

DENISE BEHEREGARAY KAPLAN

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **DENISE BEHEREGARAY KAPLAN**.

Campinas, 31 de Agosto de 2004.

* 
Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria
Orientador(a)

***GENÉTICA DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DOS
ÉSTERES DE COLESTEROL (CETP) NA
HIPERALFALIPOPROTEINEMIA E SUA RELAÇÃO
COM A ATEROSCLEROSE***

2005 05 24 4

CAMPINAS

2004

DENISE BEHEREGARAY KAPLAN

***GENÉTICA DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DOS
ÉSTERES DE COLESTEROL (CETP) NA
HIPERALFALIPOPROTEINEMIA E SUA RELAÇÃO
COM A ATEROSCLEROSE***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas,
área de Ciências Biomédicas*

ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. ELIANA COTTA DE FARIA

CO-ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. HELENA C. F. OLIVEIRA

CAMPINAS

2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

K141g Kaplan, Denise Beheregaray
Genética da proteína de transferência dos ésteres de colesterol (CETP) na hiperalfalipoproteinemia e sua relação com a aterosclerose / Denise Beheregaray Kaplan . Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Eliana Cotta de Faria, Helena Coutinho Franco de Oliveira

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteínas de transporte. 2. Genética. 3. Aterosclerose. I. Eliana Cotta de Faria. II. Helena Coutinho Franco de Oliveira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	K141g / Unicamp
V	EX
TOMBO BC/	62122
PROC.	16-06-05
C	☐
	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	22/02/05
Nº CPD	

Bib. d. 341677

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria

Membros:

1. Mario Hirata

2. Marisa Passarelli

3. Ligia Vera Montalli Assumpção

4. Lucia Nassi Castilho

5. Eliana Cotta de Faria

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2004

DEDICATÓRIA

À minha família.

Aos meus amigos.

Aos meus pacientes.

O mais sincero reconhecimento às:

Minhas orientadora e co-orientadora, Prof^ª. Dr^a. Eliana e Prof^ª. Dr^a. Helena, por insistirem em ensinar o que eu não sabia e concordarem em concluirmos juntas este trabalho, em condições tão pouco usuais,

Aparecida S. Pereira: responsável pela coleta de material para análise e assistência aos voluntários, além de suporte técnico (com sua especial dedicação),

Prof. Dr. Roberto Schreiber, Míriam Danelon, Valéria Malena Moda e Maria Laura Yamashita Cruz: excelente apoio técnico bioquímico e molecular,

Prof^ª. Dr^a. Lila Harada: suporte técnico e teórico, além da amizade e dedicação (em todos os momentos),

Mestranda Juliana Tentor: seleção de pacientes e convocação de voluntários, apoio técnico e logístico (além da amizade e entusiasmo),

Mestranda Cláudia Barbosa: seleção de pacientes e convocação de voluntários.

Departamentos/Laboratórios/Serviços da UNICAMP

No Laboratório de Patologia Clínica – HC: Cidinha e Marielza. No Setor de Coleta: Elizabeth, Lucélia, Romênia, Néder e Toyoko,

Na ultrassonografia de carótidas: Dr. Rui Nakamura e equipe do Alfa Diagnóstico,

No Laboratório de Bioenergética – NMCE: Prof. Dr. Aníbal Versaci, com apoio e suporte técnico de Márcia Fagiane,

No Ambulatório de Clínica Médica – HC: pessoal de enfermagem,

No Serviço de Eletrocardiografia – HC: pessoal de enfermagem,

No Departamento de Fisiologia e Biofísica - IB: Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero. Os amigos da pós-graduação: Profª. Drª. Janaína, Profª. Andréa, Prof. Dr. Jairo, doutorandos Alessandro, Helena Lima e Fabrízio, além de Patrícia, pelo suporte técnico e teórico,

No Departamento de Estatística – Matemática: Profª. Drª. Hildete Pinheiro

No Setor de Informática – NMCE: Jorge Airton Cicala, pelo apoio técnico.

Laboratórios e Institutos em São Paulo e Ribeirão Preto

No Laboratório de Lípidos-USP- Ribeirão Preto: Júlia Keiko e Prof. Dr. José Ernesto do Santos,

No Laboratório de Lípidos (LIM 10)-HC-USP: Prof. Dr. Éder Quintão e Profª. Drª. Edna Nakandakare,

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – São Paulo - Ambulatório de Dislipidemias : Dr. Marcelo Bertolami e equipe pela seleção de alguns pacientes,

No Laboratório de Imunofisiopatologia-ICB-USP e IMT-SP: Prof. Dr. Magnus Gidlund, No LABMAD – USP: Prof. Dr. Mário e Profª. Drª. Rosário Hirata e Carlos Melo.

E a todos os voluntários que participaram deste estudo.

*Se você pensa que pode, ou se você pensa que
não pode, de qualquer maneira você está certo.*

Henry Ford

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxix</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxiii</i>
1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	37
1 - Propriedades da lipoproteína de alta densidade (HDL).....	40
2 - Hiperalfalipoproteinemia Primária (HALP).....	44
3 - Proteína de Transferência dos Ésteres de Colesterol (CETP).....	47
a - Definição.....	47
b - Mecanismo de ação.....	48
c - Fatores interferentes na função de CETP.....	51
4 - Mutações do gene da CETP.....	57
a - Mutação Int14A.....	57
b - Mutação D442G.....	58
c - Outras mutações.....	59
5 - Mutações Int14A e D442G e sua relação com a aterosclerose.....	59
6 - Polimorfismos do gene da CETP.....	62
a - TaqIB e sua relação com a aterosclerose.....	62

b - I405V e sua relação com a aterosclerose.....	65
c - Outros polimorfismos.....	66
7 - Avanços Terapêuticos.....	69
8 - Outras proteínas e enzimas que atuam na modulação de HDL.....	69
a - Lipase Hepática (HL).....	69
b - Lipoproteína Lipase (LPL).....	75
c - Proteína de transferência dos fosfolípidos (PLTP).....	79
2 - OBJETIVOS.....	85
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
4 - CAPÍTULOS.....	103
Paper I.....	105
Paper II.....	125
5 - DISCUSSÃO GERAL.....	147
6 - CONCLUSÃO GERAL.....	153
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HDL	lipoproteína de alta densidade (<i>high density lipoprotein</i>)
DAC	doença arterial coronariana
TRC	transporte reverso do colesterol
CETP	proteína de transferência do éster de colesterol (<i>cholesterol ester transfer protein</i>)
EC	ésteres de colesterol
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa (<i>very low density lipoprotein</i>)
IDL	lipoproteína de densidade intermediária (<i>intermediate density lipoprotein</i>)
LDL	lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
HALP	hiperalfalipoproteinemia
HDL-C	colesterol de HDL
LPL	lipoproteína lipase (<i>lipoprotein lipase</i>)
TAG	triacilglicerol
PL	fosfolípidos
HL	lipase hepática (<i>hepatic lipase</i>)
PLTP	proteína transferência de fosfolípidos (<i>phospholipid transfer protein</i>)

α-HDL	HDL madura
IMT	índice da espessura íntima-média arterial
ABCA1	ABC proteína transportadora cassete dependente da adenosina trifosfato A1 (<i>ATP-binding cassette transporter protein A1</i>)
SR-BI	receptor de varredura de classe B tipo 1 (<i>scavenger receptor</i>)
Apo AI	apolipoproteína AI
Pré-beta-HDL	HDL imatura
LCAT	lecitina colesterol aciltransferase (<i>lecithin cholesterol acyltransferase</i>)
ApoB	apolipoproteína B
Receptor B/E	receptor de LDL
Apo C-III	apolipoproteína C-III
Apo E	apolipoproteína E
RNA_m	RNA mensageiro
VCAM-1	molécula 1 de adesão celular vascular (<i>vascular cell adhesion molecular 1</i>)
ICAM-1	molécula 1 de adesão intercelular nas células do endotélio
TNFα	fator alfa de necrose tumoral (<i>tumoral necrose factor</i>)
HDL₂	subfração 2 da lipoproteína de alta densidade
HDL₃	subfração 3 da lipoproteína de alta densidade
LTIP	proteína inibidora de transferência de lípidos (<i>lipid transfer inhibitor protein</i>)

QM	quilomícrons
Lp(a)	lipoproteína (a)
AGL	ácidos graxos livres
VLDL 1	VLDL tipo 1
DM	diabete melito
IMC	índice de massa corpórea
HMG-CoA redutase	3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
ECG	eletrocardiograma
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (<i>restriction fragments lenght polymorphism</i>)
HSPG	proteoglicanos de heparan sulfato (<i>heparan sulphate proteoglicans</i>)
LIPC	região promotora do gene da lipase hepática
SNP	polimorfismos de nucleotídeo único (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
LRP	proteína relacionada ao receptor de LDL (<i>LDL related protein</i>)
ECG	eletrocardiograma
DCV	doença cardiovascular
IAM	infarto agudo do miocárdio
CC	circunferência de cintura

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 - Algumas Mutações e Polimorfismos do gene da CETP.....	68

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Etapas do TRC.....	41
Figura 2 - Atuação de CETP no TRC.....	51
Figura 3 - Metabolismo da HDL na ausência de CETP.....	57

RESUMO

Em inúmeros estudos prospectivos observa-se uma associação inversa entre a concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL) e risco de doença arterial coronariana (DAC). Uma das propriedades antiaterogênicas da HDL é sua participação no transporte reverso de colesterol (TRC). A proteína de transferência dos ésteres de colesterol (CETP) promove a troca de ésteres de colesterol (EC) e triacilglicerol (TAG) entre HDL e outras lipoproteínas, aumentando o colesterol das lipoproteínas apoB. Mutações/polimorfismos no gene da CETP foram detectados em várias populações, especialmente asiáticas. Apesar da menor atividade de CETP e hiperalfalipoproteinemia (HALP), interroga-se quanto a prevalência de doença cardiovascular (DCV) nestes indivíduos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em população de brasileiros HALP, a prevalência de mutações/polimorfismos do gene da CETP e manifestações bioquímicas e ateroscleróticas deste fenótipo.

Foram determinados lípides, lipoproteínas e parâmetros metabólicos plasmáticos marcadores de DCV, numa população de 291 a 294 indivíduos HALP ($HDL-C \geq 68mg/dl$) e 139 controles ($HDL-C < 68mg/dl$). A prevalência das mutações Int14A e D442G e dos polimorfismos TaqIB e I405V, no gene da CETP, foi investigada por análise genômica.

Aterosclerose nos pacientes com mutações/polimorfismos foi avaliada clinicamente e por medida da espessura íntima-média arterial (IMT) pela ultra-sonografia das carótidas.

Na população HALP, HDL-C apresentou valor 1.5 maior do que controles. A prevalência da mutação Int14A no grupo HALP foi de 4%, baixa, porém maior do que a descrita em caucasianos, e de 0,7% na D442G, muito baixa e menor do que em japoneses/asiáticos. No grupo HALP, verificou-se aumento das atividades de lipoproteína lipase (LPL) e da proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) e redução de CETP e lipase hepática (HL). O grupo de mutantes (7 indivíduos) comparado ao controle, evidenciou tendência semelhante. A paciente homozigótica Int14A, apresentou atividade indetectável de CETP e reduzida de HL, além de HALP severa. Um dos pacientes, heterozigótico D442G, mostrou aumento do IMT em relação aos controles, e um dos heterozigóticos Int14A, DCV estabelecida.

O genótipo B1B2, do polimorfismo TaqIB, apresentou prevalência de 45% e o IV de I405V, 49%. Comparando os genótipos entre si, em B2B2 de TaqIB, encontrou-se aumento do IMT, diminuição de auto-anticorpos anti lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-oxidada) e menor atividade de CETP. A atividade de CETP mostrou-se aumentada no genótipo II de I405V, com redução da HDL-C. As lipoproteínas, apolipoproteínas e lípidos, foram semelhantes entre os diversos genótipos, bem como LPL, HL e PLTP.

O fenótipo HALP caracterizado neste estudo por diminuição das atividades de CETP e HL e aumento de LPL e PLTP não demonstrou associação com a presença das mutações e/ou polimorfismos estudados. É possível que a baixa frequência das mutações de CETP não tenha permitido caracterizar estatisticamente esta associação. Mutações de outras proteínas, como por exemplo de HL, poderiam explicar este fenótipo. Os indivíduos HALP, portadores de mutações, não mostraram diferença quanto a aterosclerose clínica e IMT em relação aos controles, apesar de alguns pacientes isoladamente apresentarem sinais clínicos de DCV. Estes resultados não permitiram caracterizar a condição de HALP como cardioprotetora ou não. Estudos complementares necessitam ser realizados para uma melhor compreensão do fenótipo de hiperalfalipoproteinemia no contexto do risco cardiovascular aterosclerótico.

ABSTRACT

There is an inverse association between the concentration of high density lipoprotein (HDL) and the risk of a coronary arterial disease (CAD). One of the HDL anti-atherogenic properties is its participation in the reverse cholesterol transport (RCT). The cholesteryl ester transfer protein (CETP) facilitates the cholesteryl esters (CE) and triglycerides (TAG) exchange between HDL and others lipoproteins, increasing the cholesterol content of apoB lipoproteins. Mutations and polymorphisms of the CETP gene were detected in several populations, especially among Asiatic. In spite of a lower activity of the CETP and an increase of the HDL-C level in hyperalphalipoproteinemia (HALP), there are some doubts in regard to the prevalence of the cardiovascular disease (CVD) in these population groups.

The aim of this work was to evaluate the prevalence of HALP and its relationship to the presence of mutations and polymorphisms of the CETP gene, in a Brazilian population, and its relation with the arteriosclerosis.

We determined lipid, lipoproteins, metabolic plasmatic parameters and markers of CVD, in a population of 291 to 294 HALP individuals ($\text{HDL-C} \geq 68\text{mg/dl}$) and 139 controls ($\text{HDL-C} < 68\text{mg/dl}$). The prevalence of the mutations Int14A and D442G, and the polymorphisms TaqIB and I405V, was investigated by molecular methods. The presence of atherosclerosis in those patients with mutations and polymorphisms and in controls, was evaluated by clinical analyzes and measurements of the arterial intima-media thickness (IMT) by ultrasound method was performed.

HDL-C was 1.5 higher in the HALP when compared to controls. A very low prevalence equal to 0.7% was found for D442G mutations, lower than in the Asiatic and Japanese population, and 4% for Int14A mutations, higher than the one described in the Caucasians. On HALP, the activities of lipoprotein lipase (LPL) and phospholipid transfer protein (PLTP) were higher and activities of CETP and hepatic lipase (HL) were lower than in controls. The seven mutants presented similar tendencies. The homozygous Int14A, showed undetectable activity of CETP and a reduction of HL, besides very high values of HDL-C.

One patient, heterozygote for D442G, had increased IMT as compared to controls and one heterozygote for Int14A had established CVD.

The B1B2 TaqIB genotype presented a frequency equal to 45%, and the IV I405V to 49%. Comparing all genotypes, B2B2 TaqIB presented higher IMT, lower autoantibodies against oxidized low density lipoprotein (LDLox) and lower CETP activity. The II I405V showed a highest CETP activity and a lowest HDL-C value. The lipoproteins, lipids and apolipoproteins were equal among all genotypes, as well as activities of LPL, HL and PLTP.

The HALP phenotype was characterized by lower CETP and HL activities and higher LPL and PLTP activities when compared with controls but with no association with mutations or polymorphisms studied. It is possible that the low frequency of CETP mutations made impossible this statistic association. Perhaps other mutations, like in HL gene, could explain this phenotype. The HALP mutants did not show a difference in clinical atherosclerosis and IMT as compared with controls, although some individuals presented clinical signs of CVD. These results did not discard the possibility of the HALP phenotype as a cardioprotector or not.

Complementary studies will have to done to amplify the investigation of other mutations and polymorphisms of CETP and or HL and to try to establish a relationship between HALP and atherosclerosis.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

A associação inversa entre os valores plasmáticos da lipoproteína de alta densidade (HDL) e o risco de doença arterial coronariana (DAC), sugere que a mesma desempenhe um papel importante na prevenção do desenvolvimento da aterosclerose (GORDON *et al.*, 1989; MILLER e MILLER, 1975; STAMPFER *et al.*, 1991).

Entre os mecanismos antiaterogênicos dos quais a HDL participa, além dos efeitos antiinflamatórios e antioxidantes (LUPATTELLI *et al.*, 2003) é de fundamental importância a sua participação no transporte reverso de colesterol (TRC), em estreita atuação com a proteína de transferência dos ésteres de colesterol (CETP) (GLOMSET e NORUM., 1973). O papel da CETP não está totalmente definido em relação à aterogênese, pois apesar de influir positivamente no transporte de colesterol periférico para o fígado, aumenta a concentração dos ésteres de colesterol (EC) nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e seus remanescentes, nas de densidade intermediária (IDL) e nas de baixa densidade (LDL), potencialmente pró-aterogênicas (YAMASHITA *et al.*, 2000).

Indivíduos com hiperalfalipoproteinemia familiar (HALP) têm sido investigados como modelo experimental para avaliar a relação da concentração plasmática do colesterol da fração HDL (HDL-C) com a instalação da aterosclerose (ZHONG *et al.*, 1996). Mutações e polimorfismos nas regiões codificadoras e regulatórias do gene da CETP têm sido descritos, e em grande parte das vezes acompanhados de HALP, com pronunciadas alterações bioquímicas e funcionais de HDL e LDL (YAMASHITA *et al.*, 2000). A maioria dos estudos populacionais demonstrou correlação significativa entre o genótipo de CETP, concentrações de HDL-C e risco cardiovascular; no entanto, outros autores não encontraram estas associações (FREEMAN *et al.*, 2003; HIRANO *et al.*, 1997).

A ocorrência das mutações e polimorfismos no gene da CETP é maior no Japão e em populações asiáticas, porém há relatos da ocorrência em populações germânicas, caucasianas e outras (HILL *et al.*, 1997; INAZU *et al.*, 1994).

Outras proteínas e enzimas também atuam como fatores moduladores sobre as concentrações de HDL-C no plasma. A lipoproteína lipase (LPL) é responsável pela hidrólise de lipoproteínas ricas em triacilglicerol (TAG) e sua ação facilita a transferência

de fosfolípidos (PL) e apolipoproteínas para as HDL (OLIVECRONA e BENGTTSSON-OLIVECRONA., 1993). A lipase hepática (HL) catalisa a hidrólise de TAG e PL das lipoproteínas e aumenta a concentração de PL em HDL₃ (RAO *et al.*, 1982). A proteína de transferência dos fosfolípidos (PLTP) proporciona a transferência de PL das lipoproteínas ricas em TAG para HDL, favorecendo a formação das α -HDL (HUUSKONEN *et al.*, 2001). Os defeitos funcionais nos genes da CETP e LPL (FUNKE *et al.*, 1994; SAKAI *et al.*, 1995) têm se mostrado relativamente freqüentes e responsáveis por alterações significativas dos parâmetros lipídicos de várias amostras populacionais (KUIVENHOVEN *et al.*, 1997).

Este é o primeiro estudo que avalia a prevalência de HALP associada a mutações e polimorfismos do gene da CETP em uma população heterogênea, como a brasileira. Foram analisadas as repercussões das mutações e polimorfismos sobre os diversos parâmetros envolvidos no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, além de alguns fatores de risco determinantes da interação entre o meio ambiente e o genótipo, na concentração plasmática de HDL. A relação com a aterosclerose foi avaliada por ultra-sonografia das artérias carótidas, utilizando o índice de espessamento das camadas íntima-média das artérias carótidas (IMT).

1 - PROPRIEDADES DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL)

Uma das formas da HDL exercer suas propriedades antiaterogênicas é por meio do TRC (fig. 1), via metabólica que facilita o efluxo de colesterol dos tecidos periféricos e subsequente excreção hepática (GORDON *et al.*, 1989).

Transporte Reverso do Colesterol (TRC)

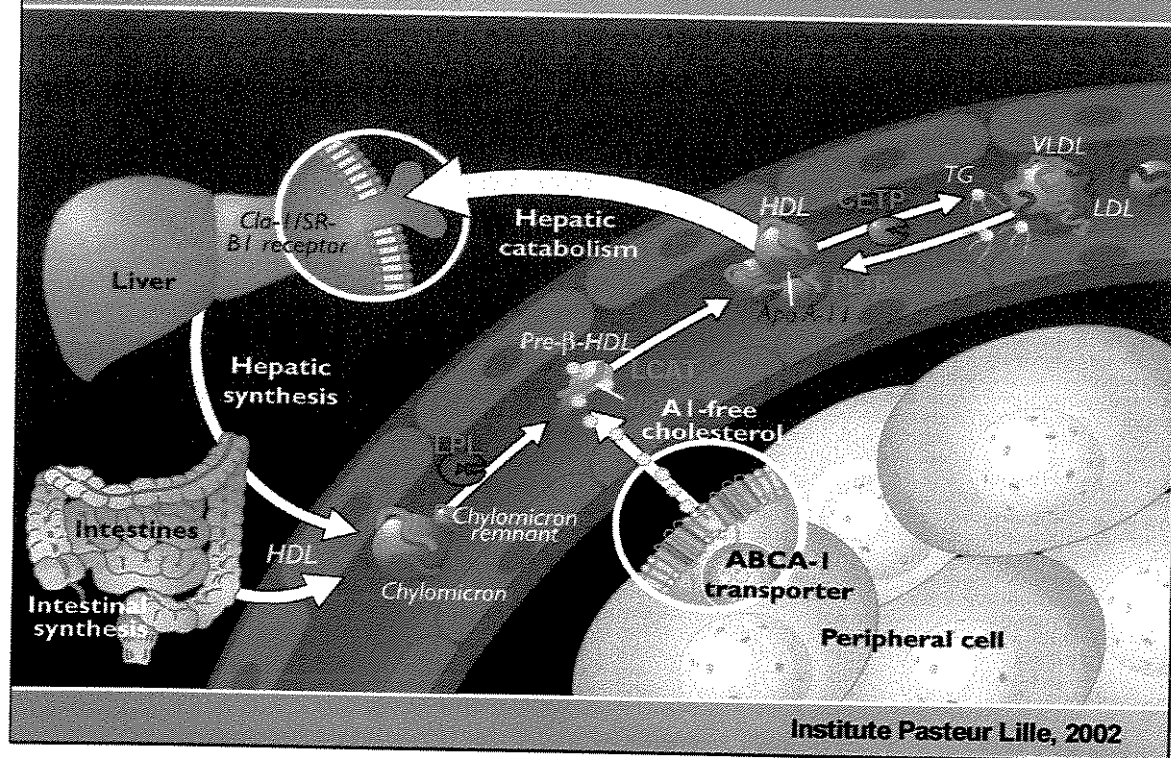


Fig 1 - Esquema do TRC. Formação da HDL a partir das vias hepática e intestinal. QM e remanescentes de QM sofrem deslipidação pela LPL. A pré- β HDL recebe colesterol dos tecidos periféricos e ao transformar-se em HDL madura, pela esterificação do colesterol via LCAT, sofre a ação de CETP. Nesta etapa, ocorre a troca de EC proveniente das lipoproteínas apoB, por TAG, e a HDL rica em TAG torna-se substrato para HL. Ocorre também incorporação de PL em HDL, por PLTP. O conteúdo de EC em HDL é encaminhado para os receptores Cla-I / SRBI e o ciclo recomeça. As apoA I e II atuam como fatores facilitantes do processo.

Na primeira etapa do TRC, a HDL é sintetizada pelo fígado, ou se origina a partir de componentes de superfície liberados na remodelação intravascular das lipoproteínas ricas em TAG (quilomícrons (QM), remanescentes de QM), por meio da atuação de LPL (DECKELBAUM *et al*, 1986). Essas partículas nascentes de HDL

(pré- β HDL), são constituídas principalmente de apolipoproteína I (apoAI) (KUNNITAKE *et al.*, 1985) e são pobres em colesterol. O transportador ABCA1 (*ATP binding cassette transporter A1*) (McNEISH *et al.*, 2000), ao atuar no processo de efluxo de colesterol das células periféricas para pré- β HDL, modula os valores plasmáticos de HDL e a concentração intracelular de colesterol de células hepáticas e periféricas (BREWER E SANTAMARINA-FOJO, 2003).

A lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), é fundamental na etapa seguinte, promovendo o processo de esterificação do colesterol transportado pelas HDL maduras (α -HDL) (GLOMSET *et al.*, 1973). Posteriormente, inicia a atuação da CETP, modulando as trocas não-equimolares de EC e TAG entre as HDL e as lipoproteínas que contêm apo B (VLDL e LDL) (TALL *et al.*, 2000). A HL então remodela as partículas de HDL e LDL, hidrolisando os TAG e os PL, transformando-as em partículas menores e mais densas (KUUSI *et al.*, 1980) e facilitando a transferência de EC para o fígado. Por esta via, o colesterol é captado nos hepatócitos por receptores SR-BI, identificados como receptores de HDL (FIDGE, 1999). No primeiro caso, há endocitose das partículas e sua degradação, e no segundo, os EC são captados seletivamente (ACTON *et al.*, 1996). A partícula de HDL originária deste processo retorna aos tecidos extra-hepáticos na forma de HDL nascente, reiniciando o ciclo (EISENBERG, 1984). Outro receptor, denominado SR-BI cubilina-negativa, foi identificado recentemente e atua como mediador na endocitose de HDL por via renal (via degradação da apoAI) (HAMMAD *et al.*, 1999).

Na via indireta de transporte de colesterol, a CETP participa mediando a transferência de EC da HDL para as LDL e VLDL, que são posteriormente, captadas por receptores específicos B/E ou receptores de LDL (TALL *et al.*, 2000).

Além de transferir o colesterol dos tecidos para o fígado, a HDL possui outros efeitos biológicos, como os mecanismos envolvidos na proteção endotelial. A HDL diminui as transformações provocadas pela oxidação de LDL, aumentando a secreção e estabilização de prostaciclina, favorecendo a eliminação de lípidos oxidados da LDL e reduzindo assim o seu potencial aterogênico (ECKARDSTEIN e ASSMANN, 2000). A LDL oxidada desempenha um papel importante na reatividade endotelial (TOIKKA *et al.*, 1999), pois a vasodilatação arterial é primariamente mediada pela

liberação endotelial de óxido nítrico (JOANNIDES *et al.*, 1995), cujo catabolismo aumenta no estado oxidativo. A HDL antagoniza o potencial oxidativo de LDL por meio de enzimas e proteínas antioxidantes, entre elas o fator ativador de plaquetas, a acetil hidrolase, (STAFFORINI *et al.*, 1993), a paraoxonase (WATSON *et al.*, 1995), e a apoproteína J (KELSO *et al.*, 1994). A HDL é capaz de remover lisofosfatidilcolina das células endoteliais (MATSUDA *et al.*, 1993) e a co-incubação de HDL com estas células evita o deslocamento do óxido nítrico- sintase das cavéolas, induzido pela LDL oxidada (UITTENBOGAAR *et al.*, 2000). O componente lisofosfatidilcolina das LDL oxidadas parece ser responsável, não apenas por efeitos inibitórios na vasodilatação do endotélio, mas também pelo aumento seletivo na expressão da molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1) e molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) nas células do endotélio arterial (KUGIYAMA *et al.*, 1990).

O segundo mecanismo de proteção endotelial mediado pela HDL ocorre por ação antiinflamatória. A HDL possui efeito inibidor da expressão de moléculas de adesão celular (COCKERILL *et al.*, 1995), atuando através da esfingosina-quinase, enzima envolvida na modulação da expressão da molécula de adesão endotelial pelo fator alfa de necrose tumoral (TNF α) (XIA *et al.*, 2002). Pacientes com baixas concentrações de HDL-C apresentaram aumento de VCAM-1 e ICAM-1 e redução paralela na vasodilatação medida por fluxo da artéria braquial. Esta última molécula foi correlacionada com a idade, aumento de LDL oxidada e diminuição de HDL-C. As concentrações de VCAM-1 mostraram correlação com LDL oxidada e menores valores de HDL-C, enquanto as de ICAM-1 mostraram correlação somente com HDL-C. A concentração de moléculas de adesão solúveis correlacionou-se inversamente com a reatividade endotelial. Estas alterações evidenciaram que valores reduzidos de HDL-C podem estar envolvidos na disfunção endotelial, pela falta de inibição da oxidação de LDL e pelo aumento expressivo das moléculas de adesão celular, que facilitam o movimento de entrada dos monócitos na parede vascular (LUPATTELLI *et al.*, 2003).

A concentração de HDL e suas funções cardioprotetoras não estão necessariamente correlacionadas, pois o aumento da HDL não-funcional ou anômala pode estar associado a menor proteção contra a aterosclerose. Nem sempre todas as funções da

HDL estão aumentadas ao mesmo tempo e na mesma intensidade, podendo ocorrer aumento de uma função acompanhado da redução de outra. Os efeitos finais dependem de quais funções de HDL estarão ativadas em um determinado estado metabólico (BARTER e RYE., 2001). Por exemplo, o papel da CETP ao transferir os EC leva a uma remodelação de HDL, com redução da quantidade de colesterol por partícula de HDL, do número de moléculas de apoAI e do tamanho da partícula de HDL. Este processo é acompanhado da formação de uma população de apoAI pobre em lípidos e de pré- β HDL (LIANG *et al.*, 1994), que são as aceptoras iniciais e preferenciais de colesterol, sugerindo papel antiaterogênico de CETP. No entanto, este processo diminui a concentração plasmática de HDL, reduzindo os seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (BARTER e RYE, 2001).

2 - HIPERALFALIPOPROTEINEMIA PRIMÁRIA (HALP)

Inicialmente tida como familiar e associada à hipobetalipoproteinemia, a HALP foi relacionada ao aumento da longevidade, secundário à baixa incidência de DAC. Ainda que valores diminuídos de HDL-C possam estar relacionados ao desenvolvimento de aterosclerose, não há consenso em estudos populacionais sobre como se comportam indivíduos com maior concentração de HDL-C (CASTELLI *et al.*, 1986). MATSUZAWA *et al.* (1986) relataram dois casos de HALP severa, que apresentavam opacidade prematura da córnea e angina do peito, sugerindo que esta condição não seria benéfica e poderia representar um mecanismo favorável ao desenvolvimento de aterosclerose. Estudos com famílias e irmãos gêmeos indicam que 40-60% da variação de HDL entre os indivíduos é determinada por causas genéticas (CORELLA *et al.*, 2000).

A deficiência de CETP é a causa mais freqüente de HALP em populações asiáticas e as mutações do gene da CETP que a originam têm sido estudadas em pacientes japoneses. Nesta população estima-se que a deficiência de CETP seja responsável por 61,7% de HALP severa (> 100 mg/dL) e 31,4% de HALP moderada (>80 mg/dL) (NAGANO *et al.*, 2002). Os casos identificados em outras populações asiáticas e caucasianas ainda estão limitados a um pequeno número.

Os pacientes com HALP por deficiência de CETP apresentam pronunciadas alterações bioquímicas e biológicas nas lipoproteínas HDL e LDL (HIRANO *et al.*, 2000). Em pacientes homozigóticos, a concentração de colesterol total encontra-se moderadamente elevada, enquanto que a de HDL-C está aumentada em 3-6 vezes, principalmente às custas da subfração 2 da lipoproteína de alta densidade (HDL₂). As partículas de HDL₂ dos indivíduos controles normais têm a capacidade de proteger os macrófagos do acúmulo de colesterol, quando incubadas com LDL acetilada, e de aumentar o efluxo de colesterol proveniente das células. No entanto, em pacientes deficientes de CETP, as HDL₂ ricas em EC e pobres em TAG mostraram esta capacidade reduzida. Os receptores de LDL possuem maior afinidade por estas partículas modificadas de HDL, mais do que pelas de LDL normal. As apos AI, C-III e E estão marcadamente elevadas, enquanto a apo B está normal, ou discretamente diminuída. As partículas de HDL enriquecidas com apo E poderiam estar relacionadas ao catabolismo mais lento de apoAI e apoAII (RADER *et al.*, 1996). A presença de partículas HDL grandes, ricas em apo E, são aparentemente específicas da deficiência de CETP, pois não são detectadas em HALP com atividade de CETP normal (YAMASHITA *et al.*, 1990).

Em pacientes mutantes homozigóticos, a habilidade das partículas de HDL para efetuar o efluxo de colesterol de macrófagos mostrou que estas HDL, ricas em apo E, não são boas acceptoras de colesterol. As HDL₂ e a subfração 3 da lipoproteína de alta densidade (HDL₃) livres de apo E, apresentaram comportamento oposto. Estes dados sugerem que partículas de HDL₂, na deficiência de CETP, são desprovidas de função antiaterogênica, não tendo a habilidade adequada para remover o colesterol das células repletas de lípidos, favorecendo possivelmente o acúmulo de EC nos macrófagos (ISHIGAMI *et al.*, 1994). A adição de CETP e HL ao plasma de pacientes deficientes em CETP originou lipoproteínas de alta densidade, pobres em colesterol e fosfolípidos, que foram efetivas em promover o efluxo de colesterol das células espumosas (YAMASHITA *et al.*, 1995).

A CETP é fundamental para converter pequenas partículas de LDL em partículas maiores e mais homogêneas, ricas em EC; portanto, pacientes homozigóticos para deficiência de CETP apresentam LDL pequenas e heterogêneas em gel de poliacrilamida, consistindo em quatro ou cinco diferentes subpopulações, maiores ou

menores do que as subclasses de indivíduos normais (LDL polidispersas) (BISGAIER *et al.*, 1991). Em contraste, as HDL são grandes, com mobilidade lenta no gel de agarose e ricas em apo E (YAMASHITA *et al.*, 2000). Utilizando-se métodos de ultracentrifugação, foi demonstrado que as partículas de LDL dos mutantes para CETP estão distribuídas em um amplo espectro de densidade, sem pico proeminente, ao contrário do padrão fisiológico homogêneo em um espectro curto, com pico agudo. Esta condição ocorre, possivelmente, pela redução do ritmo da produção e aumento do catabolismo de apo B, sugerindo controle positivo dos receptores de LDL destes indivíduos (IKEWAKI *et al.*, 1995). No entanto, em estudo recente com pacientes portadores da mutação D442G, analisando o padrão de tamanho de LDL em gel de gradiente de poliacrilamida, foi encontrada maior concentração de LDL de maior tamanho (padrão A) nestes pacientes, o que corresponde a uma característica antiaterogênica (WANG *et al.*, 2002).

