p=0.222	0.23 (0.07-0.73) p=0.013
HDL-C	<49 mg/dL N=91	49-71 mg/dL N=101	>71 mg/dL N=92
Model 1	Ref group	0.73 (0.30-1.82) p=0.503	0.58 (0.24-1.38) p=0.216
Model 2	Ref group	0.57 (0.18-1.77) p=0.331	0.40 (0.13-1.27) p=0.120
Model 3	Ref group	0.45 (0.13-1.49) p=0.190	0.42 (0.13-1.37) p=0.153
LDL-C	<98 mg/dL N=92	98-116 mg/dL N=96	>116 mg/dL N=96
Model 1	Ref group	4.36 (1.35-14.05) p=0.014	4.00 (1.25-12.84) p=0.020
Model 2	Ref group	5.80 (1.37-24.59) p=0.017	6.07 (1.52-24.25) p=0.011
Model 3	Ref group	6.06 (1.34-27.41) p=0.019	6.48 (1.58-26.67) p=0.010

Non-HDL-C	<113 mg/dL	113-133 mg/dL	>133 mg/dL
	N=92	N=96	N=96
Model 1	Ref group	4.00 (1.25-12.84)	4.36 (1.35-14.05)
		p=0.020	p=0.014
Model 2	Ref group	4.45 (1.09-18.24)	5.05 (1.28-19.98)
		p=0.038	p=0.021
Model 3	Ref group	3.98 (0.94-16.81)	5.05 (1.26-20.21)
		p=0.060	p=0.022

Model 1: unadjusted; Model 2: adjusted by age, gender and HOMA2S; Model 3: age, gender, HOMA2S, ethnicity (white and non-white) and body surface area. Independent variables HDL-size, HDL-C, LDL-C e Non-HDL-C divided in tertiles. Results are presented as the odds ratio (95% confidence interval) of cIMT above 80th percentile.

References

- [1] Sposito, AC, Alvarenga, BF, Alexandre, AS, et al., Most of the patients presenting myocardial infarction would not be eligible for intensive lipid-lowering based on clinical algorithms or plasma C-reactive protein, *Atherosclerosis*, 2011;214:148-150.
- [2] Natarajan, P, Ray, KK and Cannon, CP, High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies, *J Am Coll Cardiol*, 2010;55:1283-1299.
- [3] Cooney, MT, Dudina, A, De Bacquer, D, et al., How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators, *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2009;16:304-314.
- [4] Khera, AV, Cuchel, M, de la Llera-Moya, M, et al., Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis, *N Engl J Med*, 2011;364:127-135.
- [5] Li, XM, Tang, WH, Mosior, MK, et al., Paradoxical association of enhanced cholesterol efflux with increased incident cardiovascular risks, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013;33:1696-1705.
- [6] de Beer, MC, Durbin, DM, Cai, L, et al., Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI, *J Lipid Res*, 2001;42:309-313.
- [7] Yancey, PG, de la Llera-Moya, M, Swarnakar, S, et al., High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI, *J Biol Chem*, 2000;275:36596-36604.
- [8] Kahn, HS, The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison, *BMC Cardiovasc Disord*, 2005;5:26.
- [9] Friedewald, WT, Levy, RI and Fredrickson, DS, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin Chem*, 1972;18:499-502.
- [10] Caumo, A, Perseghin, G, Brunani, A, et al., New insights on the simultaneous assessment of insulin sensitivity and beta-cell function with the HOMA2 method, *Diabetes Care*, 2006;29:2733-2734.
- [11] Lagrost, L, Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP), *Methods Mol Biol*, 1998;110:231-241.
- [12] Jauhiainen, M and Ehnholm, C, Determination of human plasma phospholipid transfer protein mass and activity, *Methods*, 2005;36:97-101.
- [13] Kleemola, P, Freese, R, Jauhiainen, M, et al., Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans, *Atherosclerosis*, 2002;160:425-432.
- [14] Chisholm, JW, Gebre, AK and Parks, JS, Characterization of C-terminal histidine-tagged human recombinant lecithin:cholesterol acyltransferase, *J Lipid Res*, 1999;40:1512-1519.
- [15] Dobiasova, M, Stribrna, J, Pritchard, PH, et al., Cholesterol esterification rate in plasma depleted of very low and low density lipoproteins is controlled by the proportion of HDL2 and HDL3 subclasses: study in hypertensive and normal middle-aged and septuagenarian men, *J Lipid Res*, 1992;33:1411-1418.
- [16] Ehnholm, C and Kuusi, T, Preparation, characterization, and measurement of hepatic lipase, *Methods Enzymol*, 1986;129:716-738.