O risco de aterosclerose está associado à heterogeneidade das partículas de LDL, relacionada ao seu conteúdo de hidróperóxido, que lhe confere distinta modificação oxidativa e capacidade de induzir apoptose nas células da parede arterial (KONTUSH *et al.*, 2002). As pequenas sub-frações de HDL possuem grande poder antioxidativo, o qual encontra-se prejudicado na condição de HALP (KONTUSH *et al.*, 2004).

A HALP foi descrita em outras situações. Estudos que obtiveram superexpressão de ABCA1 em camundongos demonstraram aumento de concentração plasmática de HDL e ApoA1, facilitando o TRC. As partículas de HDL mostraram-se boas aceptoras de colesterol, com aumento da concentração de PL (VAISMAN *et al.*, 2001) (SINGARAJA *et al.*, 2002).

3 - PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DOS ÉSTERES DE COLESTEROL (CETP)

a - Definição

NICHOLS e SMITH (1965) descreveram inicialmente a ocorrência de transferência recíproca de EC e TAG no plasma, e estudos posteriores caracterizaram como fator específico desta reação a CETP, responsável pelo movimento de transferência dos EC, TAG, retinil éster e PL; sendo o processo deste último elemento compartilhado com a PLTP (TALL, 1993).

O gene da CETP compreende 16 exons e 15 introns e está localizado no cromossomo 16 (16q12-16q21) (AGELLON *et al.*, 1990). Em humanos, este gene codifica um polipeptídeo de peso molecular de 53.000 Daltons, que é n-glicosilado em quatro sítios, originando a CETP madura de 74.000 Daltons. Os locais de maior concentração do RNAm da CETP são fígado, baço e tecido adiposo e de menor concentração, intestino delgado, adrenais, rins e coração (JIANG *et al.*, 1991). A CETP também foi encontrada nos macrófagos (TOLLEFSON *et al.*, 1985) e nas células do músculo liso da camada média da aorta e nos monócitos, em lesões ateroscleróticas (ISHIKAWA *et al.*, 2001).

A análise da seqüência primária dos 476 aminoácidos que constituem a CETP indica que a proteína madura é composta de 45% de resíduos não-polares, sugerindo natureza hidrofóbica (DRAYNA *et al.*, 1987). Estes resíduos encontram-se inacessíveis à fase aquosa, e localizam-se em uma espécie de bolsa hidrofóbica, que permite sua ligação com os lípides neutros (HESLER *et al.*, 1987). Em um modelo de ação proposto para CETP, os resíduos C-terminais de 461-476 formariam uma hélice anfipática cobrindo a abertura da bolsa N-terminal. A transferência de lípides resultaria de uma desordem nos lípides da superfície lipoprotéica, seguida de movimento de abertura da bolsa hidrofóbica e entrada da molécula de lípides neutros (BRUCE *et al.*, 1998_a).

A biossíntese da CETP é regulada por fatores nutricionais, e o maior responsável pelo aumento da massa, atividade, valores hepáticos e periféricos de CETP é o conteúdo de colesterol na dieta. Estudos em diferentes espécies, demonstraram aumento da atividade plasmática de CETP por via transcricional, com aumento do RNAm da CETP

(JIANG *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1996; LE GOFF *et al.*, 2004) em animais submetidos à dieta aterogênica, ou durante o estado pós-prandial (MOULIN, 1996). Esta indução da expressão gênica da CETP parece estar relacionada ao *pool* de colesterol livre, intracelular ou de membrana (QUINET *et al.*, 1991).

b - Mecanismo de ação

Quando considerada a concentração plasmática relativa, cerca de 74% da CETP apresenta associação com a fração HDL, 24% com LDL e 1% com VLDL (NISHIDA *et al.*, 1993). Ocorre associação preferencial da CETP com as pré- β -HDL e com partículas de HDL que contêm apoAI (FRANCONE *et al.*, 1989). Apenas uma pequena proporção da CETP é encontrada em associação com partículas da HDL que contêm apoAI e apoAII (CHEUNG *et al.*, 1986). No sexo masculino, a CETP distribui-se igualmente entre as partículas de HDL com apoAI ou apoAI:AII (MOULIN *et al.*, 1994).

Ainda que cada lipoproteína plasmática possa atuar como doadora ou aceptora potencial, a concentração relativa e conteúdo lipídico de EC e TAG, constituem os maiores determinantes para a transferência líquida de lípidos neutros (MORTON e ZILVERSMIT, 1983). A transferência líquida de massa do TAG é tipicamente observada de VLDL para LDL e HDL, com transferência recíproca de EC de HDL e LDL para VLDL (YEN *et al.*, 1989). Na ausência da proteína inibidora da transferência de lípidos (LTIP, *lipid transfer inhibitor protein*), tanto HDL como LDL representam substratos equivalentes para CETP (SERDYUK e MORTON, 1999). Sabe-se que no plasma humano ocorre a transferência líquida de massa do EC de HDL para LDL. Aparentemente, as partículas LDL de subclasse com tamanho e densidade intermediários, são aceptoras preferenciais de EC, em detrimento das LDL de maior tamanho (GUÉRIN *et al.*, 1994_a) (fig. 2).

Estudos *in vitro* mostraram que a atuação de CETP interfere no tamanho da partícula de LDL, distribuindo-a em um perfil composto por LDL grandes, ricas em EC. Da mesma forma, foi demonstrado que a atuação da CETP sobre HDL favorece a formação de pequenas partículas de HDL, inclusive HDL_{3b} e HDL_{3c} (LAGROST *et al.*, 1993), além da pré- β -HDL (KUNNITAKE *et al.*, 1992).

Supõe-se que a remodelação intravascular da HDL pela CETP ocorre, basicamente, por três mecanismos, iniciando por uma ação combinada da CETP e HL. A CETP principia facilitando o enriquecimento das partículas de HDL com TAG, que é hidrolisado posteriormente por HL, produzindo a redução do centro lipídico da partícula (LAGROST, 1997). As partículas resultantes são instáveis e originam duas partículas distintas e de pequeno tamanho: uma composta por centro hidrofóbico e componentes de superfície, e outra pobre em lipídeos, com conteúdo de apoAI, pouco colesterol livre e PL. Na segunda etapa, a redução do tamanho do centro lipídico da partícula de HDL resulta da incorporação lenta de TAG, que ocorre simultaneamente com a perda de EC; processos estes mediados pela CETP, mas não pela HL. O segundo mecanismo envolve a formação de um complexo ternário entre uma molécula de CETP e duas partículas de HDL. As HDL se fundem no complexo ternário, que se reorganiza originando três partículas de pequeno tamanho (RYE *et al.*, 1997).

A transferência dos PL teria um papel na regulação da atividade de CETP, pois foi demonstrado que a PLTP está associada ao aumento significativo da transferência de EC de HDL₃ para VLDL (TOLLEFSON *et al.*, 1988) e LDL (LAGROST *et al.*, 1994).

As apoAI e apoAII são as proteínas mais abundantes nas HDL, e em menor extensão, as lipoproteínas ricas em TAG, como os QM e os remanescentes de QM. A apoAI estimula o efluxo de colesterol como potente ativador da LCAT, interferindo na síntese de partículas de HDL. As apoAI e apoAII atuam como ligantes do receptor de HDL (COUILLARD *et al.*, 2003). Na cromatografia por afinidade foi demonstrado que HDL pode ser separada em partículas contendo apoAI e partículas contendo apoAI e apoAII, e que as concentrações de apoAI estão diminuídas em pacientes com DAC, sugerindo seu envolvimento no processo antiaterogênico (CHEUNG e ALBERS, 1984). Foi demonstrado que a maior parte de apoAI encontra-se em HDL₂, enquanto que apoAI/apoAII são os maiores componentes de partículas HDL₃ (BARTER e RYE, 1996). A apoAI aumenta a transferência mediada por CETP entre emulsões lipídicas e LDL, enquanto apoAII inibe a síntese de pequenas HDL por CETP (RYE *et al.*, 1992).

A concentração plasmática de apoE correlaciona-se, positivamente, com a atividade da CETP (MARCEL *et al.*, 1990). No entanto, a transferência de EC entre HDL e lipoproteínas ricas em TAG é maior em HDL pobre em apoE, sugerindo a atuação

inibidora desta apolipoproteína nestas condições (MARCEL *et al.*, 1983). No entanto, em microemulsões lipídicas, a apoE-recombinante mostrou atividade estimulante na transferência de lípidos (OHNISHI e YOKOYAMA, 1993); possivelmente secundária à exposição do centro lipídico para a interface superficial, facilitando a interação com CETP, ou por aumento da afinidade de CETP pelas partículas de lipoproteínas (KINOSHITA *et al.*, 1993).

A apolipoproteína (a) (Lp(a)) é uma subclasse de lipoproteína constituída de partículas LDL-like, com conteúdo de apo (a) e apoB (SCANU e FLESS, 1990). Quando ocorre redução de apo(a), a partícula LDL-like assemelha-se à lipoproteína LDL, no que diz respeito ao processo de transferência de EC. A apo(a) possivelmente reduz esta atividade, por afetar a ligação de CETP aos substratos lipoprotéicos ou aos lípidos neutros (GROENER e KOSTNER, 1987).

Há evidências de que a LTIP interfere na atividade da CETP (MORTON, 1999). A adição de LTIP ao plasma leva a redução dose-dependente da participação de LDL nos eventos de transferência de lípidos, com maior efluxo de EC de HDL para VLDL, tornando a HDL melhor substrato para LCAT (MORTON e GREENE, 1994). O TAG é transferido para LDL em menor quantidade, aumentando a transferência de VLDL para HDL (MORTON, 1999). Na deficiência da LTIP este efeito desaparece, o que leva alguns autores a sugerir que o processo de transferência de lípidos na HDL estaria sob controle de LTIP e não de CETP (SERDYUK e MORTON, 1997).

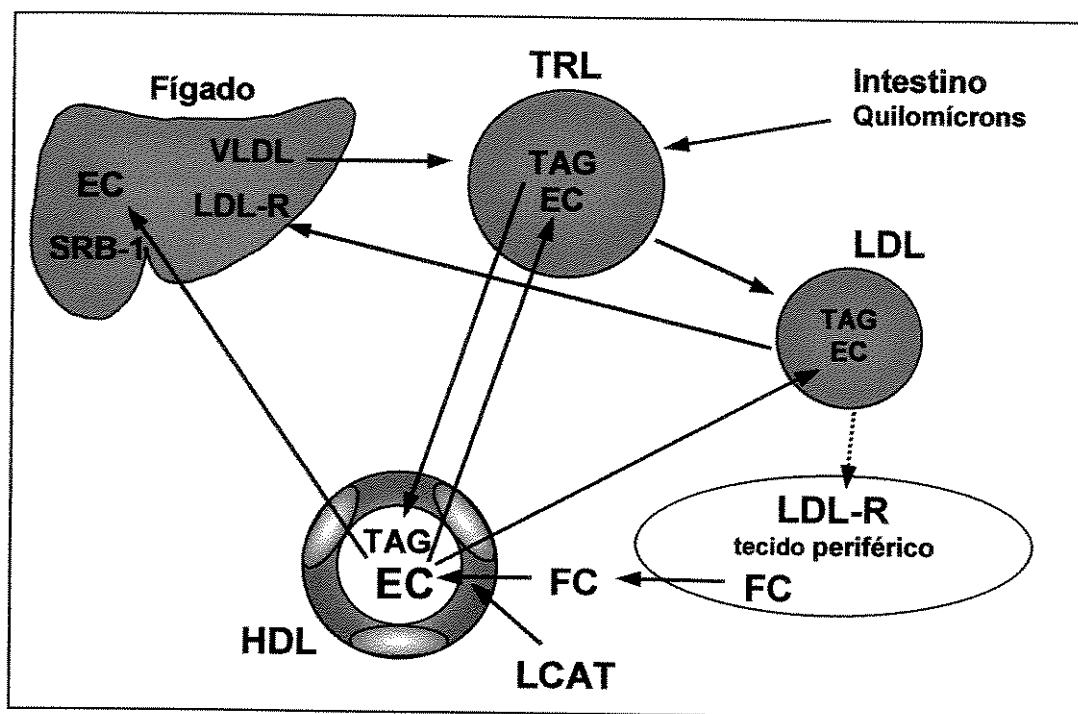


Fig 2 - CETP promove as trocas plasmáticas bidirecionais de EC(éster de colesterol) e TAG (triacilglicerol). Grande parte dos EC se originam de HDL, na reação catalizada por LCAT. TAG provém de QM intestinais ou de TAG secretados pelo fígado. CETP promove transferência de massa líquida de EC de HDL para VLDL e LDL e de VLDL para LDL e HDL. TRC leva EC para o fígado e inclui captação de HDL via receptor SRB-1.

*Baseada na figura de Barter et al (2003)

c - Fatores interferentes na função de CETP

Dislipidemias

Foi demonstrado que a concentração plasmática de CETP aumenta em 2-3 vezes nos indivíduos com hipercolesterolemia ou formas mistas de hiperlipemia, com a participação do TAG (GUÉRIN *et al*, 1996). A lipólise da VLDL pela LPL, estimula a transferência de EC de HDL para VLDL, mediada pela CETP, fenômeno relacionado ao acúmulo de ácidos graxos livres (AGL) na superfície de VLDL, o que aumenta a ligação de CETP com essas partículas (SAMMETT e TALL, 1985). A lipólise também aumenta a

ligação de CETP com HDL, enriquecendo a HDL com PL e AGL, tornando-a substrato mais eficiente para CETP (TALL, 1986_a). Adicionando AGL a uma mistura de VLDL e HDL, a transferência unidirecional de EC de HDL para VLDL é aumentada, favorecendo a formação de pequenas partículas de HDL (CASTRO e FIELDING, 1988). Nas lipoproteínas enriquecidas com colesterol não esterificado, verifica-se aumento da transferência de EC da HDL para VLDL, atividade secundária à menor transferência de TAG de VLDL para HDL e relacionada à menor concentração de EC na superfície de VLDL, por aumento do colesterol livre (MORTON, 1988).

A hipercolesterolemia do tipo IIA caracteriza-se por elevadas concentrações de CETP plasmática (McPHERSON *et al.*, 1991), aumento na velocidade de transferência do EC da HDL para as lipoproteínas apo B (GUÉRIN *et al.*, 1994_a), e de EC tanto para LDL como para as subfrações densas de LDL (GUÉRIN *et al.*, 1994_b).

Na hipertrigliceridemia do tipo IV, o aumento da concentração e da quantidade das partículas de VLDL está associado ao aumento da transferência do EC de HDL para VLDL, mediado pela CETP, enquanto que a concentração de CETP não apresenta modificações significativas (GUÉRIN *et al.*, 1994_a). Nesta condição, a CETP é considerada pró-aterogênica, pois a transferência ocorre, preferencialmente, para as VLDL tipo 1 (VLDL1), que enriquecidas com EC, tornam-se precursoras preferenciais para partículas pequenas e densas de LDL (PACKARD e SHEPHERD, 1997).

A hipercolesterolemia tipo IIb caracteriza-se por maiores concentrações de CETP (McPHERSON *et al.*, 1991) e pela transferência líquida de EC de HDL para VLDL aumentada, em comparação aos indivíduos normais. Os aceptores preferenciais de EC são as partículas VLDL1 (GUÉRIN *et al.*, 2003) e predominam as frações pequenas e densas de LDL, LDL do tipo 4 e LDL do tipo 5 (DESAJER *et al.*, 1993).

Obesidade e Resistência Insulínica

Na obesidade, são caracteristicamente encontrados valores reduzidos de HDL-C e aumento da massa e atividade de CETP, quando comparados os indivíduos obesos aos não-obesos. É possível que estas alterações estejam relacionadas à resistência insulínica

(MACLEAN *et al.*, 2001), porém o efeito supressivo da hiperinsulinemia aguda no *clamp* normoglicêmico-hiperinsulinêmico, em relação à atividade plasmática de CETP, é controverso. Foi verificado que ao serem retiradas as variáveis de adiposidade, distribuição de gordura corporal, diabetes e condição física, a atividade plasmática de CETP foi semelhante em indivíduos insulino-resistentes e insulino-sensíveis. Porém, é possível que a insulina aumente a depuração de TAG, lipoproteínas e CETP durante o *clamp*, efeito relacionado ao estímulo de LPL. Considerando casos em que coexistam redução de CETP e hiperinsulinemia, é possível que a hiperinsulinemia suprima a produção de CETP, atuando no sítio à jusante da transcrição (SUTHERLAND *et al.*, 1994; BERTI *et al.*, 2003).

Diabete melito (DM)

No DM tipo 1 e no DM tipo 2 a transferência de EC está aumentada, em contraste com a concentração e atividade normais de CETP, fato possivelmente explicado pelo aumento de lipoproteínas aceptoras (BAGDADE *et al.*, 1991).

No DM tipo 2, encontra-se freqüentemente a elevação plasmática de TAG, VLDL e seus remanescentes, tanto em jejum como no período pós-prandial, predominando as LDL pequenas e densas e valores de HDL-C abaixo da normal (GUÉRIN *et al.*, 2001). Comparado aos não diabéticos e normolipidêmicos, o processo de transferência dos ésteres de colesterol mediado por CETP, de HDL para as lipoproteínas que contêm apo B, apresenta-se variável, explicado em parte pelo diferentes graus de obesidade e/ou hipertrigliceridemia dos grupos estudados: aumentado (GUÉRIN *et al.*, 2001), inalterado (DULLAART *et al.*, 1999) ou reduzido (FIELDING *et al.*, 1984). O grau de hipertrigliceridemia interfere aumentando a velocidade de transferência de massa de EC da HDL para as lipoproteínas que contêm apo B. A CETP, ao transferir EC da HDL para as VLDL1, contribuiria para a formação de LDL pequenas e densas (GUÉRIN *et al.*, 2001).

No DM tipo 1, foram encontrados valores plasmáticos da HDL-C elevados e de LDL-C e TAG diminuídos (NIKKILA, 1981). A atividade de CETP mostrou comportamento diverso, conforme diferentes autores: reduzida (HAYASHIBE *et al.*, 1999),

inalterada (KAHRI *et al.*, 1993) ou aumentada (DULLAART *et al.*, 1991). BERTI *et al.* (2003) demonstraram no DM tipo 1, experimental, aumento da expressão da CETP (RNAm e proteína), a qual foi reduzida com reposição de insulina.

Hormônios tiroideanos

Os hormônios tiroideanos interferem na expressão gênica da CETP (TAN *et al.*, 1998; BERTI *et al.*, 2001). A atividade da CETP está aumentada no hipertiroidismo e diminuída no hipotiroidismo, apesar de no último caso a concentração de CETP estar normal (RITTER *et al.*, 1996). O hipotiroidismo está associado a valores elevados de VLDL e LDL (DUNTAS *et al.*, 2002), diminuição da atividade de CETP e redução da velocidade de transferência de EC de HDL para as lipoproteínas que contêm apo B (DULLAART, 1990).

Hormônio do crescimento

A deficiência do hormônio de crescimento está associada a um perfil lipoprotéico aterogênico, com aumento dos valores de VLDL-C, LDL-C e menor concentração de colesterol em HDL (CARROLL *et al.*, 1998), além de redução na concentração e atividade da CETP (CARRILHO *et al.*, 2001). Pacientes acromegálicos apresentam características associadas ao aumento da atividade de CETP, como o estímulo à troca de lípidos neutros entre partículas de LDL e lipoproteínas ricas em TAG, com a formação de LDL densas (TAN *et al.*, 1997).

Estrógenos

A concentração plasmática da CETP é mais elevada em mulheres e crianças antes da puberdade, e estudos populacionais demonstraram que mulheres apresentam valores 25% mais elevados da CETP do que os homens. A menopausa está associada com o

aumento dos níveis plasmáticos de LDL-C, das lipoproteínas ricas em TAG (JENSEN *et al.*, 1990) e com o aumento da atividade da CETP plasmática (LEWIS-BARNED *et al.*, 1999). A concentração plasmática de CETP aumenta durante a gestação (SILLIMAN *et al.*, 1993). No entanto, experimentalmente, não foi verificada redução da expressão da CETP na insuficiência de estrógenos (CAZITA *et al.*, 2003).

Síndrome nefrótica

Hiperlipemia associada à síndrome nefrótica caracteriza-se por aumento do colesterol plasmático, VLDL, LDL e apoAI (FAUCHER *et al.*, 1993). A CETP apresenta concentração maior do que em normolipidêmicos, associada à maior velocidade de transferência de EC de HDL para lipoproteínas que contêm apo B (MOULIN *et al.*, 1992), favorecendo assim a formação de LDL pequenas e densas (DEIGHAN *et al.*, 2001).

Tabagismo

No tabagismo é descrito aumento de EC nas lipoproteínas que contêm apo B, diminuição dos valores de HDL-C e aumento de atividade de CETP (DULLAART *et al.*, 1994_a). Porém, trabalhos mais recentes mostraram diminuição da CETP e PLTP nos indivíduos normolipidêmicos fumantes, levando a aumento do conteúdo de PL em HDL (MERO *et al.*, 1998; ZARATIN *et al.*, 2001).

Etilismo

A ingestão crônica de álcool (> 75g/dia) aumenta a concentração de HDL-C, associada à redução proporcional da atividade de CETP (SAVOLAINEN *et al.*, 1990).

Exercícios físicos

A atividade física continuada, em pessoas previamente sedentárias e saudáveis, provoca a redução da CETP plasmática, aumento da concentração de HDL-C e de apoAI (SEIP *et al.*, 1993; FOGER *et al.*, 1994), alterações essas reversíveis após uma semana de

retorno ao sedentarismo (RITSCH *et al.*, 1993). Foi demonstrado que após a introdução de um período de exercícios, ocorre aumento da sensibilidade insulínica sem perda de peso, além de redução de atividade da CETP (MACLEAN *et al.*, 2001). A menor atividade de CETP aumenta os níveis de α -HDL, elevando seu conteúdo de EC e diminuindo o de TAG. Em alguns estudos a atividade da CETP foi maior em atletas do que em sedentários (SASAKI *et al.*, 1988; GUPTA *et al.*, 1993).

Medicamentos

O tratamento da hipertrigliceridemia com fibratos, além de provocar a redução plasmática de TAG, reduz a transferência de EC da HDL para VLDL e LDL (BHATNAGAR *et al.*, 1992).

Pacientes diabéticos do tipo 2, quando tratados com genfibrozil, apresentaram duplo efeito sobre a CETP plasmática: redução da transferência líquida de EC pela diminuição dos aceptores plasmáticos de EC e aumento da atividade catalítica da CETP no plasma (LAGROST, 1994_b). Os inibidores da HMG-CoA redutase, ao reduzirem a síntese de colesterol, diminuem os valores de VLDL e LDL-C. Além disso, a pravastatina diminui a atividade e massa de CETP (INAZU *et al.*, 1999) e a atorvastatina reduz a atividade de CETP e a transferência preferencial de EC de HDL para VLDL (GUÉRIN *et al.*, 2000).

Pacientes tratados com probucol apresentaram redução dos valores de HDL-C, acompanhada de alterações de algumas de suas características: redução do seu tamanho e conteúdo de EC, além de maior capacidade de efluxo de EC das células periféricas. A maior atividade de CETP sugere aumento do TRC, com ativação da transferência de EC *in vivo* (ISHIGAMI *et al.*, 1997).

Os inibidores das proteases diminuem HDL e aumentam TAG, porém a administração de nevirapine mostrou-se capaz de melhorar o perfil lipídico de pacientes aidéticos, em tratamento com anti-retrovirais. Foi demonstrada redução de lipoproteínas apo B e TAG, aumento dos valores de HDL-C e ApoA1, com redução do enriquecimento de HDL com TAG. Não foi detectada, no entanto, modificação na concentração de massa de CETP (PETIT *et al.*, 2004).

4 - MUTAÇÕES DO GENE DA CETP

Na região codificadora e nos limites exon/intron no gene da CETP foram encontradas várias mutações e polimorfismos, em populações asiáticas e caucasianas, sendo que apenas algumas se apresentam bem caracterizadas em estudos populacionais. A sua expressão fenotípica provoca várias alterações no metabolismo lipídico (fig 3).

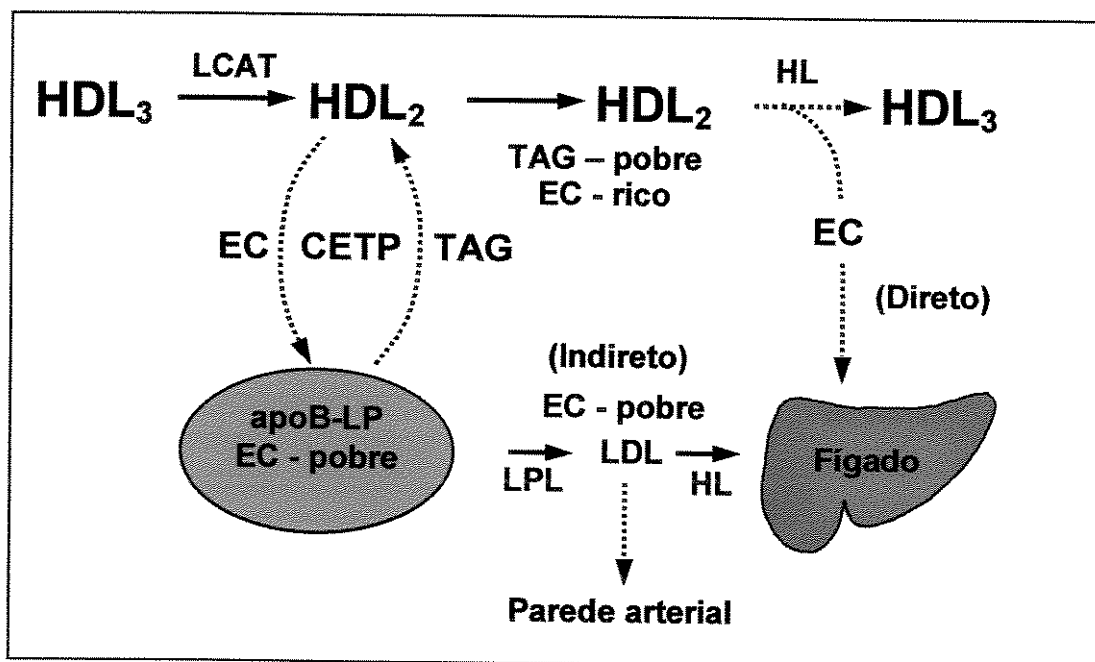


Fig 3 - Ausência de CETP: diminui o fluxo de EC das lipoproteínas apo B e de TAG para HDL₂. As HDL₂ pobres em TAG parecem ser metabolizadas lentamente por HL e ocorre redução do EC que vai por via direta para o fígado. A captação indireta de TAG também é reduzida, assim como a remoção de colesterol tecidual.

* baseada na figura de E. Quintao et al (1995)

a - Mutação Int14A

KOIZUMI *et al.* (1985) foram os primeiros a descrever dois indivíduos com HALP (HDL-C de 301 mg/dL e 174 mg/dL), redução de atividade plasmática da CETP e ausência de sinais clínicos ou história familiar de aterosclerose. BROWN *et al.* (1989)

posteriormente estudaram quatro famílias, com a análise de 47 indivíduos (INAZU *et al.*, 1990), entre os quais 10 homo e 20 heterozigóticos. Desta forma foi caracterizada a mutação pontual G → A, do tipo *nonsense*, na primeira posição do intron 14 do gene da CETP, com parada no processamento normal do RNAm.

A prevalência dessa mutação, descrita em japoneses, alcança 1-2% da população geral e 20% dos indivíduos HALP. A frequência alélica de indivíduos heterozigóticos para Int14A é de 1%, explicando, em associação com a mutação D442G, 5% na variação da concentração de HDL-C na população geral japonesa (INAZU *et al.*, 1996). Num estudo com população de 70 HALP norte-americanos, a mutação Int14A foi detectada numa frequência de 0,7% (HILL *et al.*, 1997).

As frequências descritas para esta mutação variam ligeiramente em cada trabalho: HIRANO *et al.* (1993) encontraram em 171 HALP japoneses, 3,5% indivíduos homozigóticos e 28,1% heterozigóticos. A frequência alélica relativa foi de 0.049. INAZU *et al.* (1993) descreveram em 121 HALP japoneses, 21 mutantes. A frequência alélica foi de 47,8% naqueles com HDL-C >120 mg/dL. Nos resultados encontrados no *Omagari Study*, em 104.505 japoneses e 168 HALP, foram encontrados 0,6% indivíduos homozigóticos e 27% heterozigóticos (HIRANO *et al.*, 1997).

b - Mutação D442G

Esta mutação do tipo *missense* foi descrita apenas em populações asiáticas (INAZU *et al.*, 2000), e identificada próxima ao sítio ativo da terminação carboxílica da molécula, no exon 15 (TAKAHASHI *et al.*, 1993). Resulta em diminuição da biossíntese e atividade específica de CETP em cerca de 30% quando comparada ao alelo selvagem, apresentando uma variação de 25-30% de atividade preservada em indivíduos homozigóticos e de 60-85% em heterozigóticos (BOEKHOLDT e THOMPSON, 2003). Os mutantes D442G heterozigóticos apresentam concentração plasmática de CETP similar aos mutantes Int14A heterozigóticos, porém valores mais elevados de HDL-C (MOULIN, 1996).

A prevalência de D442G em japoneses é de 4,5-7% e 18% dos indivíduos com HALP são afetados (INAZU *et al.*, 1996). Em uma população coreana esta mutação foi responsável por 5,9% da variação interindividual de HDL (SONG *et al.*, 1997) e em um grupo de 16 heterozigóticos chineses estudados por HUI *et al.* (1997) não foi encontrada HALP. No *Honolulu Heart Program*, estudo realizado com 3.469 americanos descendentes de japoneses, a prevalência foi de 5,1% para D442G e de 0,5% para Int14A (ZHONG, 1996).

c - Outras mutações

Outras mutações foram descritas em pequeno número de indivíduos ou famílias, não permitindo, até o momento, a realização de estudos populacionais para avaliar as suas relações com a aterosclerose. Nos casos descritos, há como fator comum entre eles o aumento da concentração de HDL-C e diminuição da atividade de CETP, que em indivíduos homozigóticos pode estar ausente. Em algumas mutações foram identificadas características tais como: a redução dos valores de LDL-C em Y57X (RITSCH *et al.*, 1997), aumento de HDL₂ em G181X (ARAI *et al.*, 1996) e aumento de TAG, apo AI e apo E em R268X (TEH *et al.*, 1998). Alguns autores realizaram amplas pesquisas buscando a identificação de outras mutações e polimorfismos, localizados no gene da CETP (AGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000; CORBEX *et al.*, 2000; KLERKX *et al.*, 2003). A descrição destes resultados, com suas respectivas localizações, autores e prevalências está na tabela 1.

5 - MUTAÇÕES Int14A E D442G E SUA RELAÇÃO COM A ATEROSCLEROSE

Como a CETP é a única proteína capaz de alterar a distribuição do colesterol e TAG entre as lipoproteínas plasmáticas, alguns autores acreditam que a sua inibição possa ser utilizada no tratamento da aterosclerose, como instrumento de elevação da HDL-C. Porém, apesar da relação entre CETP e aterosclerose ser estudada há mais de 10 anos, persistem dúvidas quanto às evidências que suportam tanto o seu papel aterogênico, quanto antiaterogênico. Em estudos com animais, a inibição de CETP em coelhos, que possuem

naturalmente alta atividade de CETP, é consistentemente antiaterogênica (RITTERSHAUS *et al.*, 2000), porém a superexpressão de CETP em camundongos transgênicos, que são naturalmente deficientes em CETP, pode ser antiaterogênica (FOGER *et al.*, 1999; HAYEK *et al.*, 1995), ou pró-aterogênica (MAROTTI *et al.*, 1993; PLUMP *et al.*, 1999) dependendo do ambiente metabólico.

Em humanos, o conhecimento sobre as mutações de CETP evoluiu desde a caracterização dos primeiros indivíduos portadores, com estudo do fenótipo de homo e heterozigóticos e suas famílias, até a realização de amplos estudos populacionais na tentativa de verificar a sua relação com a aterosclerose.

INAZU *et al.* (1990) identificaram em algumas famílias de mutantes portadores de deficiência da CETP, maior incidência de DAC e descreveram opacidade da córnea e DAC em um paciente homozigótico (INAZU *et al.*, 1994). Em outro estudo, abrangendo maior número de indivíduos, os homozigóticos para a mutação Int14A não mostraram evidência de aterosclerose prematura e foram encontrados pacientes heterozigóticos com grande longevidade (INAZU *et al.*, 1990).

O *Kochi Study* (MORIYAMA *et al.*, 1998) analisou japoneses que apresentavam altos valores de HDL (>80 mg/dL), dos quais 25-40% eram deficientes de CETP. A prevalência de DAC nos indivíduos com aumento da concentração de HDL-C, mutantes e não mutantes, foi semelhante. Este fato sugere que a deficiência de CETP é antiaterogênica quando coexiste com esta condição (FIELDING e HAVEL, 1996; TALL *et al.*, 1997).

No *Honolulu Heart Study* (ZHONG *et al.*, 1996), ao serem avaliados homens idosos normolipidêmicos, de origem nipo-americana, foi encontrado maior índice de DAC nos portadores heterozigóticos de D442G com valores de HDL-C entre 41-60 mg/dL, quando comparados aos que apresentaram valores acima de 60 mg/dL. Estes indivíduos com maior concentração de HDL-C apresentavam menor evidência de DAC, inclusive se comparados aos indivíduos HALP sem deficiência da CETP (BARTER *et al.*, 2003). Torna-se então difícil implicar a deficiência de CETP, por si só, como causa de maior incidência de DAC, pois aparentemente é protetora se acompanhada de aumento da concentração de HDL-C (BARTER e RYE, 2001).

Estudo com pacientes urêmicos, submetidos à diálise, reforçou esta possibilidade, pois verificou-se que os portadores da mutação D442G com baixos valores de HDL-C (< 45 mg/dL) possuíam aumento de 1.8 vezes no risco para DAC quando comparados àqueles sem a mutação. Tal associação não ocorreu no grupo de mutantes com maiores valores de HDL-C (KIMURA *et al.*, 1999), fazendo supor que a deficiência de CETP na mutação D442G, comporta-se como fator de risco cardiovascular quando os valores da HDL-C estão reduzidos (INAZU *et al.*, 2000).

Resultados do *Copenhagen Male Study* (JEPPESEN *et al.*, 1998) mostraram que os efeitos pró-aterogênicos dos valores elevados de TAG, podem prevalecer ante os efeitos antiaterogênicos de HDL-C, especialmente quando os valores desta apresentam diminuição relativa (KAKKO *et al.*, 2000).

A pró-aterogenidade na deficiência de CETP em indivíduos heterozigóticos, parece ser mais importante do que em homozigóticos, já que a DAC prematura (idade < 60 anos) não foi encontrada em 44 homozigóticos avaliados. Uma possível razão para tal fato seria o aumento dos valores da HDL-C, acompanhado de prejuízo de suas qualidades antiaterogênicas, evidenciando um estado de efeitos antagônicos na aterosclerose, de quantidade e qualidade, no qual a baixa qualidade poderia predominar quando os valores de HDL-C fossem relativamente mais baixos (INAZU *et al.*, 2000).

HIRANO *et al.* (1995) demonstraram, em duas ocasiões, maior suscetibilidade à doença cardiovascular em indivíduos homo e heterozigóticos com deficiência de CETP. Ao avaliarem 201 pacientes japoneses com HALP, encontraram 67% mutantes, dos quais 11,2% apresentaram DAC. No *Omagari Study* (HIRANO *et al.*, 1997) foram analisados indivíduos em uma área no Japão na qual a mutação Int14 A estava presente em frequência muito elevada, entre 10 e 20 vezes maior do que em outras regiões do país. A prevalência da mutação Int14A e a presença de HALP mostraram declínio com a idade. Ficou demonstrada uma correlação inversa entre HDL e alterações isquêmicas no ECG apenas em uma faixa de valores da HDL-C menor do que 70 mg/dL; acima desta foi demonstrado aumento da incidência de isquemia. Estes resultados sugerem que a deficiência de CETP não está associada com a longevidade e poderia ser aterogênica (HIRANO *et al.*, 2000).

Além dos resultados acima descritos, convém considerar que: observando a raridade em encontrar DAC nas famílias de japoneses com mutações, o fenótipo de HALP, com a relativa diminuição de lipoproteínas que contêm apo B, poderia ser antiaterogênico (INAZU *et al.*, 1990); algumas famílias japonesas são portadoras de deficiência genética de CETP associada à deficiência de HL (BARTER e RYE, 2001), podendo apresentar nesta situação alto risco para desenvolver aterosclerose (HIRANO *et al.*, 1995) e que uma análise prospectiva, realizada abrangendo um período de sete anos, não encontrou relação entre mutações heterozigóticas de CETP com DAC ou acidente vascular cerebral (BARTER *et al.*, 2003). É preciso considerar o pequeno número de pacientes homozigóticos avaliados (LE GOFF *et al.*, 2004) e a baixa prevalência de DAC característica da população japonesa, o que dificulta a comparação da prevalência de doença vascular secundária à deficiência de CETP com a da população geral (INAZU *et al.*, 2000).

6 - POLIMORFISMOS DO GENE DA CETP

Alguns polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), encontrados no *locus* do gene da CETP, são capazes de interferir funcionalmente nos indivíduos normais, com resultados variáveis em valores plasmáticos de HDL-C (BARTER e RYE, 2001) ou nas concentrações de CETP, o que faz supor que estejam localizados dentro de regiões regulatórias de transcrição (LU *et al.*, 2003).

a - TaqIB e sua relação com a aterosclerose

Relatado por KONDO *et al.* (1989), o polimorfismo TaqIB, com comprometimento do nucleotídeo 277 do primeiro intron do gene da CETP, é o mais estudado e descrito tanto em populações orientais quanto em caucasianas.

Devido à sua localização, não seria esperado que influenciasse a regulação transcricional de CETP ou o processamento de RNA, mas que funcionasse apenas como marcador de outros polimorfismos que realmente afetam a expressão do gene da CETP.

Porém, estudos com diferentes populações encontraram associação do alelo B2 com diminuição moderada de atividade de CETP, aumento da concentração de HDL-C (BANSAL *et al.*, 2002) e posteriormente, menor risco para DAC (FREEMAN *et al.*, 1994; HANNUKSELA *et al.*, 1994). No entanto, vários estudos com a população japonesa, cujos valores de HDL-C são geralmente mais altos do que os da população ocidental, mostraram a frequência do alelo B2 mais baixa do que a da população caucasiana, além de não ser encontrada associação com aumento da concentração de HDL-C (GOTO *et al.*, 2001). Outros trabalhos demonstraram associação do polimorfismo TaqIB com a concentração de HDL-C, mas não com CETP (FUMERON *et al.*, 1995; BERNARD *et al.*, 1998), evidenciando assim resultados bastante distintos.

No *Framingham Offspring Study* (ORDOVAS *et al.*, 2000), os pacientes homozigóticos para o alelo B1 do polimorfismo TaqIB mostraram os valores mais altos de CETP e mais baixos de HDL-C, ao serem comparados com indivíduos B1B2 ou B2B2. Aqueles com alelo B2 apresentaram indícios de risco reduzido para DAC, porém tal relação foi verificada apenas no sexo masculino. Indivíduos B2B2, não fumantes, apresentaram redução em 30% do risco de sofrerem um evento cardiovascular, independentemente do consumo de álcool e do índice de massa corpórea (IMC), possivelmente por associação com a concentração de HDL-C (FREEMAN *et al.*, 2003).

Conforme resultados do *Regression Growth Evaluation Statin Study* (REGRESS) (KUIVENHOVEN *et al.*, 1998), o polimorfismo TaqIB influencia não apenas as concentrações de CETP e HDL-C, mas também interfere com o grau de regressão da aterosclerose coronariana em resposta ao tratamento com pravastatina, mostrando boa resposta nos genótipos B1B1, mas não nos B2B2. No entanto, os portadores B1B1 em tratamento com placebo evoluem de forma mais grave para a aterosclerose coronariana do que os B2B2. Isto sugere que em pacientes hipercolesterolêmicos, maior concentração de CETP associada a valores mais baixos de HDL-C conferem maior aterogenicidade.

Neste mesmo estudo, a maior progressão da DAC, nos portadores do alelo B1 de TaqIB, foi associada ao menor diâmetro do lúmen vascular destes indivíduos (KUIVENHOVEN *et al.*, 1998). Dados semelhantes foram encontrados no *Veterans Affair HDL Cholesterol Intervention Trial (VA-HIT)* (BROUSSEAU *et al.*, 2002) e em um estudo

com pacientes submetidos a transplantes renais (RADEAU *et al.*, 2001). Em populações menores, portadores do alelo B1 também eram portadores de fatores de alto risco para DAC (DURLACH *et al.*, 1999; MEGURO *et al.*, 2001). O *Physicians' Health Study* (LIU *et al.*, 2002) não comprovou diferença no risco de doença coronariana entre os diferentes genótipos do polimorfismo TaqIB. O *Reykjavik Study* (EIRIKSDOTTIR *et al.*, 2001) demonstrou menores valores de HDL-C e maior risco de DAC, em homozigóticos B1B1.

Para avaliar a frequência do polimorfismo TaqIB e seu efeito sobre a atividade de CETP e valores de HDL-C, minimizando a influência de fatores ambientais, foi realizado recentemente um estudo populacional no qual foram coletadas amostras de várias áreas do Japão (IKEWAKI *et al.*, 2003). Os grupos foram separados por sexo, o que não é usual em outros estudos. Foi demonstrado que a CETP atuou como fator independente para a diminuição de HDL-C e de LDL-C e que o alelo B2 estava associado com menor atividade/massa de CETP e maiores valores de HDL-C, quando comparado ao alelo B1. O polimorfismo TaqIB não alterou a concentração de LDL-C, apesar da atividade de CETP estar associada positivamente aos valores de LDL-C em estudos anteriores. A frequência de 40% do alelo B2, neste estudo, foi idêntica à da população caucasiana (BERNARD *et al.*, 1998; KUIVENHOVEN *et al.*, 1998).

É provável que a associação do polimorfismo TaqIB, com o risco cardiovascular e a concentração de HDL-C, esteja relacionada a mecanismos ainda desconhecidos de proteção da HDL contra a DAC. O TRC poderia explicar essa associação, pois alguns autores não encontraram risco diferencial para DAC entre heterozigotos B1B2 e homozigotos B1B1, apesar dos primeiros terem valores intermediários de HDL-C. Talvez outro mecanismo desconhecido esteja envolvido neste processo, e as variações no gene da CETP nesta população teriam impacto significativo em DAC, independentemente dos valores de HDL-C e do tamanho de LDL (FREEMAN *et al.*, 2003).

Há possibilidade de que o polimorfismo TaqIB afete a CETP e HDL-C de forma independente, por meio de associações com até dois outros polimorfismos funcionais (INAZU *et al.*, 2000). A variação alélica do promotor 629-C >A foi encontrada em forte

desequilíbrio com TaqIB e associada com massa reduzida de CETP e valores altos de HDL-C (DACHET *et al.*, 2000). Outros sugerem que os efeitos de TaqIB poderiam ser determinados por uma interligação de TaqIB com [gaaa]_n, um tetranucleotídeo altamente polimórfico no promotor da CETP (CORBEX *et al.*, 2000). A repetição [gaaa]_n também poderia ter efeito direto em HDL, sem afetar a CETP (LU *et al.*, 2003).

b - I405V e sua relação com a aterosclerose

Dentre outras variantes alélicas estudadas está o polimorfismo I405V, situado no exon 15, que leva à substituição do aminoácido isoleucina pela valina na posição 405, e é encontrado em asiáticos e caucasianos. Este polimorfismo está presente em 30-40% das populações estudadas, com alta prevalência européia (FUNKE *et al.*, 1994). A frequência do alelo 405V é de 0,28 nos europeus (GUNADSON *et al.*, 1999) e teve prevalência semelhante nos participantes do *Honolulu Heart Program* (ZHONG *et al.*, 1996).

O polimorfismo I405V afeta a estrutura primária de CETP, e não a sua massa plasmática, porém alguns trabalhos demonstraram a sua associação com DAC (AGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 1993). O alelo menos comum (405V) foi associado à menor concentração de CETP e ao aumento dos valores de HDL-C em cerca de 10% dos casos (FUNKE *et al.*, 1994). Em uma meta-análise, comparativa de 405V e 405I, foi encontrada uma associação mais fraca entre a concentração de HDL-C e a massa/atividade de CETP nos indivíduos 405V. Efeitos sobre DAC foram inconclusivos (AGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000), porém há um estudo em que a prevalência de DAC aparentemente estava aumentada em homens com genótipo VV e maior concentração de TAG (BRUCE *et al.*, 1998_b). Estes resultados são diferentes dos encontrados no *Stanislas Study* (PALLAUD *et al.*, 2001), no qual este polimorfismo não mostrou associação com qualquer parâmetro lipídico.

No *Copenhagen City Heart Study* (AGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000), mulheres homozigóticas e heterozigóticas para o alelo 405V mostraram aumento de HDL-C, porém maior incidência de DAC, fato este que não foi verificado em homens. Os

resultados do *Honolulu Heart Study* (ZHONG *et al.*, 1996) mostraram pouco efeito sobre atividade de CETP e aumento dos valores de HDL-C entre 9-8%. Em indivíduos com hipertrigliceridemia (> 165 mg/dL) e portadores do genótipo VV, a prevalência de DAC mostrou-se aumentada, compatível com a evidência de que o genótipo que confere valores mais baixos de CETP é pró-aterogênico em camundongos hipertrigliceridêmicos (HAYEK *et al.*, 1995). Com a redução dos valores de CETP associados a 405V, aparentemente existe maior risco cardiovascular na presença de hipertrigliceridemia, pois o índice da espessura arterial da camada íntima-média (IMT) da carótida, esteve aumentado nos portadores de VV com valores de TAG maiores que 122 mg/dL e em etilistas (BRUCE *et al.*, 1998b).

c - Outros polimorfismos

Até o momento, cerca de trinta polimorfismos do gene da CETP já foram descritos, indicando que este locus é altamente polimórfico. Muitos deles correspondem a polimorfismos de um único nucleotídeo e localizam-se na região promotora do gene, nos introns ou exons, ou na região flanqueadora 3'. Alguns são encontrados com maior frequência, mas parecem ter pequena interferência na função da proteína, enquanto outros apresentam efeitos importantes, e há os que não foram bem caracterizados. Naqueles em que há descrição das manifestações fenotípicas, são referidos o aumento da concentração de HDL-C e diminuição da atividade de CETP, que em homozigóticos pode estar totalmente ausente. Alguns apresentaram características tais como, o aumento do tamanho de LDL (DACHET *et al.*, 2000) e diminuição de HDL-C (FREEMAN *et al.*, 2003) em C-629 > A. O polimorfismo G+1696/ex16A foi estudado em uma população finlandesa, mostrando atividade diminuída de CETP, mas sem alterações no perfil lipídico (TAMMINEN *et al.*, 1996).

Entre os polimorfismos mais bem estudados do gene da CETP, está o R451Q, localizado no exon 15, que resulta na substituição de uma arginina pela glicina na posição 451. Foi descrito em população caucasiana no *Copenhagen City Heart Study* (ANGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000), com frequência alélica de 0,07% em

heterozigóticos, e por KAKKO *et al.*, (1998) que caracterizou maior índice de DAC nos portadores, quando comparados ao restante da população analisada. Por ocasião do *Copenhagen City Heart Study* (ANGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000), também foi identificado o polimorfismo A373P no exon 12, caracterizado por substituição de alanina pela prolina e presente nesta população com frequência de 0,10 % de heterozigóticos. Porém seus efeitos são duvidosos, com aumento (FUNKE *et al.*, 1994) ou diminuição da concentração de HDL-C (ANGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000). O polimorfismo C-629 >A na região promotora do gene da CETP foi estudado no *ECTIM Study* (DACHET *et al.*, 2000), mostrando frequência alélica de 0,53% em heterozigóticos, e também no *West Scotland Coronary Prevention Study* (FREEMAN *et al.*, 2003), que evidenciou associação do genótipo AA com redução do risco para DAC.

A descrição de outros polimorfismos, com suas respectivas localizações, autores e casos estudados está na tabela 1.

Tabela 1 – Algumas Mutações e Polimorfismos do gene da CETP

HALP, hiperalfalipoproteinemia; HE, heterozigóticos; HO, homozigóticos

Variação	Localização	Autores e Prevalência
G309X GLN 309→STOP	Exon 10 (<i>nonsense</i>)	Gotoda et al. (1993): 0,8% da população japonesa
A38X (38ALA→ STOP)(-1C)	Exon 2 (<i>nonsense</i>)	Funke et al. (1994): 1 caso em caucasianos
C + 8/in7 T (C /T)	Íntron 7	Fumeron et al. (1995) Frequência alelos: 0,592 / 0,408
INTRON 10 G (GT / GG <i>splice defect</i>)	Intron 10	Sakai et al. (1996): 1 caso HO japonês
G181X (GLY → STOP)	Exon 6 (<i>nonsense</i>)	Arai et al. (1996): metade dos indivíduos com mutação também no intron 14 294 HALP japoneses(0,34% HO e 1,36% HE) Frequência alélica em HALP: 0,012
R268X (268 ARG →STOP)	Exon 9 (<i>nonsense</i>)	Gotoda et al. (1993) Teh et al. (1998): 1 caso HO norte americano / em caucasianos
G+524T (G / T)	Região 3	Corbex et al. (2000) 0,697 / 0,303
C-631 A (C / A)	Região promotora 5' (<i>poli</i>)	Dachet et al. (2000) Corbex et al. (2000)
L151P (T / C)	Exon 5	Nagano et al. (2002) em japoneses

7 - AVANÇOS TERAPÊUTICOS

Estudos utilizando vários métodos de inibição da atividade de CETP (anticorpos monoclonais, oligonucleotídeos *antisense*, vacina contra CETP, inibidor específico de CETP) demonstraram que coelhos, que possuem alta atividade de CETP e são extremamente susceptíveis a aterosclerose (HA e BARTER, 1985; SPEIJER *et al.*, 1991), apresentaram redução do colesterol plasmático total, aumento da HDL-C e de RNAm do receptor hepático de LDL, além de valores inalterados de TAG (SUGANO *et al.* 1998), quando submetidos a algum destes procedimentos. A imunização de coelhos, com um peptídeo contendo uma região da CETP essencial para a atividade de transferência dos lípides neutros, reduziu em 40% a superfície da área aterosclerótica, comparada com os coelhos que não foram vacinados (RITTERSHAUS *et al.*, 2000).

Estas informações evoluíram para a obtenção de um inibidor químico de CETP, o JTT-705, que atua ligando-se a Cys 13 (OKAMOTO *et al.*, 2000). Atualmente estão sendo testados medicamentos em humanos, como o torcetrapib, com o mesmo princípio de inibição de CETP. O primeiro de dois estudos mostrou resultados nos quais houveram aumento de HDL-C entre 16-91%, elevação de ApoAI e redução de apo B (CLARK *et al.*, 2004). No segundo ocorreu aumento de HDL-C para valores entre 61-106 %, além de redução dos valores de LDL-C, com ou sem associação deste medicamento com estatina (BROSSEAU *et al.*, 2004).

8 - OUTRAS PROTEÍNAS E ENZIMAS QUE ATUAM NA MODULAÇÃO DE HDL

a - Lipase Hepática (HL)

Definição e mecanismo de ação

A HL – ou triacilglicerol lipase hepática – é uma glicoproteína que catalisa a hidrólise de TAG e PL das lipoproteínas, apresentando capacidade de tri, di e monoglicéride-hidrolase, além de fosfolipase (HEGELE *et al.*, 1998). A maior parte da HL é sintetizada e secretada pelo fígado e liga-se aos proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) na superfície dos sinusóides das células endoteliais, além da superfície externa dos microvilos das células parenquimatosas do espaço de Disse (RAMSAMY *et al.*, 2000).

A inibição lipolítica está associada à habilidade diferencial que têm as lipoproteínas de remover HL de HSPG, pois enquanto LDL e VLDL são incapazes de deslocar HL, a HDL facilmente o faz, com a participação de apoAI. A HDL₂ estimula a hidrólise de TAG de VLDL mediada por HL, enquanto HDL₃ a inibe (RAMSAMY *et al.*, 2003). Há evidências de que a HL desempenha papel importante na conversão de HDL₂ em HDL₃, reduzindo a concentração de PL e TAG na subfração HDL₂ (RAO *et al.*, 1982). Demonstrou-se que o catabolismo da apoAI da HDL requer a função lipolítica da HL, enquanto que o catabolismo de apoAII ocorre independentemente da lipólise (DUGI *et al.*, 2000). A deficiência da HL origina HDL ricas em TAG, que são bons substratos para a atuação de LPL (ALARCON *et al.*, 2004).

A HL, juntamente com os HSPG, com o receptor SR-BI e com a proteína semelhante ao receptor de LDL-like (*LRP: LDL receptor related protein*), tem a função de estimular a captação hepática de lipoproteínas, tais como os remanescentes de lipoproteínas ricas em TAG, partículas de LDL e HDL (BRUNDERT *et al.*, 2003).

Polimorfismos do gene da HL

O gene da HL está localizado no cromossomo 15 (15q21) e é composto de nove exons, com cerca de 35 kb de DNA (TAHVANAINEN *et al.*, 1998).

Há múltiplas evidências de que a atividade de HL é um dos determinantes da concentração plasmática da HDL-C, contribuindo para as diferenças intra e interindividuais, e que se correlaciona diretamente com a concentração de TAG (COHEN *et al.*, 1999). Estudos com irmãos gêmeos demonstraram que a atividade de HL é fortemente influenciada por fatores genéticos (KUUSI *et al.*, 1978) e análises de 80 famílias nucleares americanas, indicaram que polimorfismo(s) no gene da HL (ou gene muito próximo) é (são) responsável (veis) por 25% da variação da HDL-C plasmático (COHEN *et al.*, 1994).

AGERHOLM-LARSEN *et al.* (2000) genotiparam 9121 indivíduos provenientes do *Copenhagen City Heart Study* (456 dos quais com DAC) e 921 pacientes dinamarqueses com DAC, para os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) -216, -480 e

-729 na região promotora do gene da HL (LIPC). Comparados com o alelo selvagem, os valores de HDL-C e apoA1 apresentaram-se mais elevados em indivíduos homo e heterozigóticos. Após ajuste para os valores de HDL-C, eles apresentaram risco paradoxalmente aumentado para DAC, particularmente aqueles que também eram portadores do genótipo epsilon4/3 do polimorfismo da apo E. Este fato sugere que sob certas circunstâncias, o aumento dos valores de HDL-C pode não ser protetor (ANDERSEN *et al.*, 2003). Resultado semelhante não foi encontrado em 46% dos finlandeses que participaram do *European Atherosclerosis Research Study II (EARS)* (JANSEN *et al.*, 1999), identificados como portadores do polimorfismo de HL na posição -480, nos quais não foi demonstrada a presença de aterosclerose prematura (MURTOMÄKI *et al.*, 1997).

GUERRA *et al.* (1997) realizaram o sequenciamento de regiões chaves do gene da HL, para identificar os polimorfismos em LIPC que pudessem conferir variações hereditárias nas concentrações de HDL-C plasmáticas. Quatro polimorfismos, designados como -250 G→A, -514 C→T, -710 T→C e -763 A→G, foram identificados na região 780 bp à montante do início da transcrição (COHEN *et al.*, 1999). O estudo do metabolismo lipídico destes pacientes mostrou conversão normal de grandes para pequenas VLDL e impedimento da conversão destas para IDL, bem como de IDL para LDL (DEMANT *et al.*, 1988). Foram encontradas HDL e LDL grandes e enriquecidas com TAG (AUWERX *et al.*, 1989). Porém, ao se analisar a significância destes quatro polimorfismos, utilizando a técnica de transfecção transitória nas células HepG2, não foi evidenciada contribuição significativa de nenhum deles no ritmo basal de transcrição de HL (VAN'T HOOFT *et al.*, 2000).

Em pacientes portadores das mutações R186H, S267F, L334F, e T383M foram encontradas disparidades entre o fenótipo bioquímico e a susceptibilidade para aterosclerose (HEGELE *et al.*, 1993; KNUDSEN *et al.*, 1996; KNUDSEN *et al.*, 1997). A diferença entre estes fenótipos poderia ser explicada pela presença de outras hiperlipidemias, que interferissem em suas modulações (HEGELE *et al.*, 1998).

Vários outros polimorfismos em LIPC, que não afetam a atividade de HL, foram descritos; como V73M e N193S (HEGELE *et al.*, 1998) e V133V, T202T, T457T, G175G e T344T (KNUDSEN *et al.*, 1996; TAKAGI *et al.*, 1996; MORI *et al.*, 1996).

Polimorfismo -514T

O polimorfismo -514T foi identificado como uma substituição C→T na posição 514 à montante do início da transcrição, na qual a atividade transcricional promotora é de aproximadamente 70% (DEEB e PENG, 2000). Este polimorfismo está mais relacionado ao tamanho e densidade de LDL e de HDL do que às suas concentrações plasmáticas, mostrando associação com maior concentração de colesterol em partículas grandes e leves de HDL₂ (COUTURE *et al.*, 2000). O alelo T apresentou associação com partículas contendo apoC-III e apo B; porém alguns estudos não encontraram associação entre este polimorfismo e concentração de HDL-C (SU *et al.*, 2002).

O alelo -514T é menos comum e foi demonstrada associação entre o genótipo TT (excluindo condições interferentes, como diabetes e tabagismo) e altas concentrações de HDL-C plasmático, em homens homozigóticos, mas não em heterozigóticos ou mulheres, que apresentaram moderado aumento de HDL-C (JANSEN *et al.*, 1997). Considerando-se a atividade plasmática da HL pós-heparina, o alelo -514T mostrou associação com menor resposta ao estímulo, tanto em homens como em mulheres na pré-menopausa (CARR *et al.*, 2001). HIRANO *et al.* (1995) verificaram que a atividade de HL foi significativamente menor em heterozigóticos para deficiência de CETP com DAC, comparados aos não afetados. Em homens normolipidêmicos portadores de DAC, foi demonstrada menor atividade de HL pós-heparina, além de prejuízo do *clearance* pós-prandial de lipoproteínas (GROOT *et al.*, 1991).

Em estudo de JANSEN *et al.* (1999) foi demonstrada associação entre atividade diminuída da HL e aumento da concentração de HDL-C, em filhos saudáveis de homens com DAC precoce, provenientes de várias regiões da Europa.

Frequência significativa do alelo -514T foi observada em americanos de descendência africana, japonesa e hispânica (HAFFNER *et al.*, 1999).

Polimorfismo -586 T/C

Estudo realizado com pacientes chineses portadores de DAC, identificou um polimorfismo com nucleotídeo único em LIPC, e que não estava em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos. Os pacientes, com o diagnóstico estabelecido por

angiografia, apresentaram maior número deste polimorfismo quando comparados aos controles. Neste estudo foi encontrada associação com variação plasmática na concentração de HDL-C, sugerindo que o polimorfismo -586 T para C afetaria diretamente a expressão de HL (SU *et al.*, 2002).

Polimorfismo -250 G/A

Variante presente em LIPC, associado com diminuição da atividade de HL, aumento de HDL₂ e partículas de LDL com menor densidade. Em um estudo com 57 mulheres pré-menopausadas saudáveis, este alelo mostrou-se associado com redução da atividade de HL (CARR *et al.*, 1999).

Polimorfismo -480 C/T

JANSEN *et al.*(1999) analisaram o genótipo de 18 indivíduos com atividade baixa de HL e DAC angiograficamente documentada, sequenciando nove exons e parte do promotor do LIPC, não encontrando mutações estruturais nestes segmentos. No entanto, 50% dos pacientes apresentaram uma substituição C para T no nucleotídeo -480, mais freqüente nos pacientes com DAC, do que nos controles. A especificidade da HL não estava afetada, porém a sua massa e atividade estavam reduzidas. A avaliação da reserva de fluxo coronariano foi comparada com homens jovens e saudáveis, para avaliar disfunção vascular antes do aparecimento de lesões angiográficas, mostrando associação deste polimorfismo com modificação da reatividade coronariana. Este fato sugere possibilidade deste polimorfismo ser um fator de risco para a DAC.

HL e Aterosclerose

Vários grupos investigaram a associação da atividade de HL em polimorfismos na região LIPC com o risco de DAC (JANSEN *et al.*, 2002). Os resultados são controversos, mostrando incidência aumentada de DAC nas mutações que levam à deficiência completa de atividade da HL, o que contraria a crença de que o aumento da atividade desta enzima seja pró-aterogênico. O efeito final poderia ser resultado da

modulação de outras alterações lipídicas, como o aumento dos valores de LDL-C e/ou regulação genética de outras enzimas envolvidas no metabolismo lipoprotéico, como PLTP, LPL e CETP (BRUNZELL e DEEB, 2001). No entanto, deve-se considerar que a HL desempenha outros papéis potencialmente antiaterogênicos, como o estímulo à captação hepática de HDL-C, que ocorre no TRC (ZAMBON *et al.*, 2003).

Quando apresenta atividade aumentada, a HL leva ao aumento da prevalência de partículas aterogênicas, pequenas e densas de LDL, com maior risco para DAC. Este efeito foi observado em homens, comparados a mulheres pré-menopausadas e indivíduos obesos, comparados a magros. Se a atividade de HL está reduzida, com os valores de LDL-C normais/diminuídos, pode haver prejuízo do TRC e do catabolismo de remanescentes, mas com baixo risco de aterosclerose (ZAMBON *et al.*, 2003).

Considerando que grande parte dos resultados dos estudos da relação entre atividade da HL e DAC são produtos da análise de pequenos grupos, casos-controles, e portanto, controversos, COHEN *et al.* (1999) analisaram estatisticamente dois estudos com grande número de indivíduos. JANSEN *et al.* (1997) encontraram maior frequência de DAC documentada por angiografia em 782 homens, nos quais o alelo -514T era mais frequente. O estudo de SHOHET *et al.* (1999) comparou voluntários saudáveis com portadores de aterosclerose coronariana, igualmente comprovada por angiografia, e pacientes com doença coronariana sintomática e outros sem sintomas. Os resultados indicaram que a prevalência do alelo -514T foi insignificante nos pacientes com DAC, em relação aos controles. A análise estatística rigorosa, ao comparar os dados dos dois estudos, mostrou uma frequência idêntica deste alelo entre pacientes e controles, sugerindo que se há alguma magnitude de risco atribuída a este alelo, é mínima (COHEN *et al.*, 1999). No entanto, FAGGIN *et al.* (2002), encontraram associação de -514 C para T com placas ateroscleróticas instáveis, sendo que o genótipo CC mostrou maior incidência de eventos isquêmicos cerebrovasculares do que pacientes CT/TT.

Devido aos múltiplos papéis metabólicos desempenhados por HL, é difícil concluir neste momento o seu papel aterogênico potencial. Considerando-se os dados disponíveis, poderia se afirmar que se HL metaboliza HDL e apresenta-se com função diminuída, o efeito de aumentar a concentração de HDL-C não estaria associado a um maior risco de aterosclerose (THUREN, 2000).

b - Lipoproteína Lipase (LPL)

Definição e Mecanismo de Ação

A enzima mais importante no metabolismo intravascular das lipoproteínas pós-prandiais, ricas em TAG, é a LPL. Nos tecidos, é sintetizada e secretada na forma catalítica e então transportada para a superfície do endotélio capilar daquele tecido (GOLDBERG, 1996).

Suas principais funções são de hidrolisar as lipoproteínas ricas em TAG, QM e VLDL, fornecendo ácidos graxos para os tecidos alvo (SEMENKOVICH *et al.*, 1989). Além disso, interage com lipoproteínas, independentemente de sua atividade lipolítica, facilita a hidrólise do TAG e ancora as lipoproteínas na parede vascular, possibilitando a sua captação (MERKEL *et al.*, 1998). Atua também como ligante do receptor de LDL (MEDH *et al.*, 1996) e de outros receptores desta família, facilitando a captação dessas lipoproteínas (MERKEL *et al.*, 1998), e medeia a captação seletiva de lípidos associados às lipoproteínas (MERKEL *et al.*, 2002) e às vitaminas lipossolúveis A e E (SATTLER *et al.*, 1996). Tem particular importância na transferência de PL e apolipoproteínas para HDL, desempenhando papel crítico na formação desta partícula (OLIVECRONA e BENGTSSON-OLIVECRONA, 1993).

Os sítios catalíticos da enzima consistem de Ser132, Asp156 e His 241, que se localizam no domínio N terminal. A interação deste segmento com substratos lipoprotéicos desencadeia uma alteração conformacional, com exposição do sítio catalítico e desencadeamento da sua função (SANTAMARINA-FOJO e DUGI, 1994). A LPL quando ativa, é um homodímero não-covalente, orientado conforme uma conformação espacial de cabeça-cauda (WONG *et al.*, 1997). O processo de interação com os proteoglicanos de heparan sulfato é importante para a estabilidade da enzima e para a localização da mesma nos sítios onde atua, pois quando dissociada na forma de monômeros, perde a sua atividade (LUTZ *et al.*, 2001).

Mutações do gene de LPL

Acredita-se que a LPL é dividida em domínio N-terminal (resíduos 1 a 312), essencial para função catalítica da enzima, e domínio C-terminal (resíduos 313 a 448), importantes para a captação de lipoproteínas pelos receptores da superfície celular (MURTHY *et al.*, 1996). Essa diferenciação poderia explicar a repercussão diversa das diferentes substituições de aminoácidos. Mais de 40 diferentes mutações estruturais da LPL foram descritas nos últimos anos, e como resultado dessas alterações, a enzima pode não ser produzida ou tornar-se cataliticamente inativa. A maior parte delas foi encontrada nos exons 4, 5 e 6 do gene da LPL e em pequeno número de indivíduos (BRUNZELL, 1995).

As mutações decorrentes das substituições no gene da LPL – Gly188Glu, Asp9Asn, Asn291Ser e Ser447Tre – são encontradas com maior frequência. As três primeiras apresentam substituições localizadas na extremidade da porção N-terminal, que possivelmente influenciam a atividade catalítica. O local da substituição Ser447Tre parece interferir na captação de lipoproteínas pelos receptores da superfície celular. Esta substituição poderia ter efeitos diferentes das outras, aumentando a função da LPL (MURTHY *et al.*, 1996).

S447X (Ser447Tre)

Nesta variante do gene da LPL, descrita inicialmente por HATA *et al.* (1990), ocorre a substituição de um nucleotídeo no exon 9 e a introdução de um códon de parada na posição 447 da proteína madura, com perda dos dois aminoácidos da porção C-terminal (substituição C→G, Ser447→Stop).

Foram publicados resultados conflitantes sobre a mutação S447X, e o seu estado funcional ou polimorfismo neutro ainda é questionável (GROENEMEIJER *et al.*, 1997). Destaca-se o estudo de uma população que não apresentava enfermidades, hábitos ou medicamentos interferentes na concentração de HDL-C e na qual foram estratificados os diferentes valores de HDL-C, mostrando que os indivíduos com valores mais altos eram com maior frequência os portadores dessa variação,

se comparados àqueles com valores mais baixos. A correlação positiva entre a concentração de HDL e a atividade aumentada de LPL é compatível com o conceito de que a hidrólise de lipoproteínas ricas em TAG, catalisada por LPL, gera remanescentes de superfície que contribuem para aumentar o *pool* de HDL (KUIVENHOVEN *et al.*, 1997).

Indivíduos portadores de HALP (SICH *et al.*, 1998) foram avaliados quanto à atividade de LPL, mostrando aumento da taxa de lipólise das lipoproteínas ricas em TAG, aumento da atividade de LPL e diminuição da atividade de HL. Os valores de colesterol total, HDL-C e apoAI mostraram aumento significativo, acompanhados de tendência à diminuição dos valores de TAG, em relação aos controles. Analisada a composição lipídica das subfrações de HDL, foram encontradas evidentes diferenças quanto ao conteúdo de colesterol nos dois grupos, porém não na composição de TAG. A LPL mostrou-se responsável por 58% da variação de HDL no grupo HALP, diverso de outros trabalhos que associaram redução nas atividades de CETP e HL relacionados com HALP (TALL., 1995).

É possível que, ao contrário de outras mutações descritas, a S447X provoque potencialmente um efeito benéfico em portadores heterozigóticos (KUIVENHOVEN *et al.*, 1997). Estudo no qual foi realizada genotipagem em homens portadores de aterosclerose coronariana e tratados com beta-bloqueadores, mostrou frequência alélica de 0.096 no *cohort* de pacientes DAC, 10% de aumento da atividade da LPL, aumento da HDL-C e menores valores de TAG (GROENEMEIJER *et al.*, 1997).