- [17] Dias, VC, Parsons, HG, Boyd, ND, et al., Dual-precipitation method evaluated for determination of high-density lipoprotein (HDL), HDL2, and HDL3 cholesterol concentrations, *Clin Chem*, 1988;34:2322-2327.
- [18] Lima, ES and Maranhao, RC, Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma, *Clin Chem*, 2004;50:1086-1088.
- [19] Goff, DC, Jr., Lloyd-Jones, DM, Bennett, G, et al., 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, *Circulation*, 2013.
- [20] Touboul, PJ, Hennerici, MG, Meairs, S, et al., Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011, *Cerebrovasc Dis*, 2012;34:290-296.
- [21] Rosenson, RS, Otvos, JD and Freedman, DS, Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial, *Am J Cardiol*, 2002;90:89-94.
- [22] El Harchaoui, K, Arsenault, BJ, Franssen, R, et al., High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk, *Ann Intern Med*, 2009;150:84-93.
- [23] Mora, S, Otvos, JD, Rifai, N, et al., Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women, *Circulation*, 2009;119:931-939.
- [24] Jarauta, E, Mateo-Gallego, R, Gilabert, R, et al., Carotid atherosclerosis and lipoprotein particle subclasses in familial hypercholesterolaemia and familial combined hyperlipidaemia, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2012;22:591-597.
- [25] de Vries, R, Borggreve, SE and Dullaart, RP, Role of lipases, lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in abnormal high density lipoprotein metabolism in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, *Clin Lab*, 2003;49:601-613.
- [26] Lee, J-Y, Badeau, RM, Mulya, A, et al., Functional LCAT deficiency in human apolipoprotein AI transgenic, SR-BI knockout mice, *Journal of lipid research*, 2007;48:1052-1061.
- [27] Dullaart, RP, Perton, F, Sluiter, WJ, et al., Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity is elevated in metabolic syndrome and is an independent marker of increased carotid artery intima media thickness, *J Clin Endocrinol Metab*, 2008;93:4860-4866.
- [28] de Vries, R, Kappelle, PJ, Dallinga-Thie, GM, et al., Plasma phospholipid transfer protein activity is independently determined by obesity and insulin resistance in non-diabetic subjects, *Atherosclerosis*, 2011;217:253-259.
- [29] Oka, T, Yamashita, S, Kujiraoka, T, et al., Distribution of human plasma PLTP mass and activity in hypo- and hyperalphalipoproteinemia, *J Lipid Res*, 2002;43:1236-1243.
- [30] Cheung, MC, Wolfbauer, G, Deguchi, H, et al., Human plasma phospholipid transfer protein specific activity is correlated with HDL size: implications for lipoprotein physiology, *Biochim Biophys Acta*, 2009;1791:206-211.
- [31] Davidson, WS, Silva, RA, Chantepie, S, et al., Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009;29:870-876.

Os principais objetivos deste trabalho foram: 1 verificar se a presença de dois polimorfismos conhecidos do gene da *CETP*, TaqIB e I405V, está associada à aterosclerose carotídea, e 2 se tamanho da HDL pode se um melhor preditor de doença aterosclerótica carotídea, quando comparada aos níveis plasmáticos de HDLC.

Encontramos que a presença do menor alelo do polimorfismo TaqIB, B2, foi independentemente associada com aumento de 5,1 vezes do risco para maior espessura da camada íntima-medial da artéria carótida comum (EIMc), considerada acima do percentil 66 para esta população, correspondente a EIMc maior que 0,795 mm. Por outro lado, o tamanho maior da HDL (>8,22 nm) foi inversamente associado com maior EIMc, agora definido como acima do percentil 80, correspondente a EIMc maior que 0,90mm. Esta relação persistiu mesmo após ajustes para LDL-C, sensibilidade insulínica e outros tradicionais fatores de risco. Os níveis plasmáticos de HDL-C e atividade da *CETP*, no entanto, não demonstraram associação com aumento ou redução do risco para maiores EIMc.

Na literatura, os estudos sobre a relação desses polimorfismos da *CETP* e aterosclerose são controversos. Encontramos trabalhos em que a presença do alelo B2 foi associada com menor espessura da artéria carótida interna (95), enquanto outros não encontraram associação entre o polimorfismo TaqIB e EIMc (132, 133).

Com relação às atividades das proteínas PLTP e *CETP*, elas foram significativamente menores, 29% e 24% respectivamente, na presença do menor alelo V, mas não diferiram entre presença e ausência do menor alelo B2. Porém, nas análises de correlação de Spearman, encontramos inversas relações entre a atividade da *CETP* e EIMc na presença do menor alelo dos dois polimorfismos, juntamente com positivas correlações entre EIMc e atividade da PLTP e títulos de anticorpos anti-LDL oxidada.

Recentemente, um papel potencialmente anti-inflamatório tem sido atribuído à *CETP*. Primeiro, a *CETP* pertence à família de ligante de lipopolissacarídeo, e

alguns estudos demonstraram que a expressão da CETP humana em camundongos diminui a morte por sepse (48). Além disso, em humanos com sepse, há uma maior frequência daqueles que apresentam baixas concentrações de CETP, dentre os não sobreviventes (49).

Alguns estudos sugerem também que a PLTP aumenta o risco de DCV em humanos (134), e que os títulos de anticorpos anti-LDL oxidada contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose (135). Com base na literatura e nos nossos achados, podemos sugerir que o perfil dos portadores dos menores alelos, B2 e V, dos polimorfismos TaqIB e I405V do gene da *CETP* são mais aterogênicos comparados aos indivíduos com ausências destes alelos. Análises de correlações de Spearman com os indivíduos com ausências dos menores alelos não encontraram essas associações, reforçando ainda mais nossa sugestão.

Ainda mais, os níveis plasmáticos de lipoproteína (a) foram maiores nos indivíduos com a presença do alelo B2. Altos níveis de lipoproteína (a) são significativamente associados com presença, agravamento e extensão da aterosclerose carotídea (136), mas este aumento no nosso estudo não foi observado como um possível fator proaterogênico.