G188E (Gly188Glu)

Dois importantes estudos analisaram a frequência desta mutação em pacientes com DAC. Apesar de rara, verificou-se que está associada com aumento significativo de cinco vezes no risco para doença cardiovascular (WITTRUP *et al.*, 1999). A substituição Gly188Glu localiza-se na região ligadora de lípidos, desta forma, a reduzida ligação e degradação de TAG poderia afetar os valores plasmáticos de HDL-C e TAG (NORDESTGAARD *et al.*, 1997).

Asp9A, Asn291Ser, D9N/-93T do alelo G de LPL e outras

São mutações que, na grande parte dos resultados, apresentam o fenótipo de hipertrigliceridemia, diminuição dos valores de HDL-C e menor atividade de LPL (JUKEMA *et al.*, 1996), o que, segundo alguns autores (TALMUD e HUMPHIERS, 2001), favorece a progressão de aterosclerose coronariana. O alelo D9N / -93T para G esteve associado a duas vezes maior risco cardiovascular (EHERENBORG *et al.*, 1997).

A substituição Asn291Ser é localizada em um local de ligação com a heparina, levando a aumento dos valores de TAG (WITTRUP *et al.*, 1999). Em alguns estudos foi demonstrada diminuição da atividade de LPL pós-heparina em 30% e aumento de TAG plasmático (NORDESTGAAR *et al.*, 1997).

Foram descritas três outras mutações na região promotora do gene da LPL, nas posições -93, -53 e -39, em pacientes com alterações familiares combinadas de colesterol, TAG ou ambas. Estes dados foram confirmados em estudo avaliando comparativamente populações caucasiana, chinesa e negra sul-africana (EHRENBORG *et al.*, 1997).

HindIII

No gene da LPL foram encontrados alguns RFLPs, como HindIII no intron 8 e o PvuII no intron 6. Apesar de não muito consistentes, alguns resultados mostraram associação de HindIII com hipertrigliceridemia, com DAC e variações nos valores de HDL-C. O polimorfismo PvuII mostrou associação com valores de TAG (GERDES *et al.*, 1995).

LPL e Aterosclerose

A deficiência completa da LPL manifesta-se por hipertrigliceridemia severa, crônica, presente no início da infância, com manifestações de dor abdominal, hepatoesplenomegalia e deficiência no crescimento. Em alguns casos, pode manifestar-se mais tardiamente com dor abdominal, plasma leitoso, xantomas eruptivos e *lipemia retinalis* (BRUNZELL e DEEB, 2001). Ocorre numa frequência estimada de $1:10^6$ na

população mundial. Foram descritas mutações no gene da LPL que resultam em defeitos parciais da função catalítica, numa frequência de 5 a 7% na população geral (BIJVOET *et al.*, 1996). Neste caso, a manifestação clínica é de aumento moderado dos valores de TAG, desencadeado por diabetes, gestação ou obesidade (HAYDEN *et al.*, 1994). Estudos metabólicos pós-prandiais tem caracterizado melhor essas disfunções (PIMSTONE *et al.*, 1996).

Recentemente, a diminuição de atividade da LPL foi associada à progressão de aterosclerose coronariana e ao maior risco de desenvolvimento da doença isquêmica coronariana (WITTRUP *et al.*, 1999). Nestas situações, o TRC encontra-se diminuído, devido à redução dos valores de HDL-C. O aumento na concentração de TAG indica que os remanescentes de lipoproteínas e as lipoproteínas parcialmente deslipidadas de diferentes tamanhos e composições, como as VLDL, as IDL, os remanescentes de QM e as partículas contendo apo B permanecem no plasma (HODIS e MACK, 1995), com a possibilidade de serem retidas seletivamente na íntima e promoverem aterosclerose (WITTRUP *et al.*, 1999). Além disso, as mutações poderiam influir no estabelecimento da aterosclerose por outros mecanismos, como a associação com uma subclasse de LDL pequenas e a presença de lipoproteínas ricas em TAG no período pós-prandial (WITTRUP *et al.*, 1999).

Em estudos com camundongos transgênicos com superexpressão de LPL, foi demonstrada diminuição da relação colesterol total / HDL-C, e com a utilização de drogas que aumentam a ação de LPL, menor concentração do TAG e aumento da HDL-C (SHEPHERD, 1995).

c - Proteína de transferência dos fosfolípides (PLTP)

Definição

A PLTP proporciona a transferência *in vivo* de PL das lipoproteínas ricas em TAG para HDL, durante a lipólise. Estes PL são componentes liberados da superfície de QM e de VLDL, tornando-se precursores de HDL. A PLTP remodela as HDL, e a interação

entre estes dois elementos resulta na liberação de partículas pequenas e pobres em lípidos e de grandes partículas, como a α -HDL (VAN TOL, 2002). A PLTP é uma proteína de transferência de lípidos inespecífica e alguns estudos mostraram que é capaz de transferir todas as espécies de PL, além de diacilglicerol, componente importante das HDL (MASSEY *et al.*, 1984).

A PLTP humana é sintetizada como uma pré-proteína contendo 493 resíduos de aminoácidos e alcança 476 resíduos como proteína madura. O RNAm de PLTP é expresso intensamente em fígado e tecido adiposo, mas também em ovários, timo e placenta. A região promotora do gene da PLTP situa-se entre as bases -230 e -72, relativas ao primeiro sítio do início da transcrição, e é responsável pelo controle da expressão do RNAm (VAN TOL, 2002).

Mecanismo de Ação

Ainda que o mecanismo de ação da PLTP não esteja completamente esclarecido, recentemente foi demonstrado que a atividade de transferência de PL pela PLTP é marcadamente influenciada pela carga eletrostática das lipoproteínas. Foram encontradas similaridades no efeito de eletronegatividade da lipoproteína nas atividades de transferência, tanto de CETP, como de PLTP (DESRUMAUX *et al.*, 1998). Resíduos de aminoácidos com carga elétrica positiva (Lys233 e Arg259 em CETP e Arg218 e Arg245 em PLTP) interagem com grupos de carga negativa na superfície das lipoproteínas, incluindo grupo de fosfatos de PL, grupo carboxílico de ácidos graxos não esterificados e carga negativa de apolipoproteínas. Posteriormente, os sítios ligadores-de-lípidos de CETP e de PLTP, com localização nos domínios C-terminal, captam lípidos neutros ou moléculas de PL, respectivamente (LAGROST *et al.*, 1998).

Anticorpos específicos anti-PLTP, ao bloquearem quase por completo a atividade plasmática de transferência dos PL, em um sistema experimental lipossoma-HDL, demonstraram que a PLTP desempenha o papel mais importante na transferência de PL de lipoproteínas de grande tamanho e ricas em TAG para HDL, *in vivo*. O aumento da

concentração de TAG em partículas de HDL estimula o processo de conversão em HDL grandes e pré- β -HDL (TU *et al.*, 1993). A PLTP também mostrou capacidade de transferir colesterol não esterificado de vesículas fosfatidilcolina e colesterol para HDL (NISHIDA e NISHIDA, 1997).

A PLTP interage com apoAI e apoAII plasmáticas através de uma região no domínio amino-terminal (PUSSINEN *et al.*, 1995) e uma etapa importante do processo é a dissociação da apoAI “pobre em lípidos” da superfície de HDL, aumentando assim o efluxo de colesterol das células para HDL. À medida que os PL são transferidos, continua a liberação destas apoAI com subsequente fusão das partículas instáveis, aumentando assim o tamanho do *pool* de HDL (LUSA *et al.*, 1996). A PLTP apresenta menor afinidade por partículas contendo apoAII e a formação de partículas maiores, além da liberação de apoAI, são inibidas pelo aumento da concentração de apoAII na HDL (PUSSINEN *et al.*, 1997). A PLTP, ao participar na geração das pré- β -HDL, que atuam como aceptoras iniciais de colesterol, e das grandes α -HDL ricas em EC, que os transportam em grande quantidade para o fígado, exerce efeito duplamente benéfico sobre o TRC (LAGROST *et al.*, 1998).

Fatores que interferem na atuação de PLTP

Ainda não foi descrito um estado de deficiência de PLTP em humanos. No entanto, em modelos animais, como camundongos com expressão ausente do gene de PLTP (PLTP $-/-$), foi demonstrada por meio da redução em cerca de 50% dos valores de HDL-C, a importância do papel de PLTP (JIANG *et al.*, 1999). Nestes camundongos PLTP $-/-$ houve perda completa de transferência de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e esfingomielina. Houve perda parcial da atividade de transferência do colesterol livre, sugerindo que a transferência de PL e colesterol livre, a partir das lipoproteínas ricas em TAG para HDL, seria mediada por PLTP, além da formação das partículas pré- β -HDL. A alteração da composição das partículas de HDL poderia levar à sua desestabilização e subsequente hipercatabolismo (KUIVENHOVEN *et al.*, 1997).

Cruzamentos entre camundongos deficientes em PLTP, com transgênicos para apoB e deficientes de apo E ou de receptor de LDL, levaram à diminuição da aterosclerose nestes animais (JIANG *et al.*, 2001). Possivelmente, uma das causas seria o fato de PLTP não facilitar a transferência de vitamina E das lipoproteínas ricas em TAG para HDL, tornando-as menos susceptíveis à oxidação (JIANG *et al.*, 2002). Por outro lado, a superexpressão de PLTP foi associada ao aumento da aterosclerose, possivelmente pela razão inversa. No entanto, camundongos heterozigotos PLTP +/-, com cerca de 50% da atividade normal de PLTP, não mostraram alterações lipoprotéicas, sugerindo que pequenas variações de atividade de PLTP não afetam o perfil das lipoproteínas (YANG *et al.*, 2003). Camundongos transgênicos que superexpressam a PLTP, quando cruzados com transgênicos para apoAI, mostraram fenótipo com valores plasmáticos elevados de HDL, nos quais a produção excessiva de HDL poderia ultrapassar a habilidade de PLTP de estimular a “lipidação” de HDL nascente (JIANG, 1996).

A atividade de transferência de PL da PLTP varia muito em indivíduos normais, sugerindo que a concentração de PLTP está correlacionada positivamente com HDL-C, e não à sua atividade. A atividade de PLTP em HDL parece modular as atividades de LCAT e CETP, *in vitro* (TOLLEFSON *et al.*, 1988). A concentração plasmática de PLTP é significativamente mais baixa em indivíduos hipoalfalipoprotéicos, e mais alta em indivíduos com deficiência de CETP, porém não há diferença quanto à atividade plasmática de PLTP entre os grupos, sugerindo a existência de uma forma inativa de PLTP (OKA *et al.*, 2002).

Mutações do gene de PLTP

Quatrocentos voluntários saudáveis foram avaliados para determinar o comportamento normal de PLTP e submeteram-se a um estudo do perfil lipídico. Foram identificadas as freqüências alélicas de seis polimorfismos do gene da PLTP, porém nenhum deles mostrou associação significativa com a atividade de PLTP e com o perfil lipídico (TAHVANAINEN *et al.*, 1999).

PLTP e Aterosclerose

SCHLITT *et al.* (2003) avaliaram a atividade plasmática da PLTP em 1102 voluntários portadores de DAC e 444 controles, demonstrando que a atividade da PLTP, em pacientes com DAC, era maior do que controles, além de possuir valor preditivo independente para DAC.

2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1) Verificar a prevalência e a frequência alélica na população local (definida por um fenótipo de HALP) de duas das mutações do gene da CETP: Int14A e D442G e determinar a relação entre as variantes genéticas dentro desta população e alterações do metabolismo lipídico, além de aterosclerose clinicamente estabelecida (“*Paper*” I).

2) Verificar a prevalência e a frequência alélica na população local de dois dos polimorfismos do gene da CETP, I405V e TaqIB, além de determinar a relação entre as variantes genéticas dentro desta população e as alterações do metabolismo lipídico, além de aterosclerose clinicamente estabelecida (“*Paper*” II).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionados voluntários provenientes do ambulatório do Hospital das Clínicas da UNICAMP, do ambulatório de Dislipidemias do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese e do ambulatório de Lípides da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Estes voluntários foram classificados segundo as concentrações plasmáticas de HDL-C, como controles (CTL, n: 139, HDL-C<68 mg/dL) e pacientes hiperalfalipoproteinêmicos (HALP, n: 291≥68 mg/dL); conforme o percentil 90th obtido para a população local de indivíduos normolipidêmicos (DE FARIA *et al*, não publicado). Ambos os grupos foram pareados por idade e IMC.

Como critérios de exclusão foram consideradas as causas secundárias de HALP: hepatopatias, nefropatias, pneumopatias, endocrinopatias, diabetes melito ou intolerância glicídica, ingestão crônica de bebida alcoólica (>75g/dia) e uso de alguns medicamentos (corticosteróides, insulina, fibratos, ácido nicotínico, estatinas, estrógenos, fenitoína, hidrocarbonetos clorados e inibidores de proteases). Para a análise das mutações e polimorfismos, extraiu-se o DNA das células brancas sanguíneas destes voluntários.

A presença de doença cardiovascular (DCV) como a angina do peito, infarto agudo do miocárdio (IAM), doença arterial periférica ou acidente vascular cerebral; dislipidemia (TAG>150 mg/dL e/ou LDL-C>130 mg/dL); obesidade (IMC>30 kg/m²); tabagismo e sedentarismo foram avaliados clinicamente e/ou com testes laboratoriais.

A separação dos subgrupos, com e sem aterosclerose, foi feita a partir dos prontuários pesquisados e/ou entrevista médica, exames clínicos e ultra-sonografia de carótidas. Clinicamente, os indivíduos foram classificados em três categorias: doença aterosclerótica ausente, provável ou definida, conforme foi descrito por HIRANO *et al*. (1995).

O critério de “doença cardiovascular aterosclerótica estabelecida” abrangeu IAM prévio (detectado em serviço médico-hospitalar), IAM silencioso baseado no eletrocardiograma (ECG) e/ou angina do peito. O IAM foi definido pela presença de ao menos dois dos três critérios: dor torácica típica, ECG com alterações *QRS* e *ST-T* e

elevação característica das enzimas cardíacas plasmáticas. A angina do peito foi definida por episódios de desconforto torácico breves (maiores ou iguais a 15 minutos), que pioraram com exercício e/ou emoção, aliviados com repouso ou uso de nitroglicerina (ou outra medicação específica). Além disso, foi considerada parte deste critério a intervenção cirúrgica prévia para revascularização miocárdica.

Como manifestações de doença aterosclerótica também foram consideradas o acidente vascular cerebral, que foi definido como início rápido de déficit neurológico local e persistente, na ausência de outras doenças que explicassem estes sintomas. Estes poderiam assumir a forma de episódio isquêmico transitório, o qual é acompanhado de reversão completa em 24 horas e de doença vascular periférica, com comprometimento isquêmico de membros periféricos, na ausência de doença vascular de outra etiologia.

Os eventos considerados de presunção – na impossibilidade de classificá-los como inequívocos – foram denominados como “doença cardiovascular aterosclerótica provável”. Foram eles: queixas de caráter anginoso – sem necessidade de intervenção cirúrgica, ou medicação específica e/ou eletrocardiograma (ECG) – e medidas duvidosas de enzimas cardíacas. Quadro clínico indefinido, bem como exames inconsistentes, também foram aplicados na inclusão das demais doenças cardiovasculares ateroscleróticas em “doença aterosclerótica provável”.

Da mesma forma foi considerado como dado sugestivo de doença cardiovascular aterosclerótica familiar, o relato de morte súbita em parentes próximos, desde que baseado em evidências médico-hospitalares (morte rápida, em média uma hora após início dos sintomas agudos, desacompanhada de história de violência ou acidente associados).

Para a inclusão dos pacientes HALP e controles no grupo dos livres de comprometimento aterosclerótico, partiu-se do princípio de que todos os parâmetros considerados acima eram negativos.

No questionário e exame físico aplicados aos voluntários, constaram a identificação do paciente (nome, número do registro hospitalar, idade, sexo, cor, raça, estado civil, número de filhos, endereço e telefone), dados antropométricos, IMC e

circunferência de cintura (CC), dados clínicos (pressão arterial, sopros periféricos, xantomas, xantelasmas, arco senil, *acanthosis nigricans*, exame do aparelho cardiovascular e dos outros sistemas), hábitos de vida presentes (etilismo ou não, tabagismo ou não, padrão alimentar e hábito de atividade física), histórico individual (medicamentos em uso; doenças atuais e anteriores, enfatizando episódios cardiovasculares; além de dados de possibilidade, comprovação ou não da doença), informações sobre o climatério (em mulheres) e histórico familiar (doenças cardiovasculares e outras, além de longevidade).

2 - DESENHO EXPERIMENTAL

O projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e aprovado em julho/2000 pelo CONEP (registro 1456). Da mesma maneira, obtivemos aprovação do estudo pelas Comissões de Ética do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Ao comparecer, cada voluntário assinou um documento consentindo em participar da pesquisa.

A punção venosa para obtenção de soro e/ou plasma ocorreu com o paciente em jejum de 12 horas e foi realizada em duas etapas: a primeira (10-15 mL de sangue) e a segunda (4 mL de sangue) após administração de heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo) na dose de 100 U.I./ kg de peso, E.V., para determinação da atividade das lipases total e hepática (ENHOLM *et al.*, 1986). O procedimento ocorreu no Setor de Coleta do Laboratório de Patologia Clínica, acompanhado por uma médica e uma auxiliar. O soro foi armazenado com a adição de EDTA 1mM (10 µL por mL de amostra).

Uma parte deste material foi submetida imediatamente às análises laboratoriais no Serviço de Bioquímica do Hospital das Clínicas da UNICAMP e a outra parte foi armazenada a -20°C, para análises posteriores no Laboratório de Lípidos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Eliana Cotta de Faria, e no Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da USP. As análises moleculares foram realizadas no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Helena C. F. de Oliveira.

O atendimento médico foi realizado no Ambulatório de Dislipidemias da Faculdade de Ciências Médicas, Hospital das Clínicas da UNICAMP, para o registro das histórias pessoal e familiar seguido de exame físico completo, enfatizando manifestações sugestivas de doença aterosclerótica.

3 - ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As dosagens de ácido úrico, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase, uréia, glicose, colesterol total e TAG foram realizadas por métodos enzimático-colorimétricos em analisador automático BM Hitachi 917/Roche (Mainheinn, Alemanha), e os hormônios tireo-estimulante (TSH) e tiroxina livre (T4 livre) por método eletroquimioluminescente em Elexsys 2010 / Roche (Basiléia, Suíça), utilizando reagentes comerciais da Roche (Mainheinn, Alemanha).

As subfrações de HDL (HDL₂ e HDL₃) foram obtidas por microultracentrifugação seqüencial do sobrenadante em microultracentrífuga da Beckman (modelo Airfuge / 75B, Beckman Instruments, Palo Alto, EUA), após a precipitação de lipoproteínas contendo apolipoproteína B100 com sulfato de dextrana. HDL-C foi medida por método homogêneo direto (MATSUZAKI *et al.*, 1996).

A LDL-C foi obtida diretamente através de método homogêneo colorimétrico enzimático (RIFAI *et al.*, 1992) em analisador químico automático BM Hitachi 917 / Roche (Mainheinn, Alemanha), ou indiretamente utilizando a equação de FRIEDWALD *et al.*, (1972).

Os AGL, os PL e colesterol livre foram analisados por métodos enzimático-colorimétricos utilizando reagentes comerciais da Waco (Osaka, Japão). Os EC foram estimados pela diferença entre o colesterol total e o colesterol livre.

As apolipoproteínas ApoAI e Apo B₁₀₀ e a Lp(a) foram analisadas por nefelometria através de reação imunoquímica em aparelho BNII / Marburg (Alemanha), utilizando reagentes Dade-Boehringer® (Manheinn, Alemanha).

Atividade da CETP

A atividade da CETP foi mensurada através da medida de transferência de EC de HDL marcada radioativamente para as lipoproteínas que contêm apo B, segundo o método radiométrico exógeno (LAGROST *et al.*, 1998). As partículas aceptoras de EC (LDL e VLDL, $d < 1,063$ g/mL) e as doadoras de EC (HDL, $1,006 < d < 1,21$ g/mL) foram obtidas por ultracentrifugação seqüencial a partir de um *pool* de plasma normolipidêmico, em ultracentrífuga modelo L80 / 75B da Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA), utilizando rotor 50Ti. As HDL foram isotopicamente marcadas com [4- 14 C]-colesteril oleate (New England Nuclear, EUA) e purificadas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade, utilizando rotor SW40 da Beckman.

Os ensaios de transferência de EC foram realizados em duplicata com a adição do doador marcado (14 C-HDL diluída para 40 mg/dL de colesterol) do aceptor (VLDL + LDL diluídas para 200 mg/dL de colesterol), de tampão Tris pH 7,4 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e de soro de cada paciente como fonte de CETP. A mistura foi homogeneizada, incubada por 4 horas à 37°C, resfriada e precipitada com solução 1M de sulfato de dextrana e cloreto de magnésio (1:1). Após centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm (4°C), o sobrenadante foi coletado para contagem de radioatividade em contador de cintilação líquida Beckman, modelo LS-5000 (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA).

O resultado foi expresso como porcentagem de transferência de EC transferido de HDL para as lipoproteínas VLDL e LDL e calculado pela equação:

$$\% \text{ transferência de EC} = [1 - (\text{dpm amostra} / \text{dpm branco}) \times 100].$$

Atividade das Lipases

As atividades das LPL e HL foram determinadas no plasma pós-heparina, com método radiométrico e por meio da medida da liberação de AGL, resultantes da hidrólise de substrato artificial de trioleína triciada (EHNHOLM *et al.*, 1986). O substrato foi preparado

pela adição de trioleína fria [(1, 2, 3-Tris [cis-9-octadecenoleo]glicerol)] (Sigma, St Louis, MO, EUA), trioleína radioativa [(9,10 ^3H (N)-trioleína], atividade específica de 26,8 Ci / mmol (New England Nuclear, Boston, EUA) e estabilizada por uma solução de goma arábica à 5% (Sigma, St Louis, MO, EUA). A mistura foi submetida a sonicações alternadas, 8 vezes de 30 segundos, em sonicador Branson Cell Disruptor (Branson Sonifier Modelo 450, Danbury, EUA), com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro. Após a sonicação, foi acrescentada albumina bovina sérica livre de ácidos graxos a 10% (Sigma, St Louis, MO, EUA), para quelar os AGL. Com o objetivo de inibir a LPL plasmática, foi adicionado 2 M NaCl na solução tampão dos tubos onde se determinou a atividade da HL.

A reação foi incubada por 60 minutos a 37°C, e interrompida com a adição de 715 μL de uma solução de metanol:clorofórmio: heptano (1,41:1,25:1; V/V/V) e 165 μL da solução de K_2CO_3 / H_3BO_3 (pH = 10,5). A radioatividade foi determinada num contador de cintilação líquida modelo LS-5000 (Beckman, Beckman Instruments, Palo Alto, EUA). A atividade de LPL foi calculada pela diferença entre as atividades da lipase total e da HL e expressa como nmol de ácidos graxos não esterificados (NEFA). $\text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Atividade da PLTP

A atividade da PLTP foi mensurada através da medida de transferência de [^{14}C] fosfatidilcolina, entre lipossomas e lipoproteínas de alta densidade (DAMEN *et al.*, 1982). Para preparar 1 mL de lipossomas radioativamente marcados, secou-se, num frasco limpo, contendo 125 μmol de fosfatidilcolina e fosfatidilserina, ^{14}C -fosfatidilcolina e hidroxitolueno butilado. A mistura lipídica foi sonicada com tampão contendo NaCl (150 mM), tris-HCl (10 mM) e EDTA (1 mM), pH 7,4, 3 vezes durante 5 minutos, em gelo. As amostras de plasma como fonte de PLTP (10 μL) foram incubadas por 1 hora a 37°C com o lipossoma marcado radioativamente (125 nmol de PL), HDL (250 μg de proteína) e tampão Tris, pH 7,4 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM), para um volume final de 400 μL .

Os lipossomas foram precipitados com solução precipitante (500 mM de NaCl, 125 mM de MgCl₂ e 140 U heparina/tubo), e o sobrenadante coletado para determinar a medida da radioatividade.

A percentagem de transferência de PL foi determinada pela radioatividade no sobrenadante (HDL) em relação ao branco, segundo a equação:

$$\% \text{ de transferência de PL radioativo} = (\text{dpm amostra} - \text{dpm branco} / \text{dpm total} - \text{dpm branco}) \times 100$$

4 - AUTO-ANTICORPOS CONTRA EPITOPOS DE LDL OXIDADA

Os auto-anticorpos contra epitopos de LDL oxidado foram avaliados em um subgrupo de participantes, pelo método ELISA, após incubação das amostras com LDL cobre-oxidado. A densidade ótica das amostras foi lida a 460 nm e os resultados apresentados em leituras de percentagens de densidade ótica, relativa aos valores das faixas do grupo (GIDLUND *et al.*, 1996).

5 - ULTRA-SONOGRAFIA DAS ARTÉRIAS CARÓTIDAS

Os pacientes foram encaminhados à ultra-sonografia *doppler* de carótidas, após a realização das dosagens bioquímicas. Para a medida do IMT das artérias carótidas, os pacientes foram examinados em decúbito dorsal, com a cabeça elevada em cerca de 20 graus e rotação de cerca de 45 graus. O exame foi realizado nos aparelhos ATL HDI 1500 e 3500 Ultrasound System (Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA), e Logic 400 (General Electric Healthcare, Milwaukee, EUA), com transdutores lineares de 6-9 MHz. O protocolo, em todos os casos, foi realizado pelo mesmo médico ultra-sonografista e consistiu de várias medidas longitudinais de segmentos das artérias carótidas comuns direita e esquerda, de acordo com o preconizado pela literatura (SALONEN *et al.*, 1991; SIMONS *et al.*, 1999). Os resultados foram expressos como média aritmética das espessuras (em milímetros) das carótidas direita e esquerda.

6 - ANÁLISES MOLECULARES

Extração de DNA

A extração do DNA genômico dos leucócitos foi realizada com sangue periférico, segundo o método desenvolvido por SALAZAR *et al.* (2001).

O sangue total foi coletado em tubos contendo EDTA (10%, 0,1 mL). Em um tubo de microcentrifuga estéril, a 300 µL de sangue total foram adicionados igual volume de Iodeto de Sódio 6M, o que promoveu a lise celular. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos por 20 segundos. Ao homogenato resultante foram acrescentados mistura recém preparada de 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (v/v, 24:1), para extração das proteínas e debris celulares. Homogeneizou-se em agitador de tubos por 20 segundos e centrifugou-se a 12.000 rpm (10700 x g) por 5 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, removeu-se cuidadosamente a fase aquosa (superior) e transferiu-se para outro microtubo estéril. Adicionou-se 400 µL de isopropanol gelado e incubou-se por 3 minutos para a precipitação do DNA genômico. Centrifugou-se a 12.000 rpm (10700 x g) por 5 minutos, à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com álcool isopropílico a 37% e centrifugado à temperatura ambiente, 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA, após secar à temperatura ambiente, foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10mM; EDTA 0,1mM;), incubado por 10 minutos a 56°C e armazenado a -20°C.

A quantificação e análise, do grau de pureza (relação de absorbância de 260/280 nm) dos extratos de DNA, foram realizados em espectrofotômetro, após a diluição das amostras (1:50) em tampão TE. A integridade das moléculas de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) e corado com brometo de etídeo (0,5 ug/mL). A separação eletroforética foi realizada a 100V, por 45 minutos, com visualização das bandas de DNA em transiluminador sob luz ultravioleta.

Identificação das mutações e polimorfismos do gene da CETP

A presença das mutações de CETP no intron 14 (int14A) e no exon 15 (D442G) foi identificada como o descrito por INAZU *et al.* (1994), com algumas modificações. Os DNA genômicos de cada indivíduo (0,5-1 µg) foram amplificados por reação em cadeia pela polimerase (PCR), à qual foram adicionados 25 pmol de iniciadores específicos (*primers*), 5 U Taq DNA polimerase (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, EUA), 250 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTPs), 1 mM MgCl₂ e 10% de solução estoque de tampão 10X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), para um volume final de 25µL. Na PCR para a mutação no intron 14, além disso, foram adicionados 2,5% de DMSO e de glicerol.

A sequência normal da junção do exon 14/intron14 é 5'- GTCTCgtaagt - 3' (AGELLON *et al.*, 1990). A mutação é uma transversão de G → A na posição +1 do intron 14 (BROWN *et al.*, 1989). O defeito de processamento (GTA→ATA) foi detectado utilizando os seguintes iniciadores, *sense* e *antissense*, respectivamente 5'-AGCATCTGCCTTGTGGGT-3' e 5'-CACCCAGTTTCCCCTCCAGCCCACACATA-3' (INAZU *et al.*, 1994). A PCR foi realizada com 40 ciclos de desnaturação (95° C por 30 segundos), hibridação (65° C por 30 segundos) e polimerização (72° C por 30 segundos). O produto da PCR (10 µL) foi digerido com a enzima de restrição NdeI 5U (Fermentas, EUA), a 37°C, por 2 horas. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose NuSieve a 3% (FMC BioProducts, ME, EUA), e as bandas no gel visualizadas em transiluminador-UV, após coloração com brometo de etídio. Os fragmentos da digestão foram 138 bp e 28 bp para o alelo mutado e 166 bp para o alelo selvagem.

Na mutação *missense* D442G, ocorre substituição do aminoácido na posição 442 (de aspartato por glicina, GAC→GGC na posição 1506 do gene). A presença dessa mutação foi analisada utilizando um par de iniciadores *sense* e *antissense*, conforme a descrição de INAZU *et al.*, 1994; respectivamente, 5'- AGCAAAGGCGTGAGCCTCGTGG-3' e 5'-AGGAGGGAGCCAAGCTGGTAGA-3'. A PCR foi realizada com 40 ciclos de desnaturação (95° C por 30 segundos), hibridação (60° C por 1 minuto) e polimerização (72° C por 30 segundos). O produto da PCR foi digerido com 10 U da enzima Sal-I (Fermentas, EUA) a 37°C, por 6-8 horas. O produto da

digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 3% (Agarose 1000-Invitrogen, EUA) e os fragmentos da digestão foram 158 bp e 21 bp para o alelo mutado e 179 bp para o alelo selvagem.

O polimorfismo TaqIB da CETP foi identificado conforme a descrição de FUMERON *et al.* (1995). Um fragmento de 535 bp do intron 1 do gene da CETP foi amplificado pela PCR com os seguintes iniciadores, *sense* e *antissense*: 5'-CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC-3' e 5'-CTGAGCCCAGCCGCACACTAAC-3'. Para a amplificação foram utilizados 100 ng do DNA genômico, em um volume final de 50 µL contendo 40 pmol de cada oligonucleotídio, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris pH 8,4 e 0,25 U de Taq DNA polimerase. A PCR foi iniciada com a desnaturação a 95°C por 3 minutos. Posteriormente foram realizados mais 30 ciclos de desnaturação, a 95°C por 30 segundos, hibridação a 60°C por 30 segundos e polimerização a 72°C por 45 segundos. Finalmente, um ciclo de polimerização a 72°C por 5 minutos. O produto da PCR foi digerido a 65°C por 2 horas, com 4U de enzima de restrição TaqI, em solução tampão contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM MgCl₂; 50 mM NaCl. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio em tampão Tris-Borato-EDTA, durante 1h a 90V. Os fragmentos da digestão foram 174 e 361 bp para o alelo B1 e 535 bp para B2.

Para a determinação do polimorfismo I405V, um fragmento de 142 bp no exon 14 do gene da CETP foi amplificado pela PCR, com os seguintes iniciadores *sense* e *antissense*: 5'-TTGATTGCAGAGCAGCTCCGAG-3' e 5'-ACTTACGAGACATGACCTC-3'. Para a amplificação foram utilizados 100 ng do DNA genômico, em um volume de 50 µL contendo 40 pmol de cada oligonucleotídio, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris pH 8,4 e 0,25U de Taq DNA polimerase. A PCR foi iniciada com a desnaturação a 95°C por 5 minutos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto em um ciclo inicial, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C, por 15 segundos, hibridação a 60°C por 30 segundos e polimerização a 72°C por 30 segundos. Finalmente, polimerização a 72°C por 5 minutos. O produto amplificado de PCR foi digerido a 37°C durante 1 hora, com 2U de enzima de restrição MspI, em solução tampão contendo 50 mM Tris-HCl, em pH 8,0, 10 mM MgCl₂ e 50 mM NaCl.

O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio em tampão Tris-Borato-EDTA, por 1 h a 90V. Os fragmentos da digestão foram 121 bp para o alelo I e 21 bp para o alelo V (GUNADSON *et al.*, 1999).

Para garantir que não houve contaminação nos processos acima descritos, foi utilizado um controle negativo composto de um mix para cada conjunto de reação (contendo todos os reagentes, exceto DNA), amplificado junto com as reações teste.

7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* SAS. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para as análises de variância dos grupos e o teste t de Student para comparação entre os grupos. ANOVA foi utilizada para a comparação entre os genótipos.

A concentração de significância foi de 5% e para diferenças limítrofes, entre 5 e 8%.

4 - CAPÍTULO

CHARACTERIZATION OF THE INTRON 14 SPLICING DEFECT AND EXON 15 MISSENSE MUTATIONS OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN GENE IN HYPERALPHALIPOPROTEINEMIC BRAZILIAN INDIVIDUALS

Kaplan D¹, Schreiber R¹, Harada LM⁴, Oliveira HC², Nakamura R⁵, Pinheiro H³, Tentor J¹, Cruz MLY¹, de Faria EC¹

¹Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences; ²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology; and ³Department of Statistics, Institute of Mathematic, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, Brazil;

⁴Laboratory of Lipids, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil;

⁵Diagnostic Image Laboratory, Campinas, Brazil

Corresponding author:

Eliana Cotta de Faria, M.D., Ph.D.

Department of Clinical Pathology

Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, UNICAMP

Campinas, São Paulo, Brazil

Tel: (+55) 19-3788-9452 Fax: (+55) 19-3788-9434

E-mail: cotta@fcm.unicamp.br

Abstract:

In a previous study we demonstrated that in the Brazilian hyperalphalipoproteinemic (HALP) population, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) could be determined mostly by genetic components. In this study we investigated the frequency and prevalence of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene mutations (Int14A and D442G) as well as the metabolic characteristics and the cardiovascular disease risk in 152 HALP and 139 control subjects, defined as having HDL-C concentrations above or below the 90th percentile of a local population. The HALP group presented a diminished hepatic lipase (HL) and CETP activity, and an elevated lipoprotein lipase and phospholipid transfer protein activity. Six subjects were found with the Int14A mutation: one homozygote (HDL-C = 211 mg/dL and undetectable CETP activity) and five heterozygotes (mean $\pm$ SD, HDL-C = 79 ± 10 mg/dL and CETP activity = 10 ± 5 %). One subject was heterozygote for the D442G mutation (HDL-C = 75 mg/dL and CETP activity = 18%). The allele frequency of the Int14A and D442G mutations observed in this study was 0.023 and 0.0033, respectively. The homozygote for the Int14A mutation presented also low plasma HL activity, but no established cardiovascular disease, verified by clinical data and common carotid intima-media thickness (IMT). One heterozygote for the Int14A mutation presented established atherosclerosis, while the D442G carrier mutation presented an increased (32%) of IMT when compared to controls. HALP population was not associated with either mutations or with clinically established atherosclerosis.

Keywords: cholesteryl ester transfer protein; mutation; frequency; hyperalphalipoproteinemia; carotid intima-media thickness

Introduction

Epidemiologic studies have demonstrated an inverse association between high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol (HDL-C) and cardiovascular disease (CVD) (1, 2). One of the anti-atherogenic properties attributed to HDL is its participation in the reverse cholesterol transport (RCT) (3), involving free cholesterol efflux from cell membranes to nascent HDL, via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) (4) and the scavenger receptor type B class 1 (SR-B1) receptor (5). The removed cell cholesterol is esterified to cholesteryl ester (CE) by lecithin cholesterol acyltransferase, which then are transferred to apoB-containing lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein (CETP). Although CETP plays a crucial role in the RCT, its role in the atherogenesis remains controversial, since CETP increases the concentration of CE in low density lipoprotein (LDL) and very low density lipoprotein (VLDL) particles, as well as of potentially pro-atherogenic intermediate-density lipoproteins (IDL) (6, 7). On the other hand, HDL has several pleiotropic actions that are cardioprotective, including anti-oxidative, anti-inflammatory and antithrombotic effects (8), and also play an important role in the monocyte adhesion, smooth muscle cell proliferation and reduction of platelet aggregation (9).

Hyperalphalipoproteinemia (HALP) due to CETP gene mutations has been often found in Japanese population, and it is believed that these are responsible for 10% of HDL total variation among them (6). There are also reports of its occurrence in other Asiatic groups, in German and in Caucasian, but there are some controversies about the atherosclerotic repercussions in those populations (10, 11, 12).

In the Japanese population, the defect in the splicing of intron 14 (Int14A mutation) in the CETP gene presents a 1-2% prevalence (13). In the *Honolulu Study* where Nipo-American individuals were evaluated, the presence of mutation was 0.5% (10) and 0.7% in American HALP individuals (14). The missense mutation on the exon 15 (D442G) present a prevalence of 4.5-7%, among the Japanese population (13).

In a previous study we demonstrated that in the Brazilian hyperalphalipoproteinemic (HALP) population, the primary cause of high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) modulation could be determined mostly by genetic components (15). In this study we investigated for the first time the allelic frequency and

prevalence of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene mutations (Int14A and D442G) in a HALP Brazilian population, as well as the metabolic characteristics of the mutants and controls as well the associations between HALP and CVD risk.

Study Design

This study was conducted on 291 individuals (212 females and 79 males), aged 16 to 79 years old (52 ± 13), who were classified as control (CTL, $n = 139$, HDL-C below 68 mg/dL) or hyperalphalipoproteinemic (HALP, $n = 152$, HDL-C above or equal 68 mg/dL) according to the 90th percentile value obtained for the local population in a previous study (de Faria *et al.*, unpublished data). Severe HALP was defined by HDL-C levels equal or above 100 mg/dL, and moderate HALP by HDL-C between 68 and 99mg/dL (16).

The clinical and laboratorial criteria for exclusion were the presence of secondary causes of HALP such as: hepatic, renal, lung and endocrine (thyroid dysfunction, diabetes mellitus or glucose intolerance) diseases; chronic intake of alcohol and use of drugs affecting lipid metabolism.

Established CAD was defined as the occurrence of myocardial infarction and angina pectoris verified by electrocardiogram, cardio-specific enzyme and coronary angiography, or history of coronary angioplasty or coronary bypass surgery. DCV was defined by coronary artery bypass grafting and percutaneous transluminal coronary angioplasty, stroke, transient ischemic attack and peripheral arterial disease. The protocol was approved by the local medical faculty ethics committee and all subjects gave informed consent.

Biochemical Measurements

Plasma glucose, urea, uric acid, alanine aminotransferase and gama-glutamyltransferase were assayed by enzymatic reaction in an automated system (Mega-Bayer, Germany). Thyroid-stimulating hormone (TSH) was measured by electrochemiluminescence, using a commercial kit in the Elecsys (Roche, Germany).

Lipids, apolipoproteins and lipoprotein analysis

Total plasma cholesterol and triglycerides were determined using enzymatic methods and reagents provided by Merck in an automated system (Hitachi 917 Roche, Germany). Plasma HDL-C was measured by a direct homogeneous method (17). HDL₂ and HDL₃ fractions were obtained by sequential microultracentrifugation (Airfuge, Beckman, USA) (18). The low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) was obtained directly using the enzymatic-colorimetric homogeneous method (Hitachi 917 system; Roche, Germany). Apolipoproteins AI and B100 and lipoprotein (a) were measured by nephelometric assay in the Array 360 system (Beckman Instruments, USA) and the Dade Boehringer system (Boehringer, Germany).

Determination of transfer proteins and lipases

The activity of plasma CETP was measured by an exogenous assay that measures the transfer of radiolabelled cholesteryl ester between a normal donor pool of [¹⁴C] cholesteryl ester-HDL and an unlabelled acceptor mixture of VLDL plus LDL with the plasma as the CETP source. The results were expressed as a percentage of cholesteryl ester transferred from HDL to apoB-containing lipoproteins (VLDL+LDL) in 4h (19).

The activity of plasma phospholipid transfer protein (PLTP) was measured by an exogenous radiometric method using phospholipid liposomes as the substrate and a HDL pool obtained from health plasma donors as the acceptor (20). The activity was expressed as the rate of phospholipid transferred to HDL in one hour.

Lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL) activities were measured in post-heparin plasma samples on the basis of fatty acid release (21), using a radiolabelled triolein emulsion as the substrate and NaCl (1M) as the LPL inhibitor. The results were expressed as nmol of non-esterified fatty acid (NEFA). mL⁻¹. h⁻¹.

The assays for CETP, PLTP and lipases were carried out in triplicate. The inter-assay coefficients of variation were 12%, 2%, 9% and 8% for CETP, PLTP, LPL and HL, respectively.

Molecular Analysis

The genomic DNA was extracted from the peripheral leukocytes according to Salazar *et al.* (22) method. For identification of the Int14A mutation, the DNA amplifications were performed by PCR and primers used were based on previously published sequences 14IA and 14IB29 by Inazu *et al.* (13) (5'-AGCATCTGCCTTGTGGGT-3' and 5'-CACCCAGTTTCCCCTCCAGCCCACACATA-3'). The following PCR conditions were used: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 65°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s for a total of 40 cycles. After digestion of the PCR products with 10 U of restriction enzyme Nde-I (Invitrogen, USA), the fragments of 166 bp and 138 bp were generated for the wild-type and mutant allele, respectively.

For the exon 15 *missense* mutation a Sal-I site-creating forward primer E15AA and 15IB were used (5'- AGCAAAGGCGTGAGCCTCGTCG-3' and 5'-AGGAGGGAGCCAAGCTGGTAG A-3') (13). After the digestion with Sal-I (Invitrogen, USA), the PCR products of the wild-type and mutant allele generate fragments of 179 bp and 158 bp, respectively. All samples were electrophoresed through a 3% agarose 1000 (Invitrogen, USA) gel, stained with ethidium bromide and visualized by ultraviolet light on Gel DOC System 1000 (Bio-Rad, USA).

Ultrasonic carotid procedures

The ultrasonic carotid procedures were performed by the same radiologist, using an ultrasound imager ATL HDI 1500 and 3500 Ultrasound System (Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA), and Logic 400 (General Electric Healthcare, Milwaukee, EUA). The IMT was calculated as the mean of five measurements, on each side in the far wall from the left and right common carotid arteries, according to a standardized method (23, 24). The results are expressed as an average of left and right carotid IMT in mm.

Statistics

The statistical package SAS was used to analyze the data. The Student's *t* test and the Chi-Square test for categorical variables were used for comparisons. The general association test was used to determine the association of the mutations with specific variables. The significance level chosen was 5%.

Results

Table 1 summarizes clinical and biochemical characteristics of the study subjects. HALP individuals were older, with an average 10-year gap between the groups ($P < 0.0001$). The HALP group was comprised of 128 females and 24 males (2.5 / 1), with an age range of 39-65 years. Their HDL-C levels were 1.5-fold higher than the controls, with an average of 82 mg/dL and ranging from 71-93 mg/dL, indicating the characteristics of moderate HALP. HDL₂-C and HDL₃-C were higher in HALP but the HDL₂-C / HDL₃-C ratio did not differ between the groups. No differences were observed for TG levels between HALP and controls, but the HDL₃-TG was higher in HALP patients ($P < 0.0007$), as well as a discrete elevation of LDL-C levels was noticed ($P = 0.0041$). In HALP, the plasma activities of CETP ($P < 0.0001$) and HL ($P < 0.0001$) were significantly lower than in CTL group (1.3-fold and 1.6-fold, respectively) and the activities of LPL ($P = 0.0211$) and PLTP ($P = 0.0115$) were 1.2-fold higher.

The **Figure 1** and **2** present, respectively, the PCR products showing the fragments lengths after enzyme digestion for CETP Int14A mutation (wild type = 166 bp and mutant allele = 138 bp) and D442G mutation (wild type allele = 179 bp and mutant allele = 158 bp). These mutations were found in the HALP group, and there were six Int14A mutants (one homozygote and five heterozygotes) and one D442G mutant (heterozygote).

The distribution of CETP mutation in the studied population is presented in **Table 2**. The allele prevalence of the mutation for Int14A and D442G were 4.0% and 0.7%, respectively, and the allele frequencies were 0.023 and 0.0033 for these mutations. The frequency distributions of genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium, except for Int14A ($P = 0.0003$).

The **Table 3** presents the plasma lipid profile and CETP, LPL, HL and PLTP activities, and the carotid IMT of the CETP Int14A and D442G mutation carriers. The small number of mutant individuals did not allow a complete statistical analysis, but the relative differences from measurements in controls were made as below. The mutation carriers showed a reduction on plasma CETP (36%) and HL (26%) activities, and an increasing of PLTP (67%) and LPL (117%) activities. Cholesterol levels were increased in 29%, HDL-C in 83%, with its fractions increased in 42% (HDL₂-C), 100% (HDL₃-C) and 25% of HDL₃-TG. The homozygote for the Int14A mutation was the only mutant with severe HALP, presenting HDL-C levels of 211 mg/dL, but one heterozygous Int14A carrier presented borderline HDL-C for the established limits to HALP, determined in different occasions. Carotid IMT (average of all carriers) also showed an increasing of 28% comparing carriers to controls (0.56-0.97 and 0.65 ± 0.16 mm, respectively). There were no associations of the mutations int14A and D442G with HALP (respectively $P = 0.4713$ and $P = 0.2120$), or with the presence of clinical atherosclerosis ($P = 0.59549$ and $P=0.4030$).

Two of the heterozygous Int14A carriers were family related, and three were not. One of these carriers, a young person (29 years old) presented at the physical examination the corneal archus, a previous personal history of myocardial ischemia and family history of stroke. Two other heterozygotes had positive family history for stroke. The only homozygous individual (61 years old) had also positive family history for stroke, with a median familiar longevity of fifty five years. This carrier presented undetectable activity of CETP and the lowest level of HL, the TG levels slight elevated, a HDL-C severely increased and no signs of commitment of cardiovascular profile. The only one heterozygote carrier for D442G mutation (74 years old) did not present personal or family history of CVD, but his IMT was the highest one.

Discussion

In our previous study (15), Brazilian HALP individuals were characterized by higher levels of HDL-C, HDL₂-C and ApoAI, with reduction of HL levels and an elevated LPL activity. Analyzing the existence of compensatory mechanisms and the influence of the environmental factors, we suggested that genetic components were probably the primary cases of HDL modulation in this HALP group.

The Brazilian population is characterized by extensive racial miscegenation. Therefore, the allele frequency of the Int14A mutation in this study was lower (0.023%) than previously stated in Caucasians (0.7%) (14) and in the Japanese population (25). On the other hand, the prevalence obtained for D442G mutation in our study was, as expected, far lower (0.7%) than that reported for the Japanese population in general (4.5-7%) (10) and above 18% of those with HALP (25).

The relationship between homozygotes and heterozygotes subjects in genetic CETP deficiency and CVD prevalence is not yet well defined. A recent prospective epidemiologic study was performed and showed that an association between lower levels of CETP mass are in fact associated with both increased HDL-C levels and reduced CAD risk (10, 13, 26, 27).

The prospective analysis results from the *Honolulu Heart Study* did not show any significant correlation between heterozygotes for CETP gene mutations and CVD or cerebrovascular diseases (28). It has been found that in CETP deficient patients with a HDL-C > 100 mg/dL and without risk factors, an increased atherosclerotic plaque formation and a low flow pulse rate, suggesting a pro-atherogenic condition (27). The negative cardiovascular effects of heterozygous CETP deficiency seems to predominate over the homozygous as shown by Inazu *et al.* (25) with premature CHD verified in 44 individuals, possibly due to the prevalence of the anti-atherosclerotic protection effect of the highest levels of HDL-C. Reinforcing this hypothesis there is the fact that among five Int14A heterozygotes in this study, one (29 years old) presented established CAD, with corneal archus and myocardial ischemic disease, but the one homozygote described did not suffer from CVD. Also the family history was positive for stroke in three Int14A heterozygotes.

The consequences of CETP deficiency may depend on a range of genetic and environmental factors that impact on the concentration of HDL. Clinical studies, in a small number of subjects with Japanese CETP deficiency, suggested that the phenotype of increased HDL-C and relatively low apoB-containing lipoproteins is anti-atherogenic, because of the rarity of CHD in these families (29). It is important consider the beneficial properties of HDL itself, such antioxidative, antithrombotic and anti-inflammatory effects.

Besides, some studies suggest that this situation may be pro-atherogenic despite the increased levels of HDL-C (30).

Considering all mutation carriers in the present study (7 individuals), they showed a higher HDL-C concentration (83%), LPL activity (11%) and a PLTP activity (67%), while the CETP activity (36%) and HL activity (26%) were below the average in controls. Curiously, the homozygote for Int14A mutation had HL activity below the reference interval (2.5 and 97.5 percentiles of CTL) suggesting a double gene defect, like was described for Hirano *et al.* (11). On the other hand, the D442G carrier presented CETP, LPL, HL and PLTP activities closer to the values in the control group, as described by Tall *et al.* (31).

These variations of the transfer proteins and lipases were also verified by other authors. Hirano *et al.* (11) showed that in patients with double deficiency of CETP and HL there is an absence of TG levels increment and accumulation of remnants of lipoproteins. The deficiency of HL generates HDL rich in TG, which is a good substrate for LPL which in turn would act in chylomicrons and VLDL, stimulating the clearance of TG (32). This data could explain the finding of normotriglyceridemia and the increase of HDL₃-TG and LPL in our HALP group.

The Int14A mutation carrier had elevated TG levels and presented complete deficiency of CETP activity, while the other mutation carriers had a diminished CETP activity. The presence of a slight reduction of CETP and HL activities and elevated activity of LPL, may explain why the HDL in our HALP group presented TG enrichment, coexisting with normal TG levels. Additionally, these patients could be carriers of the HL gene polymorphisms that were not investigated in this work (33, 34).

The functional alterations of the CETP gene (35, 36) would explain variations in the IMT of our population. The low number of patients with CETP mutations and the differences in age made difficult to establish the prevalence of DAC or changes of their longevity. The IMT performed in this study was similar between HALP and CTL, and the lowest IMT were found in the related homozygote and heterozygote carriers of the Int14A mutation (0.61 mm and 0.56 mm, respectively). However, the increased IMT observed in one heterozygote D442G corroborates with some previous findings (16), although the patient was older than the average CTL group.

In summary, in this study the HALP phenotype was characterized by a lower CETP and HL activities and higher LPL and PLTP activities, but there was not an association with the CETP gene mutations studied. The HALP mutant individuals showed similar frequency of clinical atherosclerosis and similar IMT in relation to controls, although some individuals presented clinical signs of CVD and a higher IMT individual value. Nevertheless, these results can not exclude the possibility of HALP condition in this population does not ensure the effective cardioprotection to the mutation carriers. Complementary studies should be done to amplify the investigation over other mutations of CETP, HL and / or LPL, and therefore to establish a relationship between HALP and atherosclerosis in this population.

Acknowledgements

The excellent technical assistance of Aparecida Pereira and Mirian Danelon is acknowledged as well as the support from Prof^a Dr^a Edna Nakandakare and the Laboratory of Lipids, University of São Paulo Medical School. This work was supported in part by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Universidade de Campinas (FAEP) and Coordenadoria de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

References

1. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RL, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD *et al*: High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: Four prospective American studies. *Circulation* 1989; **79**: 8-15.
2. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apoproteins and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991; **325**: 373-381.
3. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, **21**:13-27.
4. Oram J F, Vaughan AM, Stocker R. ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of α -tocopherol. *J. Biol. Chem* 2001, **276**: 39898-39902.
5. Acton S, Rigotti A, Landschulz K T, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high-density lipoprotein receptor. *Science* (Washington, D.C.) 1996, **271**: 518-520.
6. Yamashita S, Maruyama T, Hirano K, Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2000; **152**: 271-285.
7. Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein, high density lipoprotein and arterial disease. *Curr Opin Lipidol* 2001, **12**: 377-382.
8. Barter PJ, Nicholls S, Rye K-A, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004, **95**:764-772.
9. O'Connell BJ, Genest J Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 2001, **104**:1978-1983.
10. 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. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2687-2688.

11. Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, *et al*: Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**:1849-1856.
12. Inazu A, Brown ML, Hesler CBO, *et al*: Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990; **323**: 1234-1238.
13. Inazu A, Jian XC, 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. *J Clin Invest* 1994; **94**: 1872-1882.
14. Hill SA, Nazir DJ, Jayaratne P, Bamford K S, McQueen M J. Mutations in cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase in a North American population. *Clin Biochem* 1997; **30**: 413-418.
15. Alarcon SB, Oliveira HC, Harada LM, Nunes VS, Kaplan D, Quintao EC, *et al*: Moderate hyperalphalipoproteinaemia in a Brazilian population is related to lipoprotein lipase activity, apolipoprotein A-I concentration, age and body mass index. *Clin Sci* 2004; **106**:11-7.
16. Nagano M, Yamashita S, Hirano K. *et al*. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese. *J. Atheros. Thromb* 2004, **11**: 110-121.
17. Nauck M, März W, Jarausch J, Cobbaert C, Sagers A, Bernard D *et al*: Multicenter evaluation of a homogenous assay for HDL- cholesterol without sample pretreatment. *Clin Chem* 1997; **43**: 1622-1629.
18. Bronzert TJ and Brewer HB, Jr. New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fractions. *Clin Chem* 1977; **23**: 20890-20898.
19. 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.

20. Damen J, Regts J, and 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.
21. Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1986; **129**: 716-738.
22. 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. *RBAC* 2001; **33**: 111-116.
23. Carallo C, Irace C, Pujia A, De Franceschi MS, Crescenzo A, Motti C *et al*. Evaluation of common carotid hemodynamic forces. Relations with wall thickening. *Hypertension* 1999; **34**: 217-221.
24. Espeland MA, Craven TE, Riley WA, Corson J, Romont A, Fuberg CD. Reliability of longitudinal ultrasomographic measurements of carotid intima-media thicknesses. *Stroke* 1996; **27**: 480-485.
25. Inazu A, Koizumi J, Haraki T, Yagi K, Wakasugi T, Takegoshi T *et al*: Rapid detection and prevalence of cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by an intron 14 splicing defect in hyperalphalipoproteinemia. *Hum Genet* 1993; **91**: 13-16.
26. Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, *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. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 1997; **17**: 1053-1059.
27. Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 2000, **11**: 589-596.
28. Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL, *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. *J Lipid Res* 2004; **45**: 948-953.

29. Koizumi J, Mabuchi H, Yoshimura A, *et al*: Deficiency of serum cholesteryl ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1985; **58**:175-186.
30. Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; **11**: 389-396.
31. Tall, A. R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 1993; **34**:1255-1274.
32. Homanics GE, De Silva HV, Osada J, Zhang SH, Wong H, Borensztajn J, *et al*: Mild Dyslipidemia in mice following targeted inactivation of the hepatic lipase gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 2974-2980.
33. Brunzell J, Deeb S. Familial lipoprotein lipase deficiency, apo CII deficiency, and hepatic lipase deficiency. In: Scriver, C.; Beaudet, A.; Sly, W.; Vale, D., editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill Book Co; 2001, 2789-2816.
34. Zambon A, Deeb SS, Pauletto P, Crepaldi G, Brunzell JD. Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr Opin Lipidol* 2003; **14**: 179-189.
35. Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurol* 2004; **3**: 227-235.
36. Kakko S, Tamminen M, Paivansalo M, Kauma H, Rantala AO, Lilja M *et al*: Variation at the cholesteryl ester transfer protein gene in relation to plasma high density lipoproteins cholesterol levels and carotid intima-media thickness. *Eur J Clin Invest* 2001; **31**: 593-602.

Table 1 - Clinical and biochemical characteristics of hyperalphalipoproteinemics and controls subjects.

Parameters	HALP (n = 135-152)	CTL (n = 112-139)	<i>P values</i>
Age (years)	52 ± 13	42 ± 15	<0.0001
Sex (F/M)	128 / 24	84 / 55	0.0050
Body mass index (kg/m ²)	25 ± 5	25 ± 4	NS
Waist circumference (cm)	81 ± 13	80 ± 10	NS
Systolic pressure (mmHg)	126 ± 16	122 ± 14	0.0371
Diastolic pressure (mmHg)	81 ± 11	80 ± 10	NS
Cholesterol (mg/dL)	228 ± 41	186 ± 48	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	91 ± 39	93 ± 46	NS
LDL-C (mg/dL)	128 ± 37	115 ± 40	0.0041
HDL-C (mg/dL)	82 ± 11	53 ± 10	<0.0001
HDL ₂ -C (mg/dL)	19 ± 5	12 ± 6	<0.0001
HDL ₃ -C (mg/dL)	60 ± 10	40 ± 10	<0.0001
HDL ₂ -TG (mg/dL)	9 ± 5	8 ± 5	NS
HDL ₃ -TG (mg/dL)	24 ± 10	20 ± 10	<0.0007
ApoA1 (mg/dL)	191 ± 34	146 ± 31	<0.0001
ApoB100 (mg/dL)	102 ± 27	94 ± 32	0.0253
Lp(a) (mg/dL)	36 ± 35	28 ± 31	0.0454
CETP (%)	11 ± 7	14 ± 8	<0.0001
PLTP (%)	18 ± 11	15 ± 10	0.0115
LPL (nmol FFA/mL/h)	2,768 ± 1,670	2,344 ± 1,201	0.0211
HL (nmol FFA/mL/h)	1,502 ± 967	2,466 ± 1,470	<0.0001

Data as mean ± SD. F/M = female/male; C = cholesterol; TG = triglycerides; Apo = apolipoprotein; Lp(a) = lipoprotein (a); CETP = cholesteryl ester transfer protein; PLTP = phospholipid transfer protein; LPL = lipoprotein lipase ; HL = hepatic lipase; FFA = free fatty acid. Comparisons between HALP and CTL, NS = not significant.

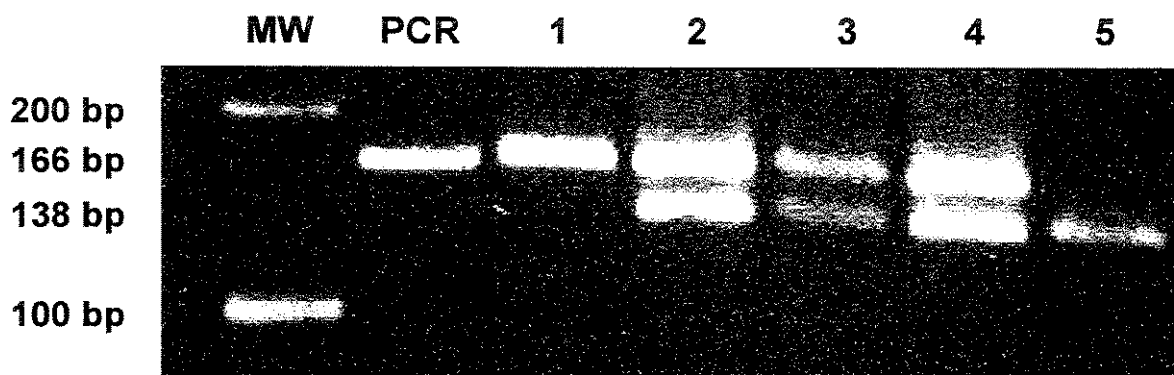


Figure 1 - PCR digestion assay of CETP Int14A mutation using Nde-I on 3% agarose 1000 gel: lane 1 = wild type (166 bp); lanes 2, 3 and 4 = heterozygote individuals (166 and 138 bp); lane 5 = homozygote individual (138 bp); MW = molecular size marker; PCR = amplification product of undigested fragment.

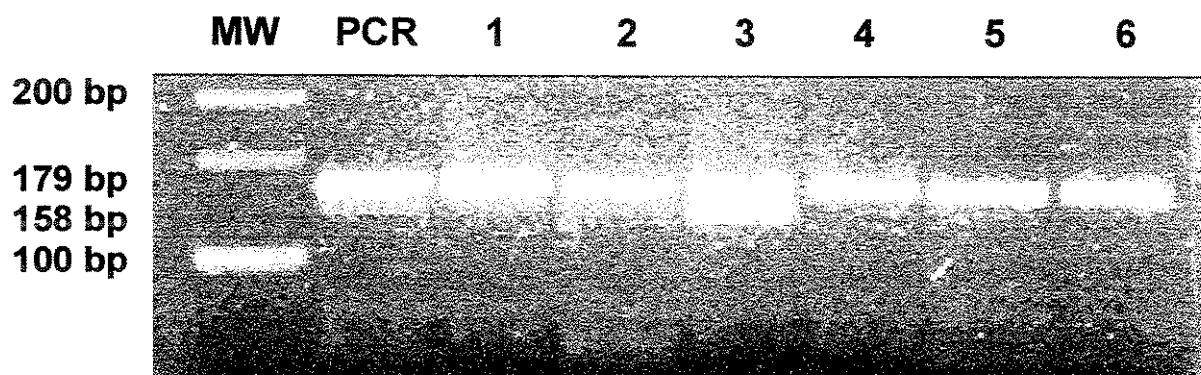


Figure 2 - PCR digestion assay of CETP D442G mutation using Sal-I on 3% agarose 1000 gel: lanes 1, 2, 4, 5 and 6 = wild type (179 bp); lane 3 = heterozygote individual (179 and 158 bp); MW = molecular size marker; PCR = amplification product of undigested fragment.

Table 2 - Prevalence and frequency of Int14A and D442G cholesteryl ester transfer protein gene mutations in hyperalipolipoproteinemic individuals (n = 152).

CETP mutation	Allele prevalence	Allele frequency
Intron 14A		0.023
Heterozygote	3.3% (5)	
Homozygote	0.7% (1)	
Exon 15 (D442G)		0.0033
Heterozygote	0.7% (1)	
Homozygote	0	
Any CETP mutation	4.6% (7)	

() = number of mutation carriers

Table 3 - Clinical and biochemical individual characteristics of CETP gene mutation carriers.

Parameters	Int 14A Homo		Int 14A Hetero				All Int 14A hetero* (n=5)	D442G Hetero	All mutation carriers* (n=7)	Controls* (n=81-139)
Age (years)	61	46	52	68	33	29	46 ± 5	73	52 ± 15	42 ± 15
Cholesterol (mg/dL)	360	210	188	240	238	251	225 ± 25	194	240 ± 58	186 ± 48
Triglycerides (mg/dL)	220	94	62	78	152	181	113 ± 50	66	122 ± 62	93 ± 46
LDL-C (mg/dL)	105	127	91	137	126	126	121 ± 17	105	117 ± 16	115 ± 40
HDL-C (mg/dL)	211	68	79	87	78	89	79 ± 10	75	97 ± 50	53 ± 10
HDL ₂ -C (mg/dL)	36	21	24.5	24.5	17.5	17.5	21 ± 4	14	17 ± 7	12 ± 6
HDL ₃ -C (mg/dL)	175	58	69.36	62.5	61.2	65.28	58 ± 5	57	81 ± 46	40 ± 10
CETP (%)	0	6.6	16.4	13.3	6.2	5.1	10 ± 5	18	9 ± 5	14 ± 8
PLTP (%)	40	22	43	24	13	19	20 ± 15	5	24 ± 14	15 ± 10
LPL (nmol FFA/mL/h)	745	1,247	3,331	3,290	2,936	2,957	2,752 ± 861	3,646	2,593 ± 112	2,344 ± 1,201
HL (nmol FFA/mL/h)	237	1,081	1,923	1,322	2,952	2,913	2,038 ± 872	2,278	1,815 ± 995	2,466 ± 1,470
Carotid IMT (mm)	0.61	0.60	0.76	0.84	0.66	0.56	0.69 ± 0.09	0.97	0.72 ± 0.13	0.65 ± 0.16

CETP = cholesteryl ester transfer protein; PLTP = phospholipid transfer protein; LPL = lipoprotein lipase; HL = hepatic lipase; IMT = intima-media thickness. * Data as mean ± SD.

PREVALENCE OF POLYMORPHISMS TaqIB AND I405V OF THE CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN GENE IN A BRAZILIAN POPULATION AND THEIR RELATIONSHIPS TO ATHEROSCLEROSIS

Kaplan D¹, Santos JE², Harada LM³, Oliveira HC⁴, Nakamura RT^{1,5}, Pinheiro HP⁶, Gidlund M⁷, de Faria EC¹

Departments of Clinical Pathology¹, Faculty of Medical Sciences, Physiology and Biophysics, Institute of Biology⁴ and Statistics, Mathematics, Statistics and Computer Institute⁵, University of Campinas, São Paulo⁶; University of São Paulo Medical School, Ribeirão Preto², Laboratory of Lipids³, University of São Paulo Medical School, São Paulo; Diagnostic Image Laboratory⁵, Campinas; Laboratory of Immunophysiopathology, ICB-USP, São Paulo and IMT-SP⁷, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Eliana Cotta de Faria, M.D., Ph.D.

Department of Clinical Pathology

Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas UNICAMP.

Campinas, São Paulo, Brazil

Tel: 37889452 Fax: 37889434 E-mail: cotta@fcm.unicamp.br

This work was supported in part by grants from *the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, *Fundo de Apoio à Pesquisa da Universidade de Campinas (FAEP)*, *São Paulo*, and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES)*, Brazil.

Abstract

Objective: In order to investigate the effects of cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms TaqIB and I405V on early atherosclerosis a low-density lipoprotein oxidation biomarker, the activity of regulatory proteins, lipid and lipoproteins parameters and common carotid intima-media thickness were determined in a Brazilian population.

Methods and results: Two hundred and ninety-four healthy volunteers, aged from 16 to 79 years old were enrolled in this study. After an overnight fast, blood samples were collected for several laboratory analysis. Similarly to other studies the more prevalent genotypes were B1B2 TaqIB, 45% and IV I405V, 49%. The waist circumference and age were higher in genotype IV I405V carriers. When the genotypes on each polymorphism were compared, B1B2 showed higher Lp (a) levels than others. Genotype II showed lower concentrations of HDL-C and IV higher ApoAI than others. CETP activity was higher in B1B1 and lower in B2B2 of TaqIB carriers and higher in II of I405V. PLTP activity was higher in II genotype. No differences on lipoprotein lipase and hepatic lipase activities of were observed among the genotypes. The common carotid intima-media thickness was accessed by ultrasonography and autoantibodies to epitopes of oxidized LDL were determined in a sub-group of participants. The last were reduced in VV and in B2B2 and higher carotid intima-media thickness was found in genotype B2B2. The frequency of cardiovascular disease was similar among the genotypes.

Conclusions: Suggestive of different prevalence of atherosclerosis the studied CETP genotypes of the TaqIB and I405V polymorphisms elicited different plasma lipids, lipoproteins, apolipoproteins, autoantibodies to oxidized LDL epitopes and carotid intima-media thickness.

Keywords: High-density lipoprotein; Cholesteryl ester transfer protein; polymorphisms, Hepatic lipase; Lipoprotein lipase; Phospholipid transfer protein; coronary artery disease

Introduction

Cholesteryl ester transfer protein (CETP) participates in the reverse cholesterol transport (RCT), facilitating the exchange of cholesteryl ester (CE) and triacylglycerol (TG) among lipoproteins, and promoting net transfer of CE to apoB containing lipoproteins. This fact increases the cholesterol concentration of low-density lipoproteins (LDL) and very low-density lipoproteins (VLDL), and potentially of the pro-atherogenic intermediate-density lipoproteins (IDL); but CETP also distributes the cholesterol to these lipoproteins that are rapidly cleared by the liver. Thus, the issue of the atherogenicity of CETP is very controversial (1). Other proteins that participate in RCT are: phospholipid transfer protein (PLTP), hepatic lipase (HL) and lipoprotein lipase (LPL).

There is a lot of interest in understanding the role of CETP polymorphisms in modulating atherosclerosis (1). Associations between these polymorphisms and small changes in plasma CETP and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels were demonstrated (2) but the relation between these polymorphisms and susceptibility to atherosclerosis is variable and not well known (3).

TaqIB and I405V polymorphisms have been researched frequently. In TaqIB polymorphism, a silent base exchange occurs in the 277 nucleotide, on the first intron of the CETP gene. In I405V polymorphism, the amino acid isoleucine is substituted by valine at the position 405 of the exon 14 of the gene (4).