Os níveis de HDL₂ foram maiores nos indivíduos com a presença do alelo V comparado aos com ausência deste alelo. Em muitos estudos (112, 113, 119), apesar de não confirmado em todos (137), as subpopulações maiores de HDL são inversamente associadas com o risco cardiovascular. Pacientes com doença coronária tipicamente apresentam menores concentrações de partículas grandes de HDL (138). Este seria então o único parâmetro inverso ao risco cardiovascular que está significativamente aumentado na presença do menor alelo V, que poderia ser o motivo para a falta de associação com aumento do risco de maior EIMc observada no outro polimorfismo.

Apesar da redução de 15,4% da atividade da CETP na presença do alelo B2, em relação à ausência deste alelo, essa diferença não foi estatisticamente significativa e não alterou os níveis plasmáticos de HDL-C. Apesar de muitos

estudos demonstrarem que este alelo é associado a reduções significantes da atividade da CETP e com aumentos dos níveis plasmáticos de HDL-C, esses nossos resultados são semelhantes a outro estudo Brasileiro com indivíduos diabéticos e controles (139).

Procuramos entender pelos fatores bioquímicos estudados esse aumento do risco para maior EIMc na presença do alelo B2, porém, multivariadas com as proteínas de transferências e variáveis de confusão demonstraram que apenas a idade foi um forte determinante da EIMc (dados não demonstrados), sugerindo que outros fatores não estudados aqui poderiam modular essa relação entre o alelo B2 e o risco para EIMc maior. Assim, testamos essa razão de risco em indivíduos com idade ≥ 50 anos e encontramos que a presença do alelo B2 também exhibe maior risco de maior EIMc neste subgrupo (dados não demonstrados). Desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos dentro do gene da *CETP* poderiam também explicar essas associações (140).

Assim como HDL₂, grandes diâmetros da HDL medidos por RNM também são negativamente associadas com risco cardiovascular (118, 119) (117). Neste contexto, a média do tamanho das partículas de HDL pode representar uma medida integrativa do perfil da HDL. Consistentemente, o tamanho das partículas de HDL obtidas por RNM foi inversamente associada com EIMc em um estudo com indivíduos com hipercolesterolemia familiar e em indivíduos controles (141).

No nosso estudo, optamos por medir o diâmetro da HDL por técnica de DLS, após precipitação química das lipoproteínas que contém apo B com PEG 8000, com validação previamente publicada (110). Esta técnica tem abordagem simples, barata e acessível comparada com as técnicas de RNM ou mesmo com eletroforese em gel de poliacrilamida de gradiente. De forma consistente, nós encontramos uma inversa associação entre o tamanho da HDL e EIMc em indivíduos assintomáticos, com baixo risco cardiovascular, em ambos gêneros, em um ambiente de prevenção primária. A associação foi independente da sensibilidade insulínica, idade e LDL-C. Níveis plasmáticos de LDL-C e não-HDL-

C foram fortes preditores para maiores EIMc, resultado esse esperado, e que confirma a precisão do desenho do nosso estudo.

Apesar das partículas de HDL menores serem mais potentes na ação de efluxo do colesterol das células, as partículas maiores parece ser mais eficientes, principalmente por se ligarem preferencialmente aos receptores SR-BI (34). Essa maior afinidade entre grandes partículas de HDL e SR-B1 foi descrita por ser devida à conformação da molécula de apoA-I associada ao tamanho da partícula (34), e também por sua composição e concentração de fosfolípidos, que difere das partículas de HDL menores (105). Outra informação relevante é que grandes HDLs apresentam maiores concentrações de esfingomielina (142), que é o segundo fosfolípide mais abundante na HDL após a fosfatidilcolina (143), e sugerido como um preditor da capacidade do soro de aceitar colesterol, sendo mais correlacionada com efluxo fracional (144). Também é sugerido que fosfatidilcolina aumente o efluxo de colesterol mediado pelo SR-B1, porém por vias diferentes da esfingomielina (105).

Síndrome metabólica é reconhecida por alterar o metabolismo da HDL e o tamanho das suas subpopulações (124), por este motivo, ela foi considerada como um fator de exclusão para a seleção dos nossos voluntários, contudo, observamos que o grupo com os indivíduos com menores tamanhos de HDL tem maiores níveis de triglicérides, circunferência de cintura, e menor sensibilidade à insulina comparada aos grupos com maiores tamanhos de HDL.

As atividades endógena da LCAT e exógena da LH foram ambas aumentadas entre os indivíduos com menor tamanho de HDL. Estas proteínas podem contribuir para a redução do tamanho da HDL e ainda são consistentes com o declínio da sensibilidade à insulina (145-147). Do mesmo modo, a atividade da PLTP também é descrita por ser inversamente relacionada com sensibilidade insulínica e envolve o remodelamento da HDL (148). Apesar da massa de PLTP diferir entre os grupos de tamanho da HDL, a atividade da PLTP não demonstrou significância estatística. Essa relação está em acordo com estudos publicados

anteriormente (149). Por consequência, a atividade específica da PLTP (atividade/massa), que reflete a proporção de isoformas ativas e inativas de PLTP, foi menor entre os indivíduos com maior tamanho de HDL. Embora a atividade da PLTP seja associada com ambos, aumento e diminuição do tamanho da HDL, a atividade específica parece ser mais relacionada com o efeito de redução do tamanho da HDL (150). Assim, é concebível que esse caráter metabólico que compreende o declínio na sensibilidade à insulina é, independentemente, um estímulo considerável para a redução do tamanho da HDL e aumentos dos níveis plasmáticos de PCR e EIMc. Neste contexto, realizamos uma análise multivariada e encontramos que a associação do tamanho da HDL com EIMc ou PCR excede o seu vínculo indireto através da diminuição da sensibilidade à insulina.