The frequency of TaqIB B2B2 in Asian and Caucasian populations was reported as 0.38 to 0.45 and equal to 0.26 in Afro-Americans (5). The frequency of the rare V405 allele was 0.28 in different regions of Europe (6).

TaqIB polymorphism has been extensively associated with high HDL-C levels although without direct effects on CETP concentration or activity (7). It has been reported that TaqIB is associated with 5.8% of HDL-C variability in healthful Spanish population (8) and with 1% in the *Framingham Offspring Study* (2).

The cardioprotection of B2 allele in males is probably due to associations with higher HDL-C levels and not because of CETP mass or activity (9). On the other hand, the B1 allele presents an increased CETP and a greater cardiovascular heart disease (CHD) risk

(10). In some studies no such association was found (11). It was verified that the LDL diameter did not differ between cases and controls and, therefore, did not represent a significant risk factor (12).

The I405V polymorphism affects the primary structure of CETP but not the plasma CETP mass (13). The *Honolulu Study* (14) showed lower levels of CETP, higher HDL-C as long as TG concentrations were above 165 mg/dL and an association with CHD of the VV genotype in men. Some studies did not show differences in the lipid profile of these subjects (15).

In the *Copenhagen City Heart Study*, homozygotic and heterozygotic women with V allele showed a paradoxical positive relationship between high levels of HDL-C and CHD prevalence (16). On the other hand Paullaud *et al.* (17) reported an increase in the carotid intima-media thickness (IMT) in men.

The influence of some risk factors should be taken into account as modulators of the polymorphism effects, like the use of cigarette-smoking (7, 18), heavy alcohol consumption (19) and insulin resistance in obese patients (20). The TG can modulate the CE transfer rate in plasma (21) and a positive association between CETP and HDL-C was seen only in hypertriglyceridemic, but not in normotriglyceridemic subjects (22).

The available data generally support the hypothesis that the CETP deficiency, especially when associated with a high HDL-C level, is antiatherogenic. Nonetheless there are studies suggesting that atherosclerosis is increased in some individuals with a heterozygous CETP deficiency but this may reflect small sample sizes, confusion by other risk factors or biases inherent to the study design (3).

In this study we described the frequency of two CETP polymorphisms in a Brazilian population, analyzed their repercussion on anthropometric measurements, on several serum parameters involved in the metabolism of the plasma lipids and lipoproteins, on some atherosclerosis markers and on the presence of established disease.

Study Design

This study was conducted on 294 volunteers, aged from 16 to 79 years old, and consisted of 217 women and 77 men. They were normolipidemic according to the *National Cholesterol Expert Panel recommendations* (NCEP) (23). The criteria for exclusion of the protocol were such as: hepatic, renal, lung and endocrine pathologies; diabetes mellitus or glucose intolerance; chronic intake of alcohol and continuous use of medications. Established cardiovascular disease (CVD) was defined as the occurrence of one or more of the following events: one or more myocardial infarctions, coronary artery bypass grafting, percutaneous transluminal coronary angioplasty, stroke, transient ischemic attack and peripheral arterial disease. The individuals were attended at the Outpatient Clinic for Dyslipidemia, Faculty of Medical Sciences, H.C. - UNICAMP. Their personal as well as family histories were recorded and they underwent a complete physical examination. The participants were considered as without atherosclerotic disease, since all the above cited parameters were negative. Blood samples were taken after a 12 hour period of fasting and were performed in two steps: in the first step 10-15 mL of blood (basal) and then 4 mL of blood were collected after heparin administering (100 UI/kg of weight, I.V.), to determine total and hepatic lipase (24). Some measurements were performed in a sub-group of individuals: common carotid intima-media thickness and autoantibodies to epitopes of oxidized LDL. This study received the approval of the Research Ethics Committee at the Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, SP, Brazil.

Biochemical Analysis

Serum cholesterol, TG and lipoprotein sub-fractions were determined by the enzymatic-calorimetric methods using an automated Roche-Hitachi 917 analyzer (Roche Diagnostic Systems Inc., USA). HDL-C was measured by a direct homogeneous method (25).

HDL sub-fractions (HDL₂ and HDL₃) were obtained after sequential microultracentrifugation of the supernatant obtained after precipitation of apoB containing lipoprotein, in a Beckman microultracentrifuge Airfuge / 75B (Palo Alto, USA) (26). The

low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) was obtained directly using the enzymatic-colorimetric homogeneous method in the automated BM Hitachi 917 system (Roche, Basel, Swiss) (27). The serum concentrations of the apolipoproteins AI (apoAI), apoB100 and lipoprotein (a) (Lp(a)) (28) were determined by immunologic reactions using commercial kits in the Dade Boehringer System (Boehringer, Germany).

CETP and PLTP Activities

The CETP activity was measured by an exogenous assay that measures the transfer of radiolabelled cholesteryl ester between a normal donor pool of [^{14}C]-cholesteryl ester-HDL and an unlabelled acceptor mixture of apoB-containing lipoproteins (VLDL plus LDL) with the plasma as the CETP source. The results were expressed as a percentage of cholesteryl ester transferred from HDL to apoB-containing lipoproteins (VLDL plus LDL) in 4-hour incubation period at 37°C (29).

The PLTP activity was measured by radiometric exogenous assay through the transfer of the [^{14}C]-phosphatidylcholine from liposomes to the HDL in the presence the plasma of the patient as the source of PLTP at 37°C for one hour (20).

Lipases Activities

Lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL) activities were measured in post-heparin plasma samples on the basis of fatty acid release (24), using a radiolabelled triolein emulsion as the substrate and NaCl (1M) as the LPL inhibitor. The results were expressed as nmol of non-esterified fatty acid (NEFA). $\text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

The assays for CETP, PLTP and lipases were carried out in triplicate. The inter-assay coefficients of variation were 12%, 2%, 9% and 8% for CETP, PLTP, LPL and HL, respectively.

Autoantibodies to epitopes of oxidized LDL

The autoantibodies to epitopes of oxidized LDL (anti-ox-LDL) were measured by ELISA in a sub-group of participants, after the samples were incubated with copper-oxidized LDL (31), and the optical density (OD) was read at 460 nm. The results were presented as percentage of the OD readings relative to the group ranked values.

Ultrasonic carotid procedures

The ultrasonic carotid procedures were performed in a sub-group of participants by the same radiologist using an Advanced Technology Laboratories (Bothell, USA) ultrasound imager with a 7-12 MHz color doppler probe. The protocol comprised the study of both common carotid arteries. The carotid intima-media thickness (IMT) was calculated as the mean of five measurements on each side in the far wall from the left and right common carotid arteries according to a standardized method (32). The individual results were expressed as an average of left and right carotid IMT.

Molecular Analysis:

The genomic DNA from the peripheral leukocytes was extracted according to the micromethod developed by Salazar *et al.* (33). The identification of CETP TaqIB polymorphism was performed by PCR as described by Fumeron *et al.* (19).

The DNA amplification was performed using 100 ng of genomic DNA in a volume of 50 μ L containing 50 pmol of each primer (forward: 5'-CACTAGCCCAGAGAG AGGAGTGCC-3', and reverse:5'- CTGAGCCCAGCCGCACACTAAC-3', 535 bp), 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, and 0.2U of Taq DNA polymerase (Gibco BRL, USA). The PCR reaction consisted in 30 cycles of 30 s of denaturation at 94°C, 30 s of annealing at 60°C, and 60 s of elongation at 72°C, and and final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were digested with 5 U of TaqI (Gibco BRL, USA) at 65°C for 3 h, and the lengths of the fragments obtained were 174 and 361 bp (fig 1).

The determination of CETP I405V polymorphism was performed as described by Gunadson *et al* (6). The fragments encompassing the polymorphic sites were amplified by PCR. The reaction mixture consisted of 100 ng of genomic DNA in a volume of 50 µL containing 50 pmol of each primer (forward: 5'-TTGACT GCAGGAAGCTCTGGC- 3'; reverse: 5'-TATTTTTTTCACGGATGGGCA-3', 142 bp), 0.2 mM of each dNTP; 1.5 mM of MgCl₂; 0.2U of *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL, USA). The PCR conditions were 95°C for 5 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min for one cycle, and subsequently 35 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s, and finally at 72°C for 5 min. The PCR products were subject to restriction enzyme analysis by digestion with 2 U of the restriction endonuclease MspI (New England Biolabs, UK) for 8 µL of the PCR sample at 37°C for 1 h, and the length cut of 121 bp and 21 bp were found in the presence of the less common V allele (fig. 2).

Statistics

The statistical package SAS was used to analyze the data. One way ANOVA and the Student's t test were used to compare genotypes. The Chi-Square test was used for categorical variables. The significance level chosen was 5% and for borderline differences between 5 and 8%.

Results

Table 1 presents clinical and anthropometric data from the studied population. The studied group presented a higher number of women than of men. All parameters were under the recommended values, reflecting their state of health.

Table 2 presents the distribution of the CETP polymorphisms. In TaqIB polymorphism, the B1B2 genotype was found in 45% in the studied population. The frequency of B2B2 genotype, described as the most current in Asian and Caucasian population, was 22%, and similar to the frequency described in an African population (26%) (5). The most frequent I405V genotype was IV, 49%, similar to what was described for a white population, 46% II, 43% IV and 11% VV genotype (16).

Table 3 presents the repercussion of the two polymorphisms on several anthropometric and biochemical parameters, on cardiovascular disease (CVD) or on atherosclerosis markers. Most of the clinical and anthropometric parameters were similar in all six genotypes. Age was marginally higher in IV genotype, as well the waist circumference. The waist circumference was smaller in VV carriers, probably because it was the youngest group.

The plasma levels of lipoproteins, lipids and apolipoproteins were similar but when genotypes were compared, B1B2 showed higher Lp (a) levels than the others. Genotype II showed lower levels of HDL-C and IV higher ApoAI levels. No differences in LPL and HL activities were observed among the genotypes. CETP activity was higher in B1B1 and lower in B2B2. Both PLTP and CETP activities were higher in genotype II.

Discussion

Polymorphisms found in CETP locus may have different influence at the plasma CETP and HDL-C levels (34). In the present study several differences in metabolic and atherosclerosis biomarkers related to TaqIB and I405V polymorphisms were found.

Regarding to I405V polymorphism, the genotype II I405V was associated with an increased CETP and PLTP activities, both indicators of CVD risk. Genotypes IV and VV when compared to II, showed elevated HDL-C levels and genotype IV a lower CETP activity, an anti-atherogenic profile. The highest level of HDL-C in IV genotype was related to an increase in HDL₂ sub-fraction cholesterol (35).

Lp (a) is an independent risk factor for atherosclerosis in men and women (36). In a study in a white population, women with a VV genotype had higher tertile values for LDL, apoB and Lp(a), presenting an increased odds ratio for ischemic heart disease (16). Our study showed B1B2 genotype had the highest Lp (a) levels compared to all genotypes analyzed.

In the present study it was not possible to detect any relationship between genotype VV and increased HDL-C (3) and IMT (15) as reported in men, when TG levels are > 165 mg/dL; this fact occurs because TG levels in our group were “very” normal. HDL-CHOL and cholesterol levels were not different in the diverse TaqIB genotypes.

In the *Stanislas cohort* (17), the I405V polymorphism was not related to any lipid parameter and Goto *et al.* (37) showed that it had no impact on the CETP mass, HDL-C or coronary angiograms. Agerholm-Larsen *et al.* (2000) (16) demonstrated by meta-analysis, comparing the 405V e 405I alleles: a weaker association was found between HDL-C levels and mass/activity of CETP in 405V genotype; some authors found an increased risk of CHD in these carriers (13). Funke *et al.* (1994) (38) described an association of the allele 405V with the lowest CETP activity, like it was demonstrated in our study. This genotype is associated with higher HDL-C levels in 10% of cases. Nevertheless, an association of I405V polymorphism and an increased carotid IMT were shown in individuals with VV genotype and elevated TG levels (14). In our study, the I405V genotype did influence the IMT indices.

We found that genotype II showed an increase of the activity of the PLTP, with a direct correspondence with CETP activity. Oka *et al.* (39) and Huskonen *et al.* (40) verified that the plasma concentration of PLTP is higher in CETP deficiency and lower in hipoalphalipoproteinemia, and large and inactive PLTP particles were detected in the deficiency of CETP. Schlitt *et al.* (2003) (41) demonstrated that the activity of PLTP in patients with CHD was greater than that found in the controls.

Some investigators described the lack of correlation between CETP activity and the TaqIB polymorphism (42). The association of this polymorphism with HDL-C levels, in some studies, has been shown to be independent of the plasma CETP levels (43). It is possible that the TaqIB polymorphism affects CETP and HDL-C by an independent way, like through associations with other functionally polymorphisms (44).

In our results, the lowest CETP level was present in B2B2 genotype and as in the data from a Japanese population, no association was found for the B2 allele and increased HDL-C levels (37). However, in different populations it was found an association

of B2 allele with a moderate reduction in CETP activity and an increase in HDL-C levels (45) besides a lower CVD risk (7). As previously reported (46), a positive association was shown between CETP activity and LDL-C levels, but in our study there was not any correlation with the LDL-C levels.

In this study, differently from others which the B2B2 carriers were associated with a reduction of cardiovascular risk, B2B2 presented a higher IMT, suggesting that their lower CETP activity phenotype could be implicated in early atherosclerosis. It is possible that the absence of high levels of HDL-C are an explanation for the association of B2B2 genotype with an early atherosclerotic manifestations, however the frequency of cardiovascular disease was similar among the genotypes. The lowest anti-oxLDL antibodies in this genotype may have happened because of a relative increase in elimination of oxidized lipids from LDL by HDL.

Probably the TaqIB polymorphism association with CVD risk and HDL-C levels are related to unknown mechanisms of HDL protection against CVD. The reverse cholesterol transport could explain this association, since some researchers could not find different CVD risk between B1B2 heterozygous and B1B1 homozygous, even though the first have intermediate levels of HDL-C (7).

It was demonstrated that an elevated concentration of CETP was positively associated with the progress of the arteriosclerosis, measured by the IMT during a 2 years treatment with statin, in patients with familiar hypercholesterolemia (47). Some studies suggested a higher risk of coronary disease for the B1 allele (10), showing an association with a reduced vascular lumen in those individuals (48), although the *Physician's Health Study* (11) did not prove different risk in TaqIB genotypes. In *Framingham Offspring Study* (2), the homozygous for B1 allele of TaqIB polymorphism exhibited the highest CETP activity and the lowest HDL-C levels, compared with B1B2 or B2B2 individuals. In our study the genotype B1B2 presented the highest level of Lp (a) and B1B1 the highest CETP activity both proatherogenic conditions. However, no relationships between those genotypes for IMT or anti-oxLDL antibodies levels were found.

The inverse relationship observed between anti-oxLDL antibodies and oxLDL levels in normal subjects, suggests that anti-oxLDL-antibodies have a role in the clearance of oxLDL from the circulation and can be considered a marker of atherosclerosis (49). In our study, the B2B2 carriers presented the lowest levels of anti-oxLDL antibodies and the VV genotype had only a tendency to it. Although no differences were verified between LDL-C levels, the low anti-oxLDL antibodies could reflect the formation of protective immunocomplexes.

No association was verified among the analyzed polymorphisms, clinical atherosclerosis and IMT. We demonstrated that none of the genotypes analyzed were related to cardiovascular protection, although genotype IV showed better indicators.

Further genetic studies with this Brazilian population should be conducted so these CETP polymorphisms are better understood, particularly their relation to atherosclerosis.

Acknowledgements

The excellent technical assistance of Mirian Danelon is acknowledged as well as the support from Prof^a. Dr^a. Edna Nakandakare and the Laboratory of Lipids, University of São Paulo Medical School. This work was supported in part by grants from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, *Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Universidade de Campinas (FAEP)* and *Coordenadoria de Pessoal de Ensino Superior(CAPES)*.

References

1. Yamashita S, Maruyama T, Hirano K, et al. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 2000; 152:271-85.
2. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20:1323-39.
3. Barter PJ, Brewer Jr HB, Chapman MJ, et al. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23:160-7.
4. Corbex M, Poirier O, Fumeron F, et al. Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction. *Genet Epidemiol*, 2000; 19:64-80.
5. Ritsch A, Patsch JR. Cholesteryl ester transfer protein: gathering momentum as a genetic marker and drug target. *Curr Opin Lipidol*, 2003; 14:173-8.
6. Gudnason V, Kakko S, Nicaud V, et al. 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; 29:116-28.
7. Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V, et al. A polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Eur Heart J*, 2003; 24:1833-42.
8. Corella D, Saiz C, Guillen M, et al. Association of TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with plasma lipid levels in a healthy Spanish population. *Atherosclerosis*, 2000; 152:367-76.
9. Kondo I, Berf K, Drayana D, et al. DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. *Clin Genet*, 1989; 35:49-56.

10. Brousseau ME, O'Connor JJ, Ordovas JM, 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 Tromb Vasc Biol*, 2002; 22:1148-54.
11. Liu S, Schimitz C, Stampfer MJ, et al. A prospective study of the TaqIB polymorphism in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein and risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis*, 2002; 161:469-74.
12. The Woscops Study Group. Screening experience and baseline characteristics in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Am J Cardiol*, 1995; 76:485-91.
13. Takahashi K, Jiang XC, Sakai N, et al. A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins. *J Clin Invest*, 1993; 92:2060-4.
14. 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. *J Lipid Res*, 1998; 39:1071-78.
15. Kakko S, Tamminen M, Paivansalo M, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms are associated with carotid atherosclerosis in men. *Eur J Clin Invest*, 2000; 30:18-25.
16. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, et al. 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; 101:1907-12.
17. Paullaud C, Sass C, Zannad F, et al. APOC3, CETP, fibrinogen and MTHFR are genetic determinants of carotid intima-media thickness in healthy men (the Stanislas cohort). *Clin Genet*, 2001; 59:316-24.
18. Mero N, Van Tol A, Scheek LM, et al. Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. *J Lipid Res*, 1998; 39:1493-502.

19. Fumeron F, Betoulle D, Luc G, 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; 96:1664-71.
20. Hsu LA, Ko YL, Hsu KA, et al. Genetic variations in the cholesteryl ester transfer protein gene and high density lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese Chinese. *Hum Genet*, 2002; 110:57-63.
21. Inazu A, Koizumi J, Kajinami K, et al. Opposite effects on serum cholesteryl ester transfer protein levels between long-term treatments with pravastatin and probucol in patients with primary hypercholesterolemia and xanthoma. *Atherosclerosis*, 1999; 145:405-13.
22. Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, et al. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL 1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20:189-97.
23. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). *JAMA*, 2001; 285: 2486-2497.
24. Enholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol*, 1986; 129:716-38.
25. Matsuzaki Y, Kawagushi E, Morita Y, et al. Evaluation of two kinds of reagents for direct determination of HDL-Cholesterol. *J Anal Bio-Sc*, 1996; 419-27.
26. Bronzert TJ and Brewer HB, Jr. New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fractions. *Clin Chem*, 1977; 23: 20890-20898.
27. Rifai N, Warnick GR, McNamara JR, et al. Measurement of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in serum: a status Report. *Clin Chem*, 1992; 38: 150-160.
28. Marcovina SM, Albers JJ, Scanu AM, et al: Use of a Reference Material Proposed by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine to Evaluate Analytical Methods for the Determination of Plasma Lipoprotein(a). *Clin Chem*, 2000; 46: 1956-1967.

29. Lagrost L. Determination of the mass concentration and activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol*, 1998; 110:231-41.
30. Damen J, Regts J, Scherphop 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; 712:444-52.
31. Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, et al. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Biol Res*, 1996; 29:1625-8.
32. Simons PCG, Algra A, Bots LM, et al. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness. *Circulation*, 1999; 100:951-7.
33. Salazar LA, Melo CE, Cavalli AS, et al. Micrométodo para extração de DNA genômico útil no diagnóstico molecular da hipercolesterolemia familiar. *RBAC*, 2001; 33:111-6.
34. Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein, high density lipoprotein and arterial disease. *Curr Opin Lipidol*, 2001; 12:377-82.
35. Rader DJ, Ikewaki K. Unravelling high density lipoprotein-apolipoprotein metabolism in human mutants and animals models. *Curr Opin Lipidol*, 1996; 7:117-23.
36. Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*, 2004; 109:1112-7.
37. Goto A, Sasai K, Suzuki S, et al. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: a study based on coronary angiography. *Atherosclerosis*, 2001; 159:153-163.
38. Funke H, Wiebusch H, Fuer L, et al. Identification of mutations in the cholesterol ester transfer protein in Europeans with elevated high density lipoprotein cholesterol. *Circulation*, 1994; 90:1-241.
39. Oka T, Yamashita S, Kujiraoka T, et al. Distribution of human plasma PLTP mass and activity in hypo- and hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res*, 2002; 43:1236-43.

40. Huuskonen J, Olkkonen V M, Jauhiainen M, et al. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, 2001;155: 269-81.
41. Schlitt A, Bickel C, Thumma P, et al. High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23:1857-68.
42. Freeman DJ, Griffin BA, Holmes AP, et al. Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Association between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler Thromb*, 1994; 14:336-44.
43. Bernard S, Moulin P, Lagrost L, et al. Association between plasma HDL-cholesterol concentration and TaqIB CETP gene polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Lipid Res*, 1998; 39:59-65.
44. Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2000; 11:389-96.
45. Bansal A, Van Den Boom D, Kammerer S, et al. Association testing by DNA pooling: an effective initial screen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99:16871-4.
46. Ikewaki K, Mabuchi H, Teramoto T, et al for the Japan CETP Study Group. Association of cholesteryl ester transfer protein activity and TaqIB polymorphism with lipoprotein Variations in Japanese subjects. *Metabolism*, 2003; 52:1564-70.
47. De Grooth GJ, Smilde TJ, Van Wissen S, et al. The relationship between cholesteryl ester transfer protein levels and risk factor profile in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2004; 173: 261-267.
48. Eiriksdottir G, Bolla MK, Thorsson B, et al. The -629C>A polymorphism in the CETP gene does not explain the association of TaqIB polymorphism with risk and age of myocardial infarction in Iceland men. *Atherosclerosis*, 2001; 159:187-92.
49. Radulescu L, Stancu C, Antohe F. Antibodies against human oxidized low-density lipoprotein (LDL) as markers for human plasma modified lipoproteins. *Med Sci Monit*, 2004; 10:204-14.

TABLE 1 - CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDIED INDIVIDUALS

Parameters	Mean $\pm$ SD
Age (years)	48 $\pm$ 15 (294)
Sex (F / M)	220 / 77
BMI (kg/m²)	25 $\pm$ 5 (278)
Waist circumference (cm)	80 $\pm$ 12 (275)
Systolic BP (mmHg)	125 $\pm$ 15 (279)
Diastolic BP (mmHg)	80 $\pm$ 10 (279)

Data as means $\pm$ SD; (n) = number of individuals

BMI, body mass index; BP, blood pressure

9	10	11
---	----	----

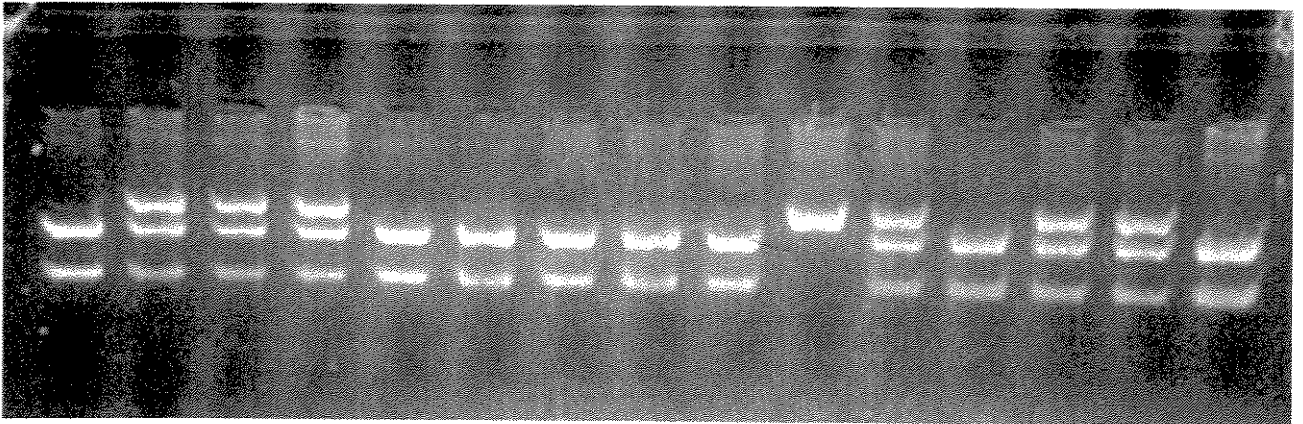


Fig. 1: TaqIB polymorphism. PCR digestion assay using TaqI on poliacrilamida gel: lane 9: B1B1 (+/+) (174 and 361 bp), lane 10: B2B2 (-/-) (535 bp) and lane 11: B1B2 (+/-) (535, 361 and 174 bp)

11	14	15	16
----	----	----	----

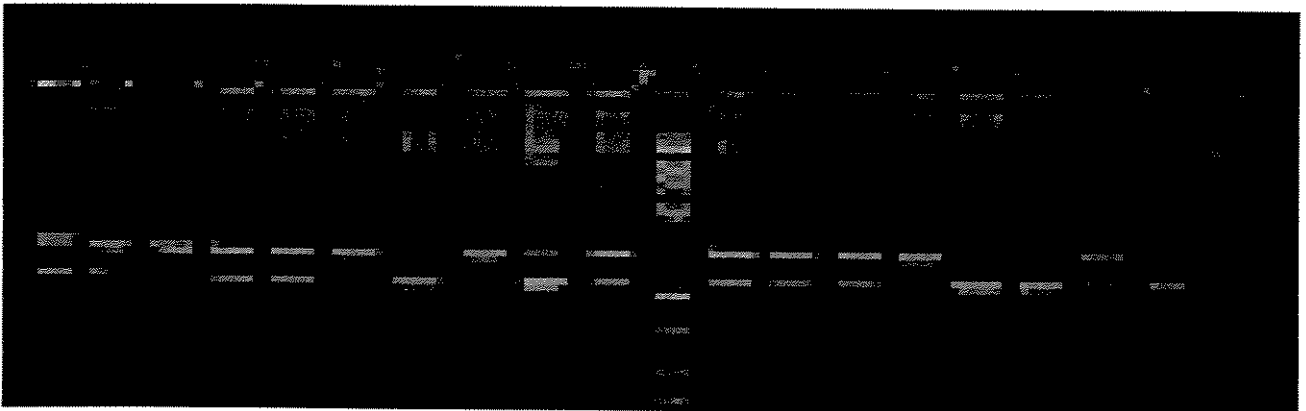


Fig. 2: I405V polymorphism. PCR digestion assay using MspI on poliacrilamida gel: Lane 14: IV (+/-) (142, 121 and 21 bp); lane 15: II (-/-) (142 bp) and lane 16: V V (+/+) (121 and 21bp); lane 11: MW-molecular size marker

TABLE 2 – PERCENTAGE DISTRIBUTION OF CETP GENOTYPES Taq1B AND I405V IN THE STUDIED POPULATION.

CETP polymorphism		Distribution
Taq1B	B1B1	33% (97)
	B1B2	45% (131)
	B2B2	22% (65)
I405V	II	34% (100)
	IV	49% (145)
	VV	17% (50)

Total= 294 individuals; n= (number of carriers)

**TABLE 3 – CLINICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CETP
TaqIB AND I405V GENOTYPES**

PARAMETERS	TaqIB				I405V			
	B1B1	B1B2	B2B2	<i>P</i>	II	IV	VV	<i>P</i>
Age (years)	48±16 (98)	48±15 (131)	50±14 (65)		48±15 (99)	50±14	44±16 (50)*	0.072
Sex (F/ M)	69/30	100/32	51/15		73/28	112/34	35/17	
BMI (kg/m ²)	25±5 (92)	26±5 (122)	25±8 (64)		26±6 (92)	25±5 (139)	24±4 (47)	
Waist circumference	80±12 (88)	81±12 (125)	80±12 (62)		79±11 (90)	82±13	78±9 (48) *	0.020
Systolic BP (mmHg)	125±14 (92)	124±16	127±17 (61)		123±16	127±16	124±13 (49)	
Diastolic BP (mmHg)	81±10 (92)	80±10 (126)	81±10 (61)		79±11 (92)	82±10	81±9 (49)	
Carotid IMT (mm)	0.69±0.17	0.72±0.22	0.86±0.30	0.008	0.74±0.21	0.76±0.22	0.71±0.28 (27)	
Cholesterol (mg/dL)	207±49 (98)	212±50	217±45 (65)		206±44	216±52	208±48 (50)	
Triglyceride (mg/dL)	92±44 (98)	93±41 (131)	102±46 (65)		98±47 (99)	94±43	87±36 (50)	
LDL-CHOL (mg/dL)	119±36 (98)	125±40	127±37 (64)		122±34	124±42	125±35 (50)	
Anti ox-LDL (%)	0.33±0.16	0.40±0.18	0.30±0.16(27)	0.021	0.36±0.18	0.38±0.18	0.28±0.13(22)	0.052
HDL-CHOL (mg/dL)	70±25 (98)	68±16 (131)	71±17 (65)		66±22 (99)	73±18	67±17 (50)	0.010
HDL ₂ -CHOL (mg/dL)	16±6 (87)	16±6 (119)	17±9 (59)		14±6 (89)	17±7 (130)	17±5 (46) ‡	0.005
HDL ₃ -CHOL (mg/dL)	52±19 (87)	51±15 (119)	54±14 (59)		50±19 (88)	54±14	50±13 (46)	

PARAMETERS (Tab 3 Continuation)	TaqIB				I405V			
	B1B1	B1B2	B2B2	P	II	IV	VV	P
HDL _x -TG (mg/dL)	9±6 (85)	9±5 (116)	9±5 (55)		9±5 (88)	9±6 (124)	7±5 (44)	
HDL _s -TG (mg/dL)	21±10 (87)	23±11 (120)	23±10 (59)		23±11 (89)	23±10 (131)	19±9 (45)	
Apo AI (mg/dL)	172±41 (92)	167±39	175±36 (63)		162±34 (96) *	179±42	162±35 (48)	0.008
Apo B100 (mg/dL)	95±29 (92)	102±32	102±25 (63)		98±25 (96)	102±34	92±26 (48)	
Lp(a) (mg/dL)	28±32 (89) #	39±36 (127)	26±32 (62) #	0.013	33±34 (91)	32±33 (139)	34±38 (48)	
CETP activity (%)	13±8 (88) [§]	12±8 (127)	10±7 (60)	0.059	14±8 (92) *	11±7(134)	12±6 (49)	0.007
PLTP activity (%)	17±11 (82)	17±11 (113)	17±9 (57)		22±12 (80)	16±10 (129)	12±9 (43) ‡	0.0001
LPL	2,597±1,380	2,643±1584	2,532±1,564		2,627±1,439(88)	2,517±1,406	2,798±1,901	
HL	1,925±1,345	1,900±1,311	1,913±1,191		1,985±1,424(88)	1,788±1,154	2,014±1,377	
CVD (%)	8	9	8	0.70	8	8	8	0.60

Data as means ± SD; (n) = number of individuals.

BMI, body mass index; BP, blood pressure; IMT, intima media thickness; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; HDL-CHOL, high density lipoprotein cholesterol; ox-LDL, oxidized LDL; apoAI, apolipoprotein AI; apoB100, apolipoprotein B100; CETP, cholesteryl ester transfer protein; PLTP, phospholipid transfer protein; HL, hepatic lipase; LPL, lipoprotein lipase; CVD, cardiovascular disease.

* $P \leq 0.05$, I V; # $P \leq 0.05$, B1B2; *, [§] $P \leq 0.05$, B2B2; ‡ $P \leq 0.05$, II

5 - DISCUSSÃO GERAL

Este é o primeiro estudo genético conduzido em uma população brasileira portadora de HALP. Os participantes são resultado de ampla miscigenação racial, originários do estado de São Paulo e regiões vizinhas.

Na população japonesa, int14A e D442G são as mutações mais frequentes do gene da CETP e apresentam-se acompanhadas por alterações bioquímicas e biológicas de HDL e LDL. Aceita-se que os valores de HDL-C, *per se*, não estão necessariamente correlacionados com proteção contra a aterosclerose, pois se esta lipoproteína possui características disfuncionais, pode não contribuir para a redução deste risco (BARTER e RYE, 2001).

Os indivíduos homozigóticos para a mutação Int14A apresentam atividade e massa plasmática de CETP indetectáveis, aumento em 2-3 vezes dos valores de HDL-C, partículas de HDL₂ ricas em EC e pobres em TAG, com capacidade reduzida de remover colesterol (HIRANO *et al.*, 2000). Além destas, são encontradas alterações em apoE (LAGROST, 1977), apoAI e apoAII. As partículas de LDL mostram redução de apo B (INAZU *et al.*, 1990), aumento da concentração de TAG (BISGAIER *et al.*, 1991) e polidispersão de partículas (YAMASHITA *et al.*, 1988). Na mutação D442G, os indivíduos apresentam deficiência parcial de CETP, com aumento de HDL-C em cerca de 1-2 vezes (INAZU *et al.*, 1994).

Estudos populacionais, ao pesquisarem a relação destas mutações com a aterosclerose, encontraram: associação de HALP com DAC, se os valores de HDL-C se encontravam entre 41-60 mg/dL em homens heterozigóticos (HIRANO *et al.*, 2000); maior índice de anormalidades ao ECG quando os valores de HDL-C estavam >70 mg/dL (HIRANO *et al.*, 1997) e menor incidência de DAC quando os valores de HDL-C estavam >80 mg/dL, dados estes abrangendo tanto homozigóticos como heterozigóticos, de ambas as mutações citadas (INAZU *et al.*, 1994). Nos estudos populacionais de *Honolulu* e *Kochi*, os pacientes com valores elevados de HDL-C mostraram prevalência semelhante, quer fossem mutantes ou não (HONG *et al.*, 1996; MORYAMA *et al.*, 1998). A análise prospectiva de resultados do *Honolulu Heart Study* mostrou correlação significativa entre os portadores heterozigóticos das mutações do gene da CETP e doenças cardiovasculares ou cerebrovasculares (HIRANO *et al.*, 2000, CURB *et al.*, 2004). Os efeitos negativos da

deficiência de CETP em mutantes heterozigóticos parecem predominar sobre homozigóticos, como demonstrou INAZU *et al.* (1993) com a ocorrência de DAC prematura em 44 indivíduos mutantes estudados. Esta hipótese foi reforçada com a comprovação de que dentre os cinco pacientes heterozigóticos participantes do atual estudo, um deles apresentou arco corneano e DAC, além de história familiar positiva para doença cerebrovascular.