Apesar de serem descritas previamente que atividades superiores da PON-1 são associadas às menores partículas de HDL, a atividade plasmática da PON-1 no nosso estudo foi associada com as maiores partículas de HDL. Esse aumento da atividade da PON-1 observado nos participantes com maiores partículas de HDL é provável de ser resultado de uma associação positiva entre o tamanho e o número de partículas de HDL (103). De fato, quando a razão entre atividade da PON-1 e apoA-I foi comparada entre os grupos, a significância estatística deixou de existir.

No estudo dos dois polimorfismos do gene da *CETP* focamos em vários biomarcadores que foram pela primeira vez abordada na população Brasileira, e os nossos resultados foram parcialmente baseados nas correlações entre um número de indivíduos relativamente pequeno. Estes resultados merecem uma maior exploração, principalmente devido à alta frequência destes polimorfismos na presente amostra Brasileira.

Com relação ao tamanho das partículas de HDL, estudos futuros de efluxo e de identificação da composição de fosfolípidos podem ajudar a melhor explorar essa relação entre o tamanho da HDL e EIMc.

CONCLUSÃO GERAL

Os polimorfismos TaqIB e I405V do gene da *CETP* foram diferentemente associadas com aterosclerose subclínica porque apenas a presença do menor alelo B2, mas não o alelo V, foi associada com aumento da EIMc. Demonstramos também que nenhum dos parâmetros estudados, inclusive tamanho da HDL, explicaram as diferentes relações entre estes polimorfismos e EIMc. Com relação à HDL, apenas os níveis plasmáticos de HDL₂ foram diferentes na presença do alelo V.

A média do tamanho das partículas de HDL, estimado por DLS, representou um melhor preditor de aterosclerose carotídea subclínica, comparado ao já tradicional níveis plasmáticos de HDL-C. Maior tamanho de HDL foi inversamente relacionados à maior EIMc, enquanto os níveis plasmáticos de HDL-C não demonstraram significantes associações com EIMc.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Causes-specific mortality, 2008: WHO region by country. In: Organization WH, editor. GenevaMay, 2011.
2. DATASUS. Informações de Saúde (TABNET) - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. Consolidação da base de dados de 2011. Brasília2013. p. 2.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Evolução da mortalidade no Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. . In: Saúde Md, editor.2004. p. 87.
4. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *The American journal of medicine*. 1977;62(5):707-14.
5. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*. 1986;256(20):2835-8.
6. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, et al. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):493-511. PMID: 3682699.
7. Prosser HC, Ng MK, Bursill CA. The role of cholesterol efflux in mechanisms of endothelial protection by HDL. *Curr Opin Lipidol*. 2012;23(3):182-9.
8. Corsetti JP, Ryan D, Moss AJ, Zareba W, Sparks CE. NAD(P)H oxidase polymorphism (C242T) and high HDL cholesterol associate with recurrent coronary events in postinfarction patients. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):461-8.
9. Corsetti JP, Ryan D, Rainwater DL, Moss AJ, Zareba W, Sparks CE. Cholesteryl ester transfer protein polymorphism (TaqIB) associates with risk in postinfarction patients with high C-reactive protein and high-density lipoprotein cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(8):1657-64. PMID: 3051187.
10. Miller M, Rhyne J, Hamlette S, Birnbaum J, Rodriguez A. Genetics of HDL regulation in humans. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14(3):273-9.
11. Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *J Lipid Res*. 2012;53(9):1755-66. PMID: 3413218.
12. Tenenbaum A, Fisman EZ. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:125. PMID: 3489608.
13. Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Fitzgerald A, Conroy R, Sans S, et al. How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16(3):304-14.
14. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(4):276-94.
15. Zannis VI, Cole FS, Jackson CL, Kurnit DM, Karathanasis SK. Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry*. 1985;24(16):4450-5.
16. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis*. 1999;145(2):227-38.
17. Kontush A, Chapman MJ. High-density lipoproteins : structure, metabolism, function, and therapeutics. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
18. Duong PT, Weibel GL, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Characterization and properties of pre β -HDL particles formed by ABCA1-mediated cellular lipid efflux to apoA-I. *Journal of lipid research*. 2008;49(5):1006-14.
19. Bhat S, Sorci-Thomas MG, Tuladhar R, Samuel MP, Thomas MJ. Conformational adaptation of apolipoprotein A-I to discretely sized phospholipid complexes. *Biochemistry*. 2007;46(26):7811-21. PMID: 2553278.
20. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011;17(10):594-603.
21. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9(2):155-67.
22. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Remodelling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin: cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res*. 1996;37(9):1962-70.