Em um estudo prévio da população brasileira com HALP, realizado por nosso grupo (ALARCON *et al.*, 2004), foi verificado que o agente primário da modulação de HDL-C poderia ser de origem genética. Neste estudo foram investigados a frequência e a prevalência das mutações genéticas de CETP (Int14A e D442G), bem como de dois polimorfismos freqüentemente descritos (TaqIB e I405V), além das características metabólicas e a presença de manifestações ateroscleróticas em 152-294 HALP e em 139 controles, definidos como portadores de HDL-C acima ou abaixo do percentil 90th para a população local, respectivamente.

No presente trabalho, a prevalência da mutação Int14A foi maior (4 %) do que na população caucasiana (HILL *et al.*, 1997), porém menor do que em população japonesa. A mutação D442G apresentou prevalência muito menor (0,7 %) do que a observada na população japonesa (HONG *et al.*, 1996), e o único indivíduo a apresentá-la era proveniente deste grupo étnico.

No grupo HALP foi encontrada relação com alterações de parâmetros do metabolismo lipídico: redução da atividade de CETP e HL e aumento das atividades de LPL e PLTP.

Quatro dos indivíduos que apresentaram mutação Int14A estavam situados no percentil de referência 95th ou acima, para a concentração de HDL-C, e abaixo do percentil 55th para a atividade de CETP. Analisando a atividade de LPL, esta localizou-se abaixo do percentil 50th, a atividade de HL abaixo do percentil 45th, e a de PLTP abaixo do percentil 65th.

O paciente homozigótico para Int14A apresentou HDL-C de 211 mg/dL e atividade de CETP indetectável. A atividade de HL estava abaixo do intervalo de referência (2,5 e 97,5 percentis do controle), sugerindo a presença de defeito genético concomitante. Este paciente não apresentou sinais de comprometimento cardiovascular, no entanto um dos heterozigóticos (29 anos) apresentou DAC estabelecida.

O indivíduo mutante para D442G apresentou atividades de LPL, HL e PLTP com resultados próximos ao do grupo controle. Os valores de HDL-C (75 mg/dL) e CETP (atividade de 18%) estiveram de acordo com o descrito na literatura para esta mutação (BOEKHOLDT e THOMPSON, 2003).

As diferenças encontradas nas proteínas de transferência e lipases também foram registradas em outros estudos. HL e LPL atuam de forma oposta no metabolismo de HDL e os valores de HDL₂ aumentam às custas de LPL (KUUSI *et al.*, 1989). Esta associação entre aumento de LPL e HALP foi verificada por TASKINEN *et al.* (1980). HIRANO *et al.* (1995) demonstraram pacientes com dupla deficiência de CETP e HL, na ausência de hipertrigliceridemia e acúmulo de remanescentes de lipoproteínas. A deficiência de HL origina partículas de HDL ricas em TAG, que são excelentes substratos para atuação de LPL (ALARCON *et al.*, 2004). Estes resultados poderiam explicar a normotrigliceridemia, o aumento de HDL₂ e de LPL no grupo estudado de pacientes HALP. Estes indivíduos também mostraram discreta tendência ao aumento de atividade de PLTP. Em estudos com voluntários saudáveis, foi verificada correlação positiva com a concentração, mas não atividade plasmática de PLTP e HDL-C, e na deficiência de CETP foram identificadas grandes partículas inativas de PLTP (OKA *et al.*, 2002).

A presença de mutações e polimorfismos no gene da CETP, acompanhadas de alterações funcionais, poderia explicar o encontro de variações no IMT destas populações (KAKKO *et al.*, 2000). A verificação de aumento do IMT de um dos pacientes analisados, portador da mutação D442G, estaria de acordo com estes dados, porém não foi caracterizada associação entre as mutações e DCV clínica, neste estudo.

Estas alterações metabólicas, demonstradas por avaliações clínicas e bioquímicas, sugerem que nesta população estudada, HALP não mostrou associação com as mutações estudadas ou aterosclerose clinicamente estabelecida.

Polimorfismos encontrados no *locus* da CETP apresentam efeitos variáveis sobre a concentração plasmática de CETP ou valores de HDL-C (BARTER e RYE, 2001). O genótipo B1B2 apresentou prevalência de 45% e o IV de 49%, índices semelhantes ao de outras populações descritas. No estudo atual, os diferentes genótipos estudados de TaqIB e de I405V mostraram alterações metabólicas diversas, com repercussões variáveis quanto ao estabelecimento da aterosclerose. O genótipo B2B2, diversamente do resultado de outros estudos (EIRIKDOTTIR et al, 2001), mostrou correlação positiva com aumento do IMT, os mais baixos valores de CETP, nenhuma associação com aumento da HDL-C e diminuição de auto-anticorpos anti LDL oxidado, em relação aos outros genótipos. O genótipo VV de I405V apresentou relação com menor concentração de auto-anticorpos contra LDL oxidada. O genótipo II apresentou valores mais baixos de HDL-C e relativo aumento da atividade de CETP, configurando um perfil pró-aterogênico nestes indivíduos. As proteínas reguladoras CETP e PLTP, bem como as lipases, mostraram-se similares entre estes diversos genótipos.

6 - CONCLUSÃO GERAL

A população analisada era constituída por um *background* genético heterogêneo. A prevalência da mutação Int14A foi maior do que a relatada em caucasianos e a D442G menor do que na população japonesa; ambas apresentando pequenos índices na população brasileira.

A HALP, neste grupo estudado, mostrou associação com menor atividade da HL e da CETP, aumento de LPL e PLTP, além de outras alterações, como o aumento do colesterol total e de ApoAI, concentrações de colesterol aumentadas em frações de HDL₂ e HDL₃, e de TAG em HDL₃.

Para avaliar, nesta mesma população, as repercussões dos polimorfismos TaqIB e I405V na instalação da aterosclerose, foram determinados parâmetros lipídicos, proteínas moduladoras e marcadores biológicos. A frequência destes polimorfismos na população estudada foi semelhante à descrita na literatura. Em um subgrupo de pacientes foi avaliado o IMT de ambas as carótidas, mostrando aumento deste índice, no genótipo B2B2. Os auto-anticorpos contra LDL oxidada apresentaram-se aumentados nos indivíduos com genótipo B1B2 e limítrofes no IV. As lipoproteínas, apolipoproteínas, lípides, LPL, HL e PLTP foram semelhantes nos diversos genótipos. ApoAI, HDL-C e HDL₂-C estavam aumentados e CETP reduzido nos indivíduos IV de I405V e Lp(a) nos B1B2 de TaqIB. No entanto, a frequência de DAC foi similar nos vários genótipos.

Os resultados encontrados na análise dos vários genótipos de mutações/polimorfismos do gene da CETP (Int14A, D442G, I405V e TaqIB) não demonstraram associação com o grupo HALP, sugerindo que mutações de outras proteínas, como de HL, poderiam explicar melhor este fenótipo na população estudada. É possível, no entanto, que a baixa frequência das mutações de CETP não tenha permitido caracterizar esta associação. HALP não esteve associada a quaisquer das mutações ou polimorfismos estudados ou aterosclerose clinicamente estabelecida. Estudos complementares necessitam ser realizados para melhor compreensão deste fenótipo.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, S.; RIGOTTI, A.; LANDSHULTZ, K. et al. Identification of a scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. **Science**, 271:518-20, 1996.
- AGELLON, L. B.; QUINET, E. M.; GILLETTE, T. G.; DRAYNA, D. T.; BROWN, M. L.; TALL, A. R. Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. **Biochemistry**, 29:1372-6, 1990.
- AGERHOLM-LARSEN, B.; NORDESTGAARD, B. G.; 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**, 101:1907-12, 2000.
- ALARCON, S.B.; OLIVEIRA H.C.; HARADA, L.M.; NUNES, V.S.; KAPLAN, D.B.; QUINTAO, E.C.; de FARIA, E.C. Moderate hyperalphalipoproteinaemia in a Brazilian population is related to lipoprotein lipase activity, apolipoprotein A-I concentration, age and body mass index. **Clin Sci (Lond)**, 106(1): 11-7, 2004.
- ANDERSEN, R. V.; WITTRUP, H. H.; TYBJÆRG-HANSEN, A.; STEFFENSEN, R.; SCHNOHR, P.; NORDESTGAARD, B. G. Hepatic lipase mutations, elevated high-density lipoprotein cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease. **J Am Coll Cardiol**, 41:1972-82, 2003.
- ARAI, T.; YAMASHITA, S.; SAKAI, N.; HIRANO, K.; OKADA, S.; ISHIGAMI, M. et al. A novel nonsense mutation (G181X) in the human cholesteryl ester transfer protein gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects. **J Lipid Res**, 37: 2145-54, 1996.
- AUWERX, J. H.; MARZETTA, C. A.; HOKANSON, J. E.; BRUNZELL, J. D. Large buoyant LDL-like particles in hepatic lipase deficiency. **Arteriosclerosis**, 9:319-25, 1989.
- BAGDADE, J. D.; RITTER, M. C.; SUBBIAH, P. V. Accelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Clin Invest**, 21:161-7, 1991.
- BANSAL, A.; VAN DEN BOOM, D.; KAMMERER, S.; HONISCH, C.; ADAM, G.; CANTOR, C. R. et al. Association testing by DNA pooling: an effective initial screen. **Proc Natl Acad Sci USA**, 99:16871-4, 2002.

- BARTER, P. J.; RYE, K. A. High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 121:1-12, 1996.
- BARTER, P. J.; RYE, K-A. Cholesteryl ester transfer protein, high density lipoprotein and arterial disease. *Curr Opin Lipidol*, 12:377-82, 2001.
- BARTER, P. J.; BREWER JUNIOR, H. B.; CHAPMAN, M. J.; HENNEKENS, C. H.; RADER, D. J.; TALL, A. R. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:160-7, 2003.
- BERNARD, S.; MOULIN, P.; LAGROST, L.; PICARD, S.; ELCHEBLY, M.; PONSIN, G. et al. Association between plasma HDL-cholesterol concentration and TaqIB CETP gene polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Lipid Res*, 39:59-65, 1998.
- BERTI, J. A.; AMARAL, M. E. C.; BOSCHERO, A. C.; NUNES, V. S.; HARADA, L. M.; CASTILHO, L. N. et al. Thyroid hormone increases plasma cholesteryl ester transfer protein activity and plasma high-density lipoprotein removal rate in transgenic mice. *Metabolism*, 50:530-8, 2001.
- BERTI, J. A.; CASQUERO, A. C.; PATRICIO, P. R.; BIGHETTI, E. J.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C. et al. Cholesteryl ester transfer protein expression is down-regulated in hyperinsulinemic transgenic mice. *J Lipid Res*. 44:1870-6, 2003.
- BHATNAGAR, D.; DIRRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I.; ARROL, S.; WINOCOUR, P. H.; PRAIS, H. Effects of treatment of hypertriglyceridaemia with gemfibrozil on serum lipoproteins and the transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins to low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, 92:49-57, 1992.
- BIJVOET, S.; GAGNE, E.; MOORJANI, S.; GAGNE, C.; HENDERSON, H. E.; FRUCHART, J-C. et al. Alterations in plasma lipoproteins and apolipoproteins before the age of 40 in heterozygotes for lipoprotein lipase deficiency. *J Lipid Res*, 37:640-50, 1996.
- BISGAIER, C. L.; SIEBENKAS, M.V.; BROWN, M. L.; INAZU, A.; KOIZUMI, J.; MABUCHI, H. et al. Familial cholesteryl ester transfer protein deficiency is associated with triglyceride-rich low density lipoproteins containing cholesteryl esters of probable intracellular origin. *J Lipid Res*, 32:21-33, 1991.

- BOEKHOLDT, S. M.; THOMPSON, F. J. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. **J Lipid Res**, 44:1080-86, 2003.
- BREWER, H. B. Jr.; SANTAMARINA-FOJO, S. Clinical significance of high-density lipoproteins and the development of atherosclerosis: focus on the role of the adenosine triphosphate-binding cassette protein A1 transporter. **Am J Cardiol**, 4B: 10K-16K, 2003.
- BROUSSEAU, M.E.; O'CONNOR, J. J.; ORDOVAS, J.M. 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 Tromb Vasc Biol**, 22:1148-54, 2002.
- BROUSSEAU, M.E.; SCHAEFER, E. J. ; WOLFE, M.L. ; BLOEDON, L.T. ; DIGENIO, A. G. ; CLARK, R. W. ; MANCUSO, J. P.; RADER, D.J. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. **N Engl J Med**, 15: 1491-4.
- BROWN, M. L.; INAZU, A.; HESLER, C. B.; AGELLON, L. B.; MANN, C.; WHITLOCK, M. E. et al. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high density lipoproteins. **Nature**, 342:448-51, 1989.
- BRUCE, C.; BEAMER, L. J.; TALL, A. R. The implications of the structure of the bactericidal/permeability-increasing protein on the lipid-transfer function of the cholesteryl ester transfer protein. **Curr Opin Struct Biol**, 8:426-51, 1998a.
- BRUCE, C.; SHARP, D. S.; TALL, A. R. 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. **J Lipid Res**, 39:1071-8, 1998b.
- BRUNDERT, M.; HEEREN, J.; GRETEN, H.; RINNINGER, F. Hepatic lipase mediates an increase in selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters by cells in culture independent from SR-BI. **J Lipid Res**, 44:1020-32, 2003.
- BRUNZELL, J. Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W.; Valle, D., editors. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. New York, NY; McGraw-Hill Inc; 1995,1913-32.

BRUNZELL, J.; DEEB, S. Familial lipoprotein lipase deficiency, apo CII deficiency, and hepatic lipase deficiency. In: Scriver, C.; Beaudet, A.; Sly, W.; Vale, D., editors. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. New York: McGraw-Hill Book Co; 2001, 2789-816.

CARR, M. C.; HOKANSON, J. E.; DEEB, S. S. et al. A hepatic lipase gene promoter polymorphism attenuates the increase in hepatic lipase activity with increasing intra-abdominal fat in women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19:2701-7, 1999.

CARR, M. C.; HOKANSON, J. E.; ZAMBON, A. et al. The contribution of intraabdominal fat to gender differences in hepatic lipase activity and low/high density lipoprotein heterogeneity. **J Clin Endocrinol Metab**, 86:2831-7, 2001.

CARRILHO, A. J.; CUNHA-NETO, M. B.; NUNES, V. S.; LOTTENBERG, A. M.; MEDINA, W. L.; NAKANDAKARE, E. R. et al. Plasma cholesteryl ester transfer protein and lipoprotein levels during treatment of growth hormone-deficient adult humans. **Lipids**, 36:549-54, 2001.

CARROLL, P. V.; CHRIST, E. R.; BENGTSSON, B. A., CARLSSON, L.; CHRISTIANSEN, J. S.; CLEMMONS, D. et al. Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. Growth Hormone Research Society Scientific Committee. **J Clin Endocrinol Metab**, 83:382-95, 1998.

CASTELLI, W. P. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. **JAMA**, 256: 2835-8, 1986.

CASTRO, G. R.; FIELDING, C. J. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high-density lipoprotein. **Biochemistry**, 27:25-9, 1988.

CAZITA, P. M.; BERTI, J. A.; AOKI, C.; GIDLUND, M.; HARADA, L. M.; NUNES, V. S. et al. Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice. **J Lipid Res**. 44:33-40, 2003.

CHEUNG, M. C.; ALBERS, J. J. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. **J Biol Chem**, 259:12201-9, 1984.

- CHEUNG, M. C.; WOLF, A. C.; LUM, K. D.; TOLLEFSON, J. H.; ALBERS, J. J. Distribution and localization of lecithin: cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer activity in A-I-containing lipoproteins. **J Lipid Res**, 27:1135-44, 1986.
- CLARK, R. W.; SUTFIN, T. A.; RUGGERI, R.B.; WILLAUER, A. T.; SUGARMAN, E. D.; MAGNUS-ARYITEY, G. et al. Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 24:490-7, 2004.
- COCKERILL, G. W.; RYE, K. A.; GAMBLE JR. et al. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 15:1987-94, 1995.
- COHEN, J. C.; WANG, Z.; GRUNDY, S. M.; STOESZ, M. R.; GUERRA, R. Variation at the hepatic lipase and apolipoprotein AI/CII/AIV loci is a major cause of genetically determined variation in plasma HDL cholesterol levels. **J Clin Invest**, 94:2377-84, 1994.
- COHEN, J. C.; VEGA, G. L.; GRUNDY, S. M. Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. **Curr Opin Lipidol**, 10:259-67, 1999.
- CORBEX, M.; POIRIER, O.; FUMERON, F.; BETOULLE, D.; EVANS, A.; RUIDAVETS, JB.; ARVEILER, D.; LUC, G.; TIRET, L.; CAMBIEN, F. Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction. **Genet Epidemiol**, 19:64-80, 2000.
- CORELLA, D.; SAIZ, C.; GUILLEN, M.; PORTOLES, O.; MULET, F.; GONZALEZ, J. I. et al. Association of TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with plasma lipid levels in a healthy Spanish population. **Atherosclerosis**, 152:367-76, 2000.
- COUILLARD, C.; BERGERON, J.; DESPRÉS, J-P.; GAGNON, J.; RANKINEN, T.; LEON, A. S. et al. Apolipoprotein AI- and AI:AIII- Containing lipoproteins in white men and women of the heritage family study: Associations with metabolic risk profile variables. **Metabolism**, 52:1380-536, 2003.

COUTURE, P.; OTVOS, J. D.; CUPPLES, L. A.; LAHOZ, C.; WILSON, P. W.; SCHAEFER, E. J. et al. Association of the C514T polymorphism in the hepatic lipase gene with variations in lipoprotein subclass profiles: The Framingham Offspring Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20:815-22, 2000.

CURB, J. D.; ABBOTT, R. D.; RODRIGUEZ, B. L.; MASAKI, K.; CHEN, R.; SHARP, D. S. 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. **J Lipid Res**, 45:948-53, 2004.

DACHET, C.; POIRIER, O.; CAMBIEN, F.; CHAPMAN, J.; ROUIS, M. New functional promoter polymorphism, CETP/-629, in cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene related to CETP mass and high density lipoprotein cholesterol levels: role of Sp1/Sp3 in transcriptional regulation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20:507-15, 2000.

DAMEN J.; REGTS J.; SCHERPHOP 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**, 712: 444 – 452, 1982.

DEEB, S. S.; PENG, R. The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity. **J Lipid Res**, 41:155-8, 2000.

DECKELBAUM, R. J.; EISENBERG, S.; OSCHRY, Y.; GRANOT, E.; SHARON, I.; BENGTSSON-OLIVECRONA, G. Conversion of human plasma high density lipoprotein-2 to high density lipoprotein-3: roles of neutral lipid exchange and triglyceride lipases. **J Biol Chem**, 261:5201, 1986.

DEIGHAN, C. J.; CASLAKE, M. J.; McCONNELL, M.; BOULTON-JONES, J. M.; PACKARD, C. J. The atherogenic lipoprotein phenotype: small dense LDL and lipoprotein remnants in nephrotic range proteinuria. **Atherosclerosis**, 157:211-20, 2001.

DEJAGER, S.; BRUCKERT, F.; CHAPMAN, M. J. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. **J Lipid Res**, 34:295-308, 1993.

DEMANT, T.; CARLSON, L. A.; HOLMQUIST, L.; KARPE, F.; NILSSON-EHLE, P.; PACKARD, C. J. et al. Lipoprotein metabolism in hepatic lipase deficiency: studies on the turnover of apolipoprotein B and on the effect of hepatic lipase on high density lipoprotein. **J Lipid Res**, 29:1603-11, 1988.

DESRUMAUX, C.; ATHIAS, A.; MASSON, D.; GAMBERT, P.; LALLEMANT, C.; LAGROST, L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. **Lipid Res**, 39:131-42, 1998. 1998

DRAYNA, D.; JARNAGIN, A. S.; McLEAN, J.; HENZEL, W.; KOHR, W.; FIELDING, C.; LAWN, R. Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. **Nature**, 327:632-34, 1987.

DUGI, K. A.; AMAR, M. J. A.; HAUDENSCHILD, C. C.; SHAMBUREK, R. D.; BENSADOUN, A.; HOYT JR., R. F. et al. In vivo evidence for both lipolytic and nonlipolytic function of hepatic lipase in the metabolism of HDL. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20:793-811, 2000.

DULLAART, R. P.; HOOGENBERG, K.; GROENER, J. E.; DIKKESCHEI, L. D.; ERKELENS, D. W.; DOORENBOS, H. The activity of cholesteryl ester transfer protein is decreased in hypothyroidism: a possible contribution to alterations in high-density lipoproteins. **Eur J Clin Invest**, 20:581-7, 1990.

DULLAART, R. P.; GROENER, J. E.; DIKKESCHEI, B. D.; ERKELENS, D. W.; DOORENBOS, H. Elevated cholesteryl ester transfer protein activity in IDDM men who smoke. Possible factor for unfavorable lipoprotein profile. **Diabetes Care**, 14:338- 41, 1991.

DULLAART, R. P.; HOOGENBERG, K.; DIKKESCHEI, B. D.; VAN TOL, A. Higher plasma lipid transfer protein activities and unfavorable lipoprotein changes in cigarette-smoking men. **Arterioscler Thromb**, 14:1581-5, 1994.

DULLAART, R. P.; RIEMENS, S. C.; SCHEEK, L. M.; VAN TOL, A. Insulin decreases plasma cholesteryl ester transfer but not cholesterol esterification in healthy subjects as well as in normotriglyceridaemic patients with type 2 diabetes. **Eur J Clin Invest**, 29:663-71, 1999.

DUNTAS, L. H. Thyroid disease and lipids. **Thyroid**, 12:287-93, 2002.

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. **J Clin Endocrinol Metab**, 84:3656-9, 1999.

EHRENBORG, E.; CLEE, S. M.; PIMSTONE, S. N.; REYMER, P. W.; BENLIAN, P.; HOOGENDIJK, C. F. et al. Ethnic variation and in vivo effects of the -93t->g promoter variant in the lipoprotein lipase gene. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:2672-8, 1997.

EIRIKSDOTTIR, G.; BOLLA, MK.; THORSSON, B.; SIGURDSSON, G.; HUMPHRIES, SE.; GUDNASON, V. The -629C>A polymorphism in the CETP gene does not explain the association of TaqIB polymorphism with risk and age of myocardial infarction in Iceland men. **Atherosclerosis**, 159:187-92, 2001.

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **J Lipid Res**, 25:1017, 1984.

ENHOLM, C.; KUUSI T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. **Methods Enzymol**, 129: 716-738, 1986.

FAGGIN, E.; ZAMBON, A.; PUATO, M.; DEEB, S. S.; BERTOCCO, S.; SARTORE, S. Association between the -514 C->T polymorphism of the hepatic lipase gene promoter and unstable carotid plaque in patients with severe carotid artery stenosis. **J Am Coll Cardiol**, 40:1059-66, 2002.

FAUCHER, C.; DOUCET, C.; BAUMELOU, A.; CHAPMAN, J.; JACOBS, C.; THILLET, J. Elevated lipoprotein (a) levels in primary nephrotic syndrome. **Am J Kidney Dis**, 22:808-13, 1993.

FIDGE, N. H. High density lipoprotein receptors, binding proteins and ligands. **J lipid Res** 40:187-201, 1999.

FIELDING, C. J.; REAVEN, G. M.; LIU, G.; FIELDING, P. E. Increased free cholesterol in plasma low and very low density lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus: its role in the inhibition of cholesteryl ester transfer. **Proc Natl Acad Sci USA**, 81:2512-6, 1984.

- FIELDING, C. J.; HAVEL, R. J. Cholesteryl ester transfer protein: Friend or foe? **J Clin Invest**, 97:2687-8, 1996.
- FOGER, B.; WOHLFARTER, T.; RITSCH, A.; LECHLEITNER, M.; MILLER, C. H.; DIENSTL, A. et al. Kinetics of lipids, apolipoproteins, and cholesteryl ester transfer protein in plasma after a bicycle marathon. **Metabolism**, 43:633-9, 1994.
- FOGER, B.; CHASE, M.; AMAR, M. J. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. **J Biol Chem**, 274:36912-20, 1999.
- FRANCONE, O. L.; GURAKAR, A.; FIELDING, C. Distribution and functions of lecithin: cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol. **J Biol Chem**, 264:7066-72, 1989.
- FREEMAN, D. J.; GRIFFIN, B. A.; HOLMES, A. P.; LINDSAY, G. M.; GAFFNEY, D.; PACKARD, C. J. et al. Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Association between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. **Arterioscler Thromb**, 14:336-44, 1994.
- FREEMAN, D. J.; SAMANI, N. J.; WILSON, V.; McMAHON, A. D.; BRAUND, P.S.; CHENG, S. et al., on behalf of the West of Scotland Study Group. A polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. **Eur Heart J**, 24, 1833-42, 2003.
- FRIEDWALD, W. F.; LEVY, R. I.; FREDERICKSON, D. S. Estimation of LDL- cholesterol concentration without use of preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, 18:499-502, 1972.
- 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. **J Clin Invest**, 96:1664-71, 1995.

FUNKE, H.; WIEBUSCH, H.; FUER, L.; MUNTONI, S.; SCHULTE, H.; ASSMANN, G. Identification of mutations in the cholesterol ester transfer protein in Europeans with elevated high density lipoprotein cholesterol. **Circulation**, 90:1-241, 1994.

GERDES, C.; GERDES, L.U.; HANSEN, P. S.; FAERGEMAN, O. Polymorphisms in the lipoprotein lipase gene and their association with plasma lipid concentrations in 40-year-old Danish men. **Circulation**, 92:1765-9, 1995.

GLOMSET, J. A.; NORUM, K. R. The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. **Adv Lipid Res** 11:1-65, 1973.

GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. **J Lipid Res**, 37:693-707, 1996.

GORDON, D. J.; PROBSFIELD, J. L.; GARRISON, R. L.; NEATON, J. D.; CASTELLI, W. P.; KNOKE, J. D. et al. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: Four prospective American studies. **Circulation**, 79:8-15, 1989.

GOTO, A.; SASAI, K.; SUZUKI, S; FUKUTOMI, T.; ITO, S.; MATSUSHITA, T. et al. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: a study based on coronary angiography. **Atherosclerosis**, 159:153-63, 2001.

GOTODA, T.; KINOSHITA, M.; SHIMANO, H.; HARADA, K.; SHIMADA, M.; OHSUGA, J. Cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by a nonsense mutation detected in the patient's macrophage. **Biochem Biophys Res Commun**, 194:519-24, 1993.

GROENEMEIJER, B.E.; HALLMAN, M. D.; REYMER, P. W.; GAGNE, E.; KUIVENHOVEN, J. A.; BRUIN, T. et al. Genetic variant showing a positive interaction with beta-blocking agents with a beneficial influence on lipoprotein lipase activity, HDL cholesterol, and triglyceride levels in coronary artery disease patients. The447-stop substitution in the lipoprotein lipase gene. **Circulation**, 95:2628-35, 1997.

GROENER, J. E.; KOSTNER, G. M. Lipid transfer protein-catalyzed exchange of cholesteryl ester between high density lipoproteins and apoB-containing lipoproteins. **J Lipid Res**, 28:1053-6, 1987.

GROOT, P. H.; VAN STIPHOUT, W. A.; KRAUSS, X. H.; JANSEN, H.; VAN TOL, A.; VAN RAMSHORST, E. et al. Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. **Arterioscler Thromb**, 11:653-62, 1991.

GUÉRIN, M.; DOLPHIN, P. J.; CHAPMAN, M. J. A new in vitro method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB-containing lipoprotein subspecies. Identification of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma. **Arterioscler Thromb**, 14:199-206, 1994a.

GUÉRIN, M.; DOLPHIN, P. J.; CHAPMAN, M. J. A new in vitro method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB-containing lipoprotein subspecies. Identification of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma. **Arterioscler Thromb**, 14:199-206, 1994b.

GUÉRIN, M.; DOLPHIN, P. J.; CHAPMAN, M. J. Preferential cholesteryl ester acceptors among the LDL subspecies of subjects with familial hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb**, 14:679-85, 1994c.

GUÉRIN, M.; BRUCKERT, E.; DOLPHIN, P. J.; CHAPMAN, M. J. Absence of cholesteryl ester transfer protein-mediated cholesteryl ester mass transfer from high-density lipoprotein to low-density lipoprotein particles is a major feature of combined hyperlipidaemia. **Eur J Clin Invest**, 26:485-94, 1996.

GUERIN, M.; LASSEL, T. S.; LE GOFF, W. et al. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL 1 particles. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20:189-97, 2000.

GUÉRIN, M.; LE GOFF, W.; LASSEL, T. S.; VAN TOL, A.; STEINER, G.; CHAPMAN, M. J. Proatherogenic role of elevated CET from HDL to VLDL1 and dense LDL in type 2 diabetes: impact of the degree of triglyceridemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 21:282-8, 2001.

GUÉRIN, M.; LE GOFF, W.; FRISDAL, E.; SCHNEIDER, S.; MILOSAVLJEVIC, D.; BRUCKERT, E.; CHAPMAN, M. J. Action of ciprofibrate in type IIB hyperlipidemia: modulation of the atherogenic lipoprotein phenotype and stimulation of HDL-mediated cellular cholesterol efflux. **J Clin Endocrinol Metab**, 88:3738-46, 2003.

GUERRA, R.; WANG, S.; GRUNDY, S. M.; COHEN, J. C. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94:4532-7, 1997.

GUDNASON, V.; KAKKO, S.; NICAUD, V.; SAVOLAINEN, M. J.; KESANIEMI, Y. A.; TAHVANAINEN, E. et al. Cholesteryl ester transfer protein gene effect on CETP activity and plasma high-density lipoprotein in European populations. The EARS Group. **Eur J Clin Invest**, 29:116-28, 1999.

GUPTA, A. K.; ROSS, E. A.; MYERS, J. N.; KASHYAP, M. L. Increased reverse cholesterol transport in athletes. **Metabolism**, 42:684-90, 1993.

HA, Y. C.; BARTER, P. J. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. **Comp Biochem Physiol B**, 71:265-9, 1985.

HAFFNER, S. M. Diabetes, hyperlipidemia, and coronary artery disease. **Am J Cardiol**, 83:17-21, 1999.

HAMMAD, S. M.; STEINGRIMUR, S.; TWAL, W. O. et al. Cubulin, the endocytic receptor for factor-vitamina B12 complex, mediates high-density holoparticle endocytosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96:10158-63, 1999.

HANNUKSELA, M. L.; LIINAMAA, M. J.; KESANIEMI, Y. A.; SAVOLAINEN, M. J. Relation of polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene to transfer protein activity and plasma lipoprotein levels in alcohol drinkers. **Atherosclerosis**, 110:35-44, 1994.

HATA, A.; ROBERTSON, M.; EMI, M.; LALOUEL, J. Direct detection and automated sequencing of individual alleles after electrophoretic strand separation: identification of a common nonsense mutation in exon 9 of the human lipoprotein lipase. **Nucleic Acids Res**, 18:5407-11, 1990.

HAYASHIBE, H.; ASAYAMA, K.; NAKANE, T.; KOBAYASHI, K.; AMEMIYA, S.; NAKAZAWA, S. Decreased activity of plasma cholesteryl ester transfer protein in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Paediatr**, 88:1067-70, 1999.

HAYDEN, M. R.; LIU, M-S.; MA, Y. Gene environment interaction and plasma triglyceride levels: the crucial role of lipoprotein lipase. **Clin Genet**, 46:15-18, 1994.

HAYEK, T.; MASUCCI-MAGOULAS, L.; JIANG, X. et al. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. **J Clin Invest**, 96:2071-4, 1995.

HEGELE, R. A.; LITTLE, J. A.; VEZINA, A.; MAGUIRE, G. F.; TU, L.; WOLEVER, T. S., et al. Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 13:720-8, 1993.

HEGELE, R. A.; BRECKENRIDGE, W. C.; COX, D. W.; MAGUIRE, G. F.; LITTLE, J. A.; CONNELLY, P. W. Elevated LDL Triglyceride concentrations in subjects heterozygous for the hepatic lipase S267F variant. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 18:1212-6, 1998.

HENNESSY, L. K.; KUNNITAKE, S. T.; KANE, J. P. Alipoprotein A-I-containing lipoproteins, with or without apolipoprotein A-II, as progenitors of pre-B high density lipoprotein particles. **Biochemistry**, 32:5759-65, 1993.

HESLER, C. B.; SWENSON, T. L.; TALL, A. R. Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. **J Biol Chem**, 262:2275-823, 1987.

HILL, S. A.; NAZIR, D. J.; JAYARATNE, P.; BAMFORD, K. S.; MCQUEEN, M. J. Mutations in cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase in a North American population. **Clin Biochem**, 30:413-8, 1997.

HIRANO, K.; YAMASHITA, S.; FUNAHASHI, T.; SAKAI, N.; MENJU, M.; ISHIGAMI, M. et al. Frequency of intron 14 splicing defect of cholesteryl ester transfer protein gene in the Japanese general population -relation between the mutation and hyperalphalipoproteinemia. **Atherosclerosis**, 100: 85-90, 1993.

HIRANO, K.; YAMASHITA, S.; KUGA, Y.; SAKAI, N.; NOZAKI, S.; KIHARA, S. et al. Atherosclerotic disease in marked hyperlphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 15:1849-56, 1995.

- HIRANO, K.; 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. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:1053-9, 1997.
- HIRANO, K.; YAMASHITA, S.; MATSUZAWA, Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. **Curr Opin Lipidol**, 11:589-96, 2000.
- HODIS, H. N.; MACK, W. J.; Tryglyceride-rich lipoproteins and the progression of coronary artery disease. **Curr Opin Lipidol**, 6:209-14, 1995.
- HSU, L. A.; KO, Y. L.; HSU, K. A. et al. Genetic variations in the cholesteryl ester transfer protein gene and high density lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese Chinese. **Hum Genet**, 110:57-63, 2002.
- HUI, S. P. Frequency and effect on plasma lipoprotein metabolism of a mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene in the Chinese. **Hokkaido J Med Sci**, 72:319-27, 1997.
- HUUSKONEN, J.; OLKKONEN, V. M.; JAUHIAINEN, M.; EHNHOLM, C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. **Atherosclerosis**, 155:269-81, 2001.
- IKEWAKI, K.; MABUCHI, H.; TERAMOTO, T.; YAMADA, N.; OIKAWA, S.; SASAKI, J. et al for the Japan CETP Study Group. Association of cholesteryl ester transfer protein activity and TaqIB polymorphism with lipoprotein Variations in Japanese subjects. **Metabolism**, 52:1564-70, 2003.
- IKEWAKI, K.; NISHIWAKI, M.; SAKAMOTO, T.; ISHIKAWA, T.; FAIRWELL, T.; ZECH, L. A. et al. Increased catabolic rate of low density lipoproteins in humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. **J Clin Invest**, 96:1573-81, 1995.
- INAZU, A.; BROWN, M. L.; HESLER, C. B. et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. **N Engl J Med**, 323:1234-8, 1990.