23. Tall A. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *Journal of lipid research*. 1993;34(8):1255-74.
24. Newnham HH, Barter PJ. Synergistic effects of lipid transfers and hepatic lipase in the formation of very small high-density lipoproteins during incubation of human plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1044(1):57-64.
25. Clay MA, Newnham HH, Barter PJ. Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro. *Arterioscler Thromb*. 1991;11(2):415-22.
26. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ. Evidence that cholesteryl ester transfer protein-mediated reductions in reconstituted high density lipoprotein size involve particle fusion. *J Biol Chem*. 1997;272(7):3953-60.
27. Jauhiainen M, Metso J, Pahlman R, Blomqvist S, van Tol A, Ehnholm C. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J Biol Chem*. 1993;268(6):4032-6.
28. Settasatian N, Duong M, Curtiss LK, Ehnholm C, Jauhiainen M, Huuskonen J, et al. The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem*. 2001;276(29):26898-905.
29. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet*. 1999;21(4):424-8.
30. Jahangiri A, Rader DJ, Marchadier D, Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res*. 2005;46(5):896-903.
31. Webb NR, de Beer MC, Asztalos BF, Whitaker N, van der Westhuyzen DR, de Beer FC. Remodeling of HDL remnants generated by scavenger receptor class B type I. *J Lipid Res*. 2004;45(9):1666-73.
32. Webb NR, Cai L, Ziemba KS, Yu J, Kindy MS, van der Westhuyzen DR, et al. The fate of HDL particles in vivo after SR-BI-mediated selective lipid uptake. *J Lipid Res*. 2002;43(11):1890-8.
33. de Beer MC, Durbin DM, Cai L, Mirocha N, Jonas A, Webb NR, et al. Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective lipid uptake of reconstituted high density lipoprotein by scavenger receptor BI. *J Biol Chem*. 2001;276(19):15832-9.
34. de Beer MC, Durbin DM, Cai L, Jonas A, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Res*. 2001;42(2):309-13.
35. Chapman MJ, Le Goff W, Guerin M, Kontush A. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *European heart journal*. 2010;31(2):149-64.
36. Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, Chrnyk BA, Clark RW, Cong Y, et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(2):106-13.
37. Van Eck M, Ye D, Hildebrand RB, Kruijt JK, de Haan W, Hoekstra M, et al. Important role for bone marrow-derived cholesteryl ester transfer protein in lipoprotein cholesterol redistribution and atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice. *Circulation research*. 2007;100(5):678-85.
38. Zhang Z, Yamashita S, Hirano K-i, Nakagawa-Toyama Y, Matsuyama A, Nishida M, et al. Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2001;159(1):67-75.
39. Yamada T, Kawata M, Arai H, Fukasawa M, Inoue K, Sato T. Astroglial localization of cholesteryl ester transfer protein in normal and Alzheimer's disease brain tissues. *Acta neuropathologica*. 1995;90(6):633-6.
40. Charles MA, Kane JP. New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res*. 2012;53(8):1451-8. PMID: 3540851.
41. Zhang L, Yan F, Zhang S, Lei D, Charles MA, Cavigliolo G, et al. Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nat Chem Biol*. 2012;8(4):342-9. PMID: 3792710.
42. Morton RE, Greene DJ. The surface cholesteryl ester content of donor and acceptor particles regulates CETP: a liposome-based approach to assess the substrate properties of lipoproteins. *J Lipid Res*. 2003;44(7):1364-72.

43. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1994;35(7):1187-99.
44. Xiao C, Watanabe T, Zhang Y, Trigatti B, Szeto L, Connelly PW, et al. Enhanced cellular uptake of remnant high-density lipoprotein particles: a mechanism for high-density lipoprotein lowering in insulin resistance and hypertriglyceridemia. *Circ Res.* 2008;103(2):159-66.
45. Hine D, Mackness B, Mackness M. Cholesteryl-ester transfer protein enhances the ability of high-density lipoprotein to inhibit low-density lipoprotein oxidation. *IUBMB Life.* 63(9):772-4.
46. Castilho LN, Oliveira HC, Cazita PM, de Oliveira AC, Sesso A, Quintao EC. Oxidation of LDL enhances the cholesteryl ester transfer protein (CETP)-mediated cholesteryl ester transfer rate to HDL, bringing on a diminished net transfer of cholesteryl ester from HDL to oxidized LDL. *Clin Chim Acta.* 2001;304(1-2):99-106.
47. Bingle CD, Craven CJ. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Human molecular genetics.* 2002;11(8):937-43.
48. Cazita PM, Barbeiro DF, Moretti AI, Quintao EC, Soriano FG. Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP. *Shock.* 2008;30(5):590-5.
49. Grion CM, Cardoso LT, Perazolo TF, Garcia AS, Barbosa DS, Morimoto HK, et al. Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. *Eur J Clin Invest.* 40(4):330-8.
50. Vassiliou G, McPherson R. Role of cholesteryl ester transfer protein in selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by adipocytes. *J Lipid Res.* 2004;45(9):1683-93.
51. Harada LM, Amigo L, Cazita PM, Salerno AG, Rigotti AA, Quintao EC, et al. CETP expression enhances liver HDL-cholesteryl ester uptake but does not alter VLDL and biliary lipid secretion. *Atherosclerosis.* 2007;191(2):313-8.
52. Oliveira HC, de Faria EC. Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB Life.* 63(4):248-57.
53. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature.* 1993;364(6432):73-5.
54. Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, Bisgaier CL, Breslow JL, Tall AR. Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 1999;19(4):1105-10.
55. Herrera VL, Makrides SC, Xie HX, Adari H, Krauss RM, Ryan US, et al. Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein. *Nature medicine.* 1999;5(12):1383-9.
56. Rittershaus CW, Miller DP, Thomas LJ, Picard MD, Honan CM, Emmett CD, et al. Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2000;20(9):2106-12.
57. Sugano M, Makino N, Sawada S, Otsuka S, Watanabe M, Okamoto H, et al. Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(9):5033-6.
58. Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature.* 2000;406(6792):203-7.
59. Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow J, et al. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *Journal of Clinical Investigation.* 1995;96(4):2071.
60. Berti J, De Faria E, Oliveira H. Atherosclerosis in aged mice over-expressing the reverse cholesterol transport genes. *Brazilian journal of medical and biological research.* 2005;38(3):391-8.
61. Föger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, et al. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(52):36912-20.
62. Kako Y, Massé M, Huang L-S, Tall AR, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase deficiency and CETP in streptozotocin-treated apoB-expressing mice. *Journal of lipid research.* 2002;43(6):872-7.

63. MacLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, Osborne JN, Bradfield JF, Burden HW, et al. Cholesteryl ester transfer protein expression prevents diet-induced atherosclerotic lesions in male db/db mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(8):1412-5.
64. Harder C, Lau P, Meng A, Whitman SC, McPherson R. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression protects against diet induced atherosclerosis in SR-BI deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):858-64.
65. Vasan RS, Pencina MJ, Robins SJ, Zachariah JP, Kaur G, D'Agostino RB, et al. Association of circulating cholesteryl ester transfer protein activity with incidence of cardiovascular disease in the community. *Circulation*. 2009;120(24):2414-20.
66. Robins SJ, Lyass A, Brocia RW, Massaro JM, Vasan RS. Plasma lipid transfer proteins and cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2013;228(1):230-6. PMID: 3692011.
67. Joy T, Hegele RA. Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(2):143-55.
68. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007;357(21):2109-22.
69. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;367(22):2089-99.
70. Lim GB. Lipids. Dalcetrapib raises HDL-cholesterol level, but does not reduce cardiac risk. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(1):5.
71. Boettcher MF, Heinig R, Schmeck C, Kohlsdorfer C, Ludwig M, Schaefer A, et al. Single dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of BAY 60-5521, a potent inhibitor of cholesteryl ester transfer protein. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;73(2):210-8. PMID: 3269580.
72. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(12):2917.
73. Curb J, Abbott R, Rodriguez B, Masaki K, Chen R, Sharp D, et al. A prospective study of HDL-C and cholesteryl ester transfer protein gene mutations and the risk of coronary heart disease in the elderly. *Journal of lipid research*. 2004;45(5):948-53.
74. Hirano K-i, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17(6):1053-9.
75. Agellon LB, Quinet EM, Gillette TG, Drayna DT, Brown ML, Tall AR. Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry*. 1990;29(6):1372-6.
76. Lusis AJ, Zollman S, Sparkes RS, Klisak I, Mohandas T, Drayna D, et al. Assignment of the human gene for cholesteryl ester transfer protein to chromosome 16q12-16q21. *Genomics*. 1987;1(3):232-5.
77. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, et al. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature*. 1989;342(6248):448-51.
78. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med*. 1990;323(18):1234-8.
79. Koizumi J, Mabuchi H, Yoshimura A, Michishita I, Takeda M, Itoh H, et al. Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis*. 1985;58(1):175-86.
80. Yamashita S, Matsuzawa Y, Okazaki M, Kako H, Yasugi T, Akioka H, et al. Small polydisperse low density lipoproteins in familial hyperalphalipoproteinemia with complete deficiency of cholesteryl ester transfer activity. *Atherosclerosis*. 1988;70(1):7-12.
81. de Grooth GJ, Klerkx AH, Stroes ES, Stalenhoef AF, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *Journal of lipid research*. 2004;45(11):1967-74.
82. Matsuura F, Wang N, Chen W, Jiang X-C, Tall AR. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE-and ABCG1-dependent pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(5):1435-42.

83. Inazu A, Jiang X-C, Haraki T, Yagi K, Kamon N, Koizumi J, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;94(5):1872.
84. Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, Erqou S, Saleheen D, Dullaart RP, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2008;299(23):2777-88.
85. Doğru-Abbasoğlu S, Parıldar-Karpuzoğlu H, Depboylu B, Çine N, Uysal M, Aykaç-Toker G. I405V and TaqIB polymorphisms of the cholesteryl ester transfer protein and their relation to serum lipid and lipoprotein levels in a Turkish population. *Cell biochemistry and function*. 2009;27(2):76-80.
86. Kuivenhoven JA, de Knijff P, Boer JM, Smalheer HA, Botma G-J, Seidell JC, et al. Heterogeneity at the CETP gene locus Influence on plasma CETP concentrations and HDL cholesterol levels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17(3):560-8.
87. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martinez A, et al. Association of Cholesteryl Ester Transfer Protein–TaqIB Polymorphism With Variations in Lipoprotein Subclasses and Coronary Heart Disease Risk The Framingham Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(5):1323-9.
88. Kauma H, Savolainen MJ, Heikkilä R, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, et al. Sex difference in the regulation of plasma high density lipoprotein cholesterol by genetic and environmental factors. *Human genetics*. 1996;97(2):156-62.
89. Freeman DJ, Griffin BA, Holmes AP, Lindsay GM, Gaffney D, Packard CJ, et al. Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Associations between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1994;14(3):336-44.
90. Vohl M, Lamarche B, Pascot A, Leroux G, Prud'Homme D, Bouchard C, et al. Contribution of the cholesteryl ester transfer protein gene TaqIB polymorphism to the reduced plasma HDL-cholesterol levels found in abdominal obese men with the features of the insulin resistance syndrome. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1999;23(9):918-25.
91. Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O, et al. Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;96(3):1664.
92. Durlach A, Clavel C, Girard-Globa A, Durlach V. Sex-dependent association of a genetic polymorphism of cholesteryl ester transfer protein with high-density lipoprotein cholesterol and macrovascular pathology in type II diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(10):3656-9.
93. Brousseau ME, O'Connor JJ, Jr., Ordovas JM, Collins D, Otvos JD, Massov T, et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(7):1148-54.
94. Pan SL, Wang F, Lu ZP, Liu CW, Hu CY, Luo H, et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB polymorphism and its association with serum lipid levels and longevity in Chinese Bama Zhuang population. *Lipids Health Dis*. 2012;11:26. PMID: 3298723.
95. Elosua R, Cupples LA, Fox CS, Polak JF, D'Agostino RA, Sr., Wolf PA, et al. Association between well-characterized lipoprotein-related genetic variants and carotid intimal medial thickness and stenosis: The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):222-8.
96. Hsieh MC, Chen CC, Wang JY, Chong IW, Yhe CJ, Shin SJ, et al. Cholesteryl ester transfer protein B1B1 genotype is associated with a parental history of cardiovascular diseases in Taiwanese people. *Med Princ Pract*. 2008;17(2):143-8.
97. Boekholdt SM, Thompson JF. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. *Journal of lipid research*. 2003;44(6):1080-93.
98. Bruce C, Sharp DS, Tall AR. Relationship of HDL and coronary heart disease to a common amino acid polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein in men with and without hypertriglyceridemia. *Journal of lipid research*. 1998;39(5):1071-8.

99. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Elevated HDL cholesterol is a risk factor for ischemic heart disease in white women when caused by a common mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene. *Circulation*. 2000;101(16):1907-12.
100. Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, et al. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2003;290(15):2030-40.
101. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(4):222-32.
102. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364(2):127-35. PMID: 3030449.
103. Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(6):870-6. PMID: 2845307.
104. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(3):229-38. PMID: 3215082.
105. Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, et al. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem*. 2000;275(47):36596-604.
106. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med*. 2006;26(4):847-70.
107. Garcia-Sanchez C, Torres-Tamayo M, Juarez-Meavepena M, Lopez-Osorio C, Toledo-Ibelles P, Monter-Garrido M, et al. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2011;412(3-4):292-8.
108. Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. High-density lipoprotein quantity or quality for cardiovascular prevention? *Curr Pharm Des*. 2010;16(13):1494-503.
109. Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(3):176-85.
110. Lima ES, Maranhao RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem*. 2004;50(6):1086-8.
111. O'Neal D, Harrip P, Dragicevic G, Rae D, Best JD. A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light-scattering methods. *J Lipid Res*. 1998;39(10):2086-90.
112. Bakogianni MC, Kalofoutis CA, Skenderi KI, Kalofoutis AT. Clinical evaluation of plasma high-density lipoprotein subfractions (HDL2, HDL3) in non-insulin-dependent diabetics with coronary artery disease. *J Diabetes Complications*. 2001;15(5):265-9.
113. Watanabe H, Soderlund S, Soro-Paavonen A, Hiukka A, Leinonen E, Alagona C, et al. Decreased high-density lipoprotein (HDL) particle size, prebeta-, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL families: relationship with intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(4):897-902.
114. Lamarche B, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Associations of HDL2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(6):1098-105.
115. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1991;325(6):373-81.
116. Atger V, Giral P, Simon A, Cambillau M, Levenson J, Garipey J, et al. High-density lipoprotein subfractions as markers of early atherosclerosis. PCVME TRA Group. *Prevention Cardio-Vasculaire en Medecine du Travail*. *Am J Cardiol*. 1995;75(2):127-31.
117. Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am J Cardiol*. 2002;90(2):89-94.

118. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Despres JP, Hovingh GK, Stroes ES, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med.* 2009;150(2):84-93.
119. Mora S, Otvos JD, Rifai N, Rosenson RS, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation.* 2009;119(7):931-9. PMID: 2663974.
120. Pérez-Méndez O, García-Sánchez C, Romero CP, Vargas-Alarcón G. Low cholesterol and phosphatidylcholine plasma concentrations of high-density lipoproteins subclasses in subjects with coronary calcium score above the 75th percentile for age and gender. *Journal of the American College of Cardiology.* 2013;61(10_S).
121. Chung CP, Oeser A, Raggi P, Sokka T, Pincus T, Solus JF, et al. Lipoprotein subclasses determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy and coronary atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2010;37(8):1633-8. PMID: 2914215.
122. Hua X, Su J, Svenungsson E, Hurt-Camejo E, Jensen-Ustad K, Angelin B, et al. Dyslipidaemia and lipoprotein pattern in systemic lupus erythematosus (SLE) and SLE-related cardiovascular disease. *Scand J Rheumatol.* 2009;38(3):184-9.
123. Mora S, Otvos JD, Rosenson RS, Pradhan A, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes.* 2010;59(5):1153-60. PMID: 2857895.
124. Festa A, Williams K, Hanley AJ, Otvos JD, Goff DC, Wagenknecht LE, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation.* 2005;111(25):3465-72.
125. Perez-Mendez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, Vidaure Garces V, Carreon-Torres E, Mendoza-Perez E, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 2007;376(1-2):17-22.
126. Curb JD, Ueshima H, Rodriguez BL, He Q, Koropatnick TA, Nakagawa H, et al. Differences in lipoprotein particle subclass distribution for Japanese Americans in Hawaii and Japanese in Japan: the INTERLIPID study. *J Clin Lipidol.* 2011;5(1):30-6.
127. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Shalurova I, Cupples LA, Parise H, et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: the Framingham Study. *Clin Chem.* 2004;50(7):1189-200.
128. Johnson JL, Slentz CA, Duscha BD, Samsa GP, McCartney JS, Houmard JA, et al. Gender and racial differences in lipoprotein subclass distributions: the STRRIDE study. *Atherosclerosis.* 2004;176(2):371-7.
129. Hodge AM, Jenkins AJ, English DR, O'Dea K, Giles GG. NMR-determined lipoprotein subclass profile is associated with dietary composition and body size. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21(8):603-9.
130. Muth ND, Laughlin GA, von Muhlen D, Smith SC, Barrett-Connor E. High-density lipoprotein subclasses are a potential intermediary between alcohol intake and reduced risk of cardiovascular disease: the Rancho Bernardo Study. *Br J Nutr.* 2010;104(7):1034-42.
131. Aadland E, Andersen JR, Anderssen SA, Kvalheim OM. Physical activity versus sedentary behavior: associations with lipoprotein particle subclass concentrations in healthy adults. *PLoS One.* 2013;8(12):e85223. PMID: 3874032.
132. Soyal SM, Sandhofer A, Hahne P, Oberkofler H, Felder T, Iglseider B, et al. Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase gene polymorphisms: effects on hepatic mRNA levels, plasma lipids and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2011;216(2):374-80.
133. Tsai MY, Johnson C, Kao W, Sharrett AR, Arends VL, Kronmal R, et al. Cholesteryl ester transfer protein genetic polymorphisms, HDL cholesterol, and subclinical cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2008;200(2):359-67.
134. Jarvik GP, Rajagopalan R, Rosenthal EA, Wolfbauer G, McKinstry L, Vaze A, et al. Genetic and nongenetic sources of variation in phospholipid transfer protein activity. *J Lipid Res.* 2010;51(5):983-90. PMID: 2853466.
135. Chen HW, Kuo CL, Huang CS, Kuo SJ, Liu CS. Oxidized low-density lipoproteins, autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and carotid intima media thickness in a clinically healthy population. *Cardiology.* 2008;110(4):252-9.

136. Kim BS, Jung HS, Bang OY, Chung CS, Lee KH, Kim GM. Elevated serum lipoprotein(a) as a potential predictor for combined intracranial and extracranial artery stenosis in patients with ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2010;212(2):682-8.
137. van der Steeg WA, Holme I, Boekholdt SM, Larsen ML, Lindahl C, Stroes ES, et al. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for cardiovascular risk: the IDEAL and EPIC-Norfolk studies. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(6):634-42.
138. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2185-91.
139. Relvas WG, Izar MC, Helfenstein T, Fonseca MI, Colovati M, Oliveira A, et al. Relationship between gene polymorphisms and prevalence of myocardial infarction among diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):101-5.
140. Klerkx AH, Tanck MW, Kastelein JJ, Molhuizen HO, Jukema JW, Zwinderman AH, et al. Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked -629C-->A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration. *Hum Mol Genet*. 2003;12(2):111-23.
141. Jarauta E, Mateo-Gallego R, Gilabert R, Plana N, Junyent M, de Groot E, et al. Carotid atherosclerosis and lipoprotein particle subclasses in familial hypercholesterolaemia and familial combined hyperlipidaemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(7):591-7.
142. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Negre-Salvayre A, de Souza JA, et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1843-9.
143. Martinez-Beamonte R, Lou-Bonafonte JM, Martinez-Gracia MV, Osada J. Sphingomyelin in high-density lipoproteins: structural role and biological function. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):7716-41. PMID: 3645712.
144. Fournier N, Paul JL, Atger V, Cogny A, Soni T, de la Llera-Moya M, et al. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(11):2685-91.
145. de Vries R, Borggreve SE, Dullaart RP. Role of lipases, lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in abnormal high density lipoprotein metabolism in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab*. 2003;49(11-12):601-13.
146. Lee J-Y, Badeau RM, Mulya A, Boudyguina E, Gebre AK, Smith TL, et al. Functional LCAT deficiency in human apolipoprotein AI transgenic, SR-BI knockout mice. *Journal of lipid research*. 2007;48(5):1052-61.
147. Dullaart RP, Perton F, Sluiter WJ, de Vries R, van Tol A. Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity is elevated in metabolic syndrome and is an independent marker of increased carotid artery intima media thickness. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(12):4860-6.
148. de Vries R, Kappelle PJ, Dallinga-Thie GM, Dullaart RP. Plasma phospholipid transfer protein activity is independently determined by obesity and insulin resistance in non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 2011;217(1):253-9.
149. Oka T, Yamashita S, Kujiraoka T, Ito M, Nagano M, Sagehashi Y, et al. Distribution of human plasma PLTP mass and activity in hypo- and hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 2002;43(8):1236-43.
150. Cheung MC, Wolfbauer G, Deguchi H, Fernandez JA, Griffin JH, Albers JJ. Human plasma phospholipid transfer protein specific activity is correlated with HDL size: implications for lipoprotein physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(3):206-11. PMID: 2733856.