INAZU, A.; KOIZUMI, J.; HARAKI, T.; YAGI, K.; WAKASUGI, T.; TAKEGOSHI, T. et al. Rapid detection and prevalence of cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by an intron 14 splicing defect in hyperalphalipoproteinemia. **Hum Genet**, 91: 13-16, 1993.

INAZU, A.; JIAN, 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. **J Clin Invest**, 94:1872-82, 1994.

INAZU, A.; KOIZUMI, J.; MABUCHI, H. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and increased HDL cholesterol levels (hyperalphalipoproteinemia). **Rinsho Byori**, 44: 322-6, 1996.

INAZU, A.; KOIZUMI, J.; KAJINAMI, K. et al. Opposite effects on serum cholesteryl ester transfer protein levels between long-term treatments with pravastatin and probucol in patients with primary hypercholesterolemia and xanthoma. **Atherosclerosis**, 145:405-13, 1999.

INAZU, A.; KOIZUMI, J.; MABUCHI, H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, 11:389-96, 2000.

ISHIGAMI, M.; YAMASHITA, S.; SAKAI, N.; ARAI, T.; HIRANO, K.; HIRAOKA, H. et al. Large and cholesteryl ester-rich high-density lipoproteins in cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency cannot protect macrophages from cholesterol accumulation induced by acetylated low-density lipoproteins. **J Biochem**, 116:257-62, 1994.

ISHIGAMI, M.; YAMASHITA, S.; SAKAI, N.; HIRANO, K.; ARAI, T.; MARUYAMA, T. High-density lipoproteins from probucol-treated patients have increased capacity to promote cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages loaded with acetylated low-density lipoproteins. **Eur J Clin Invest**, 4:285-92, 1997.

ISHIKAWA, T.; ITO, K.; AKASAKA, Y.; ISHII, T.; MASUDA, T.; ZHANG, L. et al. The distribution and production of cholesteryl ester transfer protein in human aortic wall. **Atherosclerosis**, 156:29-37, 2001.

- JENSEN, J.; NILAS, L.; CHRISTIANSEN, C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. **Maturitas**, 12:321-31, 1990.
- JANSEN, H.; VERHOEVEN, A. M.; WEEKS, L.; KASTELEIN, J. P.; HALLEY, D. J.; VANDENOUWELAND, A. et al. Common c-to-t substitution at position -480 of the hepatic lipase promoter associated with a lowered lipase activity in coronary artery disease patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:2837-42, 1997.
- JANSEN, H.; CHU, G.; EHNHOLM, C.; DALLONGEVILLE, J.; NICAUD, V.; TALMUD, P. J.; for the EARS Group. The T allele of the hepatic lipase promoter variant C-480T is associated with increased fasting lipids and HDL and increased preprandial and postprandial LpCIII:B. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19:303-8, 1999.
- JANSEN, H.; VERHOEVEN, A. J. M.; SIJBRANDS, J. G. Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein? **J Lipid Res**, 43:1352-62, 2002.
- JEPPESEN, J.; HEIN, H. O.; SUADICANI, P.; GYNTELBERG, F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. **Circulation**, 97:1029-36, 1998.
- JIANG, X.; MOULIN, P.; QUINET, E.; GOLDBERG, I. J.; YACOUB, L. K.; AGELLON, L. B. et al. Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. **J Biol Chem**, 266:4631-9, 1991.
- JIANG, X. C.; AGELLON, L. B.; WALSH, A.; BRESLOW, J. L.; TALL, A. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. **J Clin Invest**, 90:1290-5, 1992.
- JIANG, X-C. et al. Increased pre β -high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. **J Clin Invest**, 96:2373-80, 1996.
- JIANG, X. C.; BRUCE, C.; MAR, J.; LIN, M.; JI, Y.; FRANCONI, O. L.; TALL, A. R. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. **J Clin Invest**, 103:907-914, 1999.

- JIANG, X. C.; QIN, S.; QIAO, C.; KAWANO, K.; LIN, M.; SKOLD, A. et al. Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. **Nat Med**, 7:847-52, 2001.
- JIANG, X. C.; TALL, A. R.; QIN, S.; LIN, M.; SCHNEIDER, M.; LALANNE, F. et al. Phospholipid transfer protein deficiency protects circulating lipoproteins from oxidation due to the enhanced accumulation of vitamin. **E J Biol Chem**, 277:31850-6, 2002.
- JOANNIDES, R.; HAEFELI, W. E.; LINDER, L. et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilation of human peripheral conduit arteries in vivo. **Circulation**, 91:1314-9, 1995.
- JUKEMA, J. W.; VAN BOVEN, A. J.; GROENEMEIJER, B.; ZWINDERMAN, A. H.; REIBER, J. H. C.; BRUSCHKE, A. V. G. et al. The Asp⁹ Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. **Circulation**, 94:1914-8, 1996.
- KAHRI, J.; GROOP, P. H.; VIBERTI, G.; ELLIOTT, T.; TASKINEN, M. R. Regulation of apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in IDDM. **Diabetes**, 42: 1281-8, 1993.
- KAKKO, S.; TAMMINEN, M.; KESANIEMI, Y. A.; SAVOLAINEN, M. J. R451Q mutation in the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene is associated with high plasma CETP activity. **Atherosclerosis**, 136: 2333-240, 1998.
- KAKKO, S.; TAMMINEN, M.; PAIVANSALO, M.; KAUMA, H.; RANTALA, A. O.; LILJA, M. et al. Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms are associated with carotid atherosclerosis in men. **Eur J Clin Invest**, 30:18-25, 2000.
- KELSO, G. J.; STUART, W. D.; RICHETR, R. J. et al. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. **Biochemistry**, 33:832-9, 1994.
- KIMURA, H.; GEJYO, F.; YAMAGUCHI, T. et al. A cholesteryl ester transfer protein gene mutation and vascular disease in dialysis patients. **J Am Soc Nephrol**, 10:294-9, 1999.

KINOSHITA, M.; ARAI, H.; FUKASAWA, M.; WATANABE, T.; TSUKAMOTO, K.; HASHIMOTO, Y. et al. Apolipoprotein E enhances lipid exchange between lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein. **J Lipid Res**, 34:261-8, 1993.

KLERKX, A. H. E. M.; TANCK, M. W. T.; KASTELEIN, J. J. P.; MOLHUIZEN, H. O. F.; JUKEMA, J. W.; ZWINDERMAN, A. H. 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. **Human Molecular Genetics**, 12:111-23, 2003.

KNUDSEN, P.; ANTIKAINEN, M.; EHNHOLM, S.; UUSI-OUKARI, M.; TENKANEN, H.; LAHDENPERA, S. et al. A compound heterozygote for hepatic lipase gene mutations Leu334->Phe and Thr383->Met: correlation between hepatic lipase activity and phenotypic expression. **J Lipid Res**, 37:825-34, 1996.

KNUDSEN, P.; ANTIKAINEN, M.; UUSI-OUKARI, M.; EHNHOLM, S.; LAHDENPERA, S.; BENSADOUN, A. et al. Heterozygous hepatic lipase deficiency due to two missense mutations R186H and L334F in the HL gene. **Atherosclerosis**, 128:165-74, 1997.

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 hyperalphalipoproteinemia. **Atherosclerosis**, 58:175-86, 1985.

KONDO, I.; BERG, K.; DRAYANA, D. et al. DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. **Clin Genet**, 35:49-56, 1989.

KONTUSH, A.; CHANCARME, L.; ESCARGUEIL-BLANC, I.; THEROND, P.; SALVAYRE, R.; NEGRE-SALVAYRE, A.; CHAPMAN, M. J. Mildly oxidized LDL particle subspecies are distinct in their capacity to induce apoptosis in endothelial cells: role of lipid hydroperoxides. **FASEB J**, 1:88-90, 2003.

KONTUSH, A.; de FARIA E. C.; CHANTEPIE, S.; CHAPMAN, M.J. Antioxidative activity of HDL particle subspecies is impaired in hyperalphalipoproteinemia: relevance of enzymatic and physicochemical properties. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 3:526-33, 2004.

KUGIYAMA, K.; KERNS, S. A.; MORRISETT, J. D. et al. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. **Nature**, 344:160-2, 1990.

KUIVENHOVEN, J. A.; GROENEMEYER, B. E.; BOER, J. M. A.; REYMER, P. W. A.; BERGHUIS, R.; BRUIN, T. et al. Ser 447stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:595-9, 1997.

KUIVENHOVEN, J.A.; JUKEMA, J. W.; ZWINDERMAN, A.H. et al., for the Regression Growth Evaluation Statin Study Group. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. **N Eng J Med**, 338:86-93, 1998.

KUNNITAKE, S.; LA SADA, K.; KANE, J. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. **J Lipid Res**, 26:549-55, 1985

KUNNITAKE, S. T.; MENDEL, C. M.; HENNESSY, L. K. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. **J Lipid Res**, 33:1807-16, 1992.

KUUSI, T.; SAARINEN, P.; NIKKILA, E. A. Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein2 in man. **Atherosclerosis**, 36:589-93, 1980.

KUUSI, T.; EHNHOLM, C.; VIIKARI, J. et al. Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipase are determinants of hypo and hyperalphalipoproteinemia. **J Lipid Res**, 30: 1117-1126, 1989.

LAGROST, L.; GAMBERT, P.; DANGREMONT, V.; ATHIAS, A.; LALLEMANT, C. Role of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in the HDL conversion process as evidenced by using anti-CETP monoclonal antibodies. **J Lipid Res**, 31:1569-75, 1990.

LAGROST, L.; GANDJINI, H.; ATHIAS, A.; GUYARD-DANGREMONT, V.; LALLEMANT, C.; GAMBERT, P. Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 13:815-25, 1993.

LAGROST, L.; ATHIAS, A.; GAMBERT, P.; LALLEMANT, C. Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein **J Lipid Res**, 35:825-35, 1994a.

LAGROST, L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1215:209-236, 1994b.

LAGROST, L. The role of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein in the remodeling of plasma high-density lipoproteins. **Trends Cardiovasc Med**, 7:218-24, 1997.

LAGROST, L.; DESRUMAUX, C.; MASSON, D.; DECKERT, V.; GAMBERT, P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. **Curr Opin Lipidol**, 9:203-9, 1998.

LE GOFF, W.; GUÉRIN, M.; CHAPMAN, M. J.; Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. **Pharmacology & Therapeutics**, 101:17-38, 2004.

LEWIS-BARNED, N. J.; SUTHERLAND, W. H.; WALKER, R. J., WALKER, H. L.; DE JONG, S. A.; EDWARDS, E. A. et al. Plasma cholesterol esterification and transfer, the menopause, and hormone replacement therapy in women. **J Clin Endocrinol Metab**, 84:3534-8, 1999.

LIANG, H.Q.; RYE, K.A.; BARTER, P. J. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. **J Lipid Res**, 35:1187-99, 1994.

Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results. I. Reduction in the incidence of coronary heart disease. **JAMA**, 251:351-64, 1984.

LIU, S.; SCHMITZ, C.; STAMPFER, M. J. et al. A prospective study of the TaqIB polymorphism in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein and risk of myocardial infarction in middle-aged men. **Atherosclerosis**, 161:469-74, 2002.

LU, H; INAZU, A.; MORIYAMA, Y. et al. Haplotype analyses of cholesteryl ester transfer protein gene promoter: a clue to an unsolved mystery of taqIB polymorphism. **J Mol Med**, 81:246-55, 2003.

LUPATTELLI, G.; MARCHESI, S.; LOMBARDINI, R.; SIEPI, D.; BAGAGLIA, F.; PIRRO, M. et al. Mechanisms of high-density lipoprotein cholesterol effects on the endothelial function in hyperlipemia. **Metabolism**, 52(9):1191-5, 2003.

LUSA, S.; JAUHIAINEN, M.; METSO, J.; SOMERHARJU, P.; EHNHOLM, C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. **Biochem J**, 313:275-82, 1996.

LUTZ, E. P.; MERKEL, M.; KAKO, Y.; MELFORD, K.; RADNER, H.; BRESLOW, J. L. et al. Heparin-binding defective lipoprotein lipase is unstable and causes abnormalities in lipid delivery to tissues. **J Clin Invest**, 107:1183-92, 2001.

MACLEAN, P. S.; TANNER, C. J.; HOUMARD, J. A.; BARAKAT, H. A. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is not linked to insulin sensitivity. **Metabolism**, 50:783-8, 2001.

MARCEL, Y. L.; VEZINA, C.; MILNE, R. W. Cholesteryl ester and apolipoprotein E transfer between human high density lipoproteins and chylomicrons. **Biochim Biophys Acta**, 750:411-7, 1983.

MARCEL, Y. L.; McPHERSON, R.; HOGUE, M.; CZARNECKA, H.; ZAWADZKI, Z.; WEECK, P. K.; WHITLOCK, M. E.; TALL, A. R.; MILNE, R. W. Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects. **J Clin Invest**, 85:10-7, 1990.

- MAROTTI, K. R.; CASTLE, C. K.; BOYLE, T. P. et al. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. **Nature**, 364:73-5, 1993.
- MASSEY, J. B.; HICKSON, D.; SHE, H. S.; SPARROW, J. T.; VIA, D. P.; GOTTO, A. M. JR. et al. Measurement and prediction of the rates of spontaneous transfer of phospholipids between plasma lipoproteins. **Biochim Biophys Acta**, 794:274-80, 1984.
- MATSUDA, Y.; HIRATA, K.; INOUE, N. et al. High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation. **Circ Res**, 72:1103-9, 1993.
- MATSUZAKI, Y.; KAWAGUSHI, E.; MORITA, Y. et al. Evaluation of two kinds reagents for direct determination of HDL-Cholesterol. **J Anal Bio-Sc**, 419-27, 1996.
- MATSUZAWA, Y. et al.. Marked hyper-HDL₂-cholesterolemia associated with premature corneal opacity; a case report. **Atherosclerosis**, 62: 117-21, 1986.
- McNEISH, J.; FINER, A.G.; MORRISON, J.R. et al. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. **Proc Natl Acad Sci USA** 97:4245-50, 2000.
- McPHERSON, R.; MANN, C. J.; TALL, A. R.; HOGUE, M.; MARTIN, L.; MILNE, R. W.; MARCEL, Y. L. Plasma concentrations of cholesteryl ester transfer protein in hyperlipoproteinemia. Relation to cholesteryl ester transfer protein activity and other lipoprotein variables. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 11:797-804, 1991.
- MEDH, J. D. BOWEN, S. L.; FRY, G. L., et al. Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins *in vitro*. **J Biol Chem**, 271:17073-80, 1996.
- MEGURO, S.; TAKEI, I.; MURATA, M.; HIROSE, H.; TAKEI, N.; MITSUYOSHI, Y. et al. Cholesteryl ester transfer protein polymorphism associated with macroangiopathy in Japanese patients with Type 2 diabetes. **Atherosclerosis**. 156: 151-6, 2001.

- MERKEL, M.; WEINSTOCK, P. H.; CHAJEK-SHAUL, T. et al. Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. **J Clin Invest**, 102:893-901, 1998.
- MERKEL, M.; HEEREN, J.; DUDECK, W. et al. Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake *in vivo*, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. **J Biol Chem**, 277:7405-11, 2002.
- MERO, N.; VAN TOL, A.; SCHEEK, L. M.; VAN GENT, T.; LABEUR, C.; ROSSENEU, M. et al. Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. **J Lipid Res**, 39:1493-502, 1998.
- MILLER, G. J.; MILLER, N. E. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. **Lancet**, 1:16-25, 1975.
- MORI, A.; TAKAGI, A.; IKEDA, Y.; ASHIDA, Y.; YAMAMOTO, A. An AValI polymorphism in exon 5 of the human hepatic triglyceride lipase gene. **Mol Cell Probes**, 10:309-11, 1996.
- MORIYAMA, Y.; OKAMURA, T.; INAZU, A.; DOI, M.; ISO, H.; MOURI, Y. et al. A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. **Prev Med**, 27:659-67, 1998.
- MORTON, R. E. Free cholesterol is a potent regulator of lipid transfer protein. **J Biol Chem**, 263:12235-41, 1988.
- MORTON, R. E.; ZILVERSMIT, D.B. Inter-relationship of lipids transferred by the lipid-transfer protein isolated from human lipoprotein-deficient plasma. **J Biol Chem**, 258:11715-57, 1983.
- MORTON, R. E.; GREENE, D. J. Regulation of lipid transfer between lipoproteins by an endogenous plasma protein: selective inhibition among lipoprotein classes. **J Lipid Res**, 35:836-47, 1994.

MORTON, R.E. Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. **Curr Opin Lipidol**, 10:321-7, 1999.

MOULIN, P.; APPEL, G. B.; GINSBERG, H. N.; TALL, A. R. Increased concentration of plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome: role in dyslipidemia. **J Lipid Res**, 33:1817-22, 1992.

MOULIN, P.; CHEUNG, M.C.; BRUCE, C.; ZHONG, S.; COCKE, T.; RICHARDSON, H.; TALL, A. R. Gender effects on the distribution of the cholesteryl ester transfer protein in apolipoprotein A-I-defined lipoprotein subpopulations. **J Lipid Res**, 35:793-802, 1994.

MOULIN, P. Cholesteryl ester transfer protein: An Enigmatic Protein. **Horm Res**, 45:238-44, 1996.

MURTHY, V.; JULIEN, P.; GAGNE, C.; Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. **Pharmacol Ther**, 70:101-35, 1996.

MURTOMÄKI, S., TAHVANAINEN, E.; ANTIKAINEN, M.; TIRET, L.; NICAUD, V.; JANSEN, H. et al; on behalf of the European Atherosclerosis Research Study (EARS) Group. Hepatic lipase gene polymorphisms influence plasma HDL levels. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:1879-84, 1997.

NAGANO, M.; YAMASHITA, S.; HIRANO, K.; ITO, M.; MARUYAMA, T.; ISHIHARA, M. et al. Two novel missense mutations in the CETP gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects: high-throughput assay by invader assay. **J Lipid Res**, 43:1011-8, 2002.

NICHOLS, A. V.; SMITH, L. Effect of very low-density lipoproteins on lipid transfer in incubated serum. **J Lipid Res**, 58:206-10, 1965.

NIKKILA, E. A. High density lipoproteins in diabetes. **Diabetes**, 30:82-7, 1981.

NISHIDA, H. I.; ARAI, H.; NISHIDA, T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins, **J Biol Chem**, 268:16352-60, 1993.

NISHIDA, H. I.; NISHIDA, T. Phospholipid transfer protein mediates transfer of not only phosphatidylcholine but also cholesterol from phosphatidylcholine-cholesterol vesicles to high density proteins. **J Biol Chem**, 272:6959-64, 1997.

NORDESTGAARD, B. G.; ABILDGAARD, S.; WITTRUP, H. H.; STEFFENSEN, R.; JENSEN, G.; TYBJÆRG-HANSEN, A. Heterozygous lipoprotein lipase deficiency. Frequency in the general population, effect on plasma lipid levels, and risk of ischemic heart disease. **Circulation**, 96:1737-44, 1997.

OHNISHI, T.; YOKOYAMA, S. Activation of human plasma lipid transfer protein by apolipoproteins. **Biochemistry**, 32:5029-35, 1993.

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**, 43:1236-43, 2002.

OKAMOTO, H.; YONEMORI, F.; WAKITANI, K. OKAMOTO, H.; YONEMORI, F.; WAKITANI, K.; MINOWA, T.; MAEDA, K.; SHINKAI, H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. **Nature**, 406:203-7, 2000.

OLIVECRONA, T.; BENGTSSON-OLIVECRONA, G. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. **Curr Opin Lipidol**, 4:187-96, 1993.

OLIVEIRA, H. C.; CHOUINARD, R. A.; AGELLON, L. B.; BRUCE, C.; MA, L.; WALSH, A. et al. Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. Cis-acting sequences mapped in transgenic mice. **J Biol Chem**, 271:13183-8, 1996.

ORDOVAS, J. M.; CUPPLES, L. A.; CORELLA, D.; OTVOS, J. D.; OSGOOD, D.; MARTINEZ, A. et al. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: Framingham study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20:1323-39, 2000.

- PACKARD, C. J.; SHEPHERD, J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:3542-56, 1997.
- PALLAUD, C.; GUEGUEN, R.; SASS, C.; GROW, M.; CHENG, S.; SIEST, G. et al. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. **J Lipid Res**, 42:1879-90, 2001.
- PETIT, J. M.; DUONG, M.; MASSON, D.; BUISSON, M.; DUVILLARD, L.; BOUR, J.B et al. Serum adiponectin and metabolic parameters in HIV- 1- infected patients after substitution of nevirapine for protease inhibitors. **Eur J Clin Invest**, 8: 569-75.
- PIMSTONE, S. N.; CLEE, S. M.; GAGNE, S. E.; MIAO, L.; ZHANG, H.; STEIN, E. A.; HAYDEN, M. R. A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) results in altered postprandial chylomicron triglyceride and retinyl palmitate response in normolipidemic carriers. **J Lipid Res**, 37:1-10, 1996.
- PLUMP, A. S.; MASUCCI-MAGOULAS, L.; BRUCE, C. et al. Increased atherosclerosis in apoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19:1105-10, 1999.
- PUSSINEN, P. J.; JAUHIAINEN, M.; METSO, J.; TYYNELÄ, J.; EHNHOLM, C. Pig plasma phospholipid transfer protein facilitates HDL interconversion. **J Lipid Res**, 36:975-85, 1995.
- PUSSINEN, P. J.; JAUHIAINEN, M.; EHNHOLM, C. ApoA-II/apoA-I molar ratio in the HDL particle influences phospholipid transfer protein-mediated HDL interconversion. **J Lipid Res**, 38:12-21, 1997.
- QUINET, E.; TALL, A.; RAMAKRISHNAN, R.; RUDEL, L. Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. **J Clin Invest**, 87:1559-66, 1991.
- RADER, DJ.; IKEWAKI, K. Unravelling high density lipoprotein-apolipoprotein metabolism in human mutants and animals models. **Curr Opin Lipidol**, 7:117-23, 1996.

- RAMSAMY, T. A.; NEVILLE, T. A.-M.; CHAUHAN, B. M.; AGGARWAL, D.; SPARKS, D. L. Apolipoprotein A-I Regulates lipid hydrolysis by hepatic lipase. **J Biol Chem**, 275:33480-6, 2000.
- RAMSAMY, T. A.; BOUCHER, J.; BROWN, R. J.; YAO, Z.; SPARKS, D. L. HDL regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans and the hydrolysis of VLDL triacylglycerol. **J Lipid Res**, 44:733-41, 2003.
- RAO, S. N.; CORTESE, C.; MILLER, N. E.; LEVY, Y.; LEWIS, B. Effects of heparin infusion on plasma lipoproteins in subjects with lipoprotein lipase deficiency. Evidence for a role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of high-density lipoprotein subfractions in man. **FEBS Lett**, 150:255-9, 1982.
- RIFAI, N.; WARNICK, G. R.; McNAMARA, J. R.; BELCHER, J.D.; GRINSTEAD, G. F.; FRANTZ JR, I. D. Measurement of low-density lipoprotein cholesterol in serum: a status report. **Clin Chem**, 38:150-60, 1992.
- RITSCH, A.; AUER, B.; FÖGER, B.; SCHWARTZ, S.; PATSCH, J. R. Polyclonal antibody-based immunoradiometric assay for quantification of cholesteryl ester transfer protein. **J Lipid Res**, 34:673-9, 1993.
- RITSCH, A. et al. Deficiency of Cholesteryl Ester Transfer Protein - description of the molecular defect and the dissociation of cholesteryl ester and triglyceride transport in plasma. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:3433-41, 1997.
- RITSCH, A.; PATSCH, J. R. Cholesteryl ester transfer protein: gathering momentum as a genetic marker and drug target. **Curr Opin Lipidol**, 14:173-8, 2003.
- RITTER, M. C.; KANNAN, C. R.; BAGDADE, J. D. The effects of hypothyroidism and the replacement therapy on cholesteryl ester transfer. **J Clin Endocrinol Metab**, 81:797-800, 1996.
- RITTERSHAUS, C. W.; MILLER, D. P.; THOMAS, L. J.; PICARD, M. D.; HONAN, C. M.; EMMETT, C. D. et al. Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20:2106-12, 2000.

RYE, K-A.; GARRETY, K. H.; BARTER, P. J. Changes in the size of reconstituted high density lipoproteins during incubation with cholesteryl ester transfer protein: the role of apolipoproteins. **J Lipid Res**, 33:215-24, 1992.

RYE, K.A.; HIME, N. J.; BARTER, P. J. Evidence that cholesteryl ester transfer protein-mediated reductions in reconstituted high density lipoprotein size involve particle fusion. **J Biol Chem**, 272:3953-60, 1997.

SAKAI, N.; YAMASHITA, S.; HIRANO, K.; MENJU, M.; ARAI, T.; KOBAYASHI, K. et al. Frequency of exon 15 missense mutation (442D:G) in cholesteryl ester transfer protein gene in hyperalphalipoproteinemic Japanese subjects. **Atherosclerosis**, 114:139-45, 1995.

SAKAI, N.; SANTAMARINA-FOJO, S.; YAMASHITA, S.; MATSUZAWA, Y.; BREWER, B. JR.. Exon 10 skipping caused by intron 10 splice donor site mutation in cholesteryl ester transfer protein gene results in abnormal downstream splice site selection. **J Lipid Res**, 37: 2065-73, 1996.

SALAZAR, L. A.; MELO, C. E.; CAVALLI, S. A.; HINUY, H. M.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Micrometodo para extração de DNA genômico útil no diagnóstico molecular da hipercolesterolemia familiar. **Revista Brasileira de Analises Clinicas**, 33:11-6, 2001.

SAMMETT, D.; TALL, A. R. Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis. **J Biol Chem**, 260:6687-97, 1985.

SANTAMARINA-FOJO, S.; DUGI, K. A. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. **Curr Opin Lipidol**, 5:117-25, 1994.

SASAKI, J.; TANABE, Y.; TANAKA, H. et al. Elevated levels of HDL2 cholesterol and apo A-I in nacional class Japanese male maraton runners. **Atherosclerosis**, 70:175-7, 1988.

SATTLER, W.; LEVAK-FRANK, S.; RADNER, H. et al. Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase in transgenic mice results in increased alpha-tocopherol levels in skeletal muscle. **Biochem J**, 318:15-9, 1996.

SAVOLAINEN, M. J., HANNUKSELA, M.; SEPPAENEN, S.; KERVINEN, K.; KESAENIEMI, Y. A. Increased high-density lipoprotein cholesterol concentration in alcoholics is related to low cholesteryl ester transfer protein activity. **Eur J Clin Invest**, 20:593-9, 1990.

SCANU, A. M.; FLESS, G. M. Lipoprotein (a). Heterogeneity and biological relevance. **J Clin Invest**, 85:1709-15, 1990.

SCHLITT, A.; BICKEL, C.; THUMMA, P.; BLANKENBERG, S.; RUPPRECHT, H. J.; MEYER, J. et al. High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 23:1857-68, 2003.

SEIP, R. L.; MOULIN, P.; COCKE, T.; TALL, A.; KOHRT, W. M.; MANKOWITZ, K. et al. **Arterioscler Thromb**, 13:1359-67, 1993.

SEMENKOVICH, C. F.; CHEN, S. H.; WIMS, M. et al. Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. **J Lipid Res**, 30:423-31. 1989.

SERDYUK, A. P.; MORTON, R. E. Lipid transfer inhibitor protein activity deficiency in normolipidemic uremic patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:1716-24, 1997.

SERDYUK, A. P.; MORTON, R. E. Lipid transfer inhibitor protein defines the participations of lipoproteins in lipid transfer reactions: CETP has no preference for cholesteryl esters in HDL versus LDL. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19:718-26, 1999.

SHEPHERD, J.; Fibrates and statins in the treatment of hyperlipidemia: an appraisal of their efficacy and safety. **Eur Heart J**, 16:5-13, 1995.

SHOHET, R. V.; VEGA, G. L.; ANWAR, A.; GRUNDY, S. M., COHEN, J. C. Hepatic lipase promoter polymorphism in men with coronary artery disease: allele frequency and effects on hepatic lipase activity and plasma HDL-cholesterol concentrations. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 1999.

- SICH, D.; SAÏDI, Y.; GIRAL, P.; LAGROST, L.; EGLOFF, M.; AUER, C. et al. Hyperalphalipoproteinemia: Characterization of a cardioprotective profile associating increased high-density lipoprotein2 levels and decreased hepatic lipase activity. **Metabolism**, 47:965-73, 1998.
- SILLIMAN, K.; TALL, A. R.; KRETCHMER, N.; FORTE, T. M. Unusual high-density lipoprotein subclass distribution during late pregnancy. **Metabolism**, 42:1592-9, 1993.
- SIMONS P. C. G.; ALGRA A.; BOTS L. M. et al. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness. **Circulation**, 100:951-957, 1999.
- SINGARAJA, R. R.; FIEVET, C.; CASTRO, G.; JAMES, E. R.; HENNUYER, N.; CLEE, S. M. et al. Increased ABC1 activity protects against atherosclerosis. **J Clin Invest**, 110:35-42, 2002.
- SONG, G. J.; HAN, G. H.; CHAE, J. J.; NAMKOONG, Y.; LEE, H. K.; PARK, Y. B. et al. The effects of the cholesterol ester transfer protein gene and environmental factors on the plasma high density lipoprotein cholesterol levels in the Korean population. **Mol Cells**, 7: 615-9, 1997.
- SPEIJER, H.; GROENER, J. E.; VAN RAMSHORST, E.; VAN TOL, A. Different locations of cholesteryl ester transfer protein and phospholipids transfer protein activities in plasma. **Atherosclerosis**, 90:159-68, 1991.
- STAFFORINI, D. M.; ZIMMERMANN, G. A.; MCINTYRE, T. M. et al. The platelet activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low density lipoproteins. **Trans Am Assoc Physiol**, 106:44-63, 1993.
- STAMPFER, M. J.; SACKS, F. M.; SALVINI, S.; WILLETT, W. C.; HENNEKENS, C. H. A prospective study of cholesterol, apoproteins and the risk of myocardial infarction. **N Engl J Med**, 325:373-81, 1991.
- SU, Z.; ZHANG, S.; NEBERT, D. W.; ZHANG, L.; HUANG, D.; HOU, Y. et al. A novel allele in the promoter of the hepatic lipase is associated with increased concentration of HDL-C and decreased promoter activity. **J Lipid Res**, 43:1595-8, 2002.

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. **J Biol Chem**, 273:5033-6, 1998.

SUTHERLAND, W. H. F.; WALKER, R. J.; LEWIS-BARNED, N. J. et al. The effect of acute hyperinsulinemia on plasma cholesteryl ester transfer protein activity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and healthy individuals. **Metabolism**, 43:1362-6, 1994.

TAHVANAINEN, E.; SYVÄNNE, M.; FRICK, M. H.; MURTO MÄKI-REPO, S.; ANTIKAINEN, M.; KESÄNIEMI, Y. A. et al. Association of variation in hepatic lipase activity with promoter variation in the hepatic lipase gene. **J Clin Invest**, 101:956-60, 1998.

TAHVANAINEN, E.; JAUHIAINEN, M.; FUNKE, H.; VARTIAINEN, E.; SUNDVALL, J.; EHNHOLM, C. Serum phospholipid transfer protein activity and genetic variation of the PLTP gene. **Atherosclerosis**, 146:107-15, 1999.

TAKAGI, A.; IKEDA, Y.; MORI, A.; ASHIDA, Y.; YAMAMOTO, A. Identification of a BstNI polymorphism in exon 9 of the human hepatic triglyceride lipase gene. **Mol Cell Probes**, 10:313-4, 1996.

TAKAHASHI, K.; JIANG, X. C.; SAKAI, N.; YAMASHITA, S.; HIRANO, K.; BUJO, H. et al. A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins. **J Clin Invest**, 92:2060-4, 1993.

TALL, A. R. Plasma lipid transfer proteins. **J Lipid Res**, 27:361-7, 1986.

TALL, A. R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. **J Lipid Res**, 34:1255-74, 1993.

TALL, A. Plasma lipid transfer proteins. **Annu Rev Biochem**, 64:235-57, 1995.

TALL, A.; SHARP, D.; ZHONG, S.; HAYEK, T.; MASUCCI-MAGOULAS, L.; RUBIN, E. M.; BRESLOW, J. L. Cholesteryl ester transfer protein and atherogenesis. **Ann NY Acad Sci**, 811:178-84, 1997.

TALL, A. R.; JIANG, X.; LUO, Y. et al. Lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20:1185-8, 2000.

TALMUD, P. J.; HUMPHRIES, S. E. Genetic polymorphisms, lipoproteins and coronary artery disease risk. **Curr Opin Lipidol**, 12:405-9, 2001.

TAMMINEN, M.; KAKKO, S.; KESANIEMI, Y. A.; SAVOLAINEN, M. J. A polymorphic site in the 3' untranslated region of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene is associated with low CETP activity. **Atherosclerosis**, 124:237-47, 1996.

TAN, K. C.; SHIU, S. W.; JANUS, E. D.; LANE, K. S. LDL subfractions in acromegaly: relation to growth hormone and insulin-like growth factor-I. **Atherosclerosis**, 129:59-65, 1997.

TAN, K. C. B.; SHIU, S. W. M.; KUNG, A. W. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hyper- and hypothyroidism. **J Clin Endocrinol Metab**, 83:140-143, 1998.

TASKINEN M.R.; GLUECK, C. J.; KASHYAP, M. L. et al. Post-heparin plasma lipoprotein and hepatic lipases. Relationships to high density lipoprotein cholesterol and to apolipoprotein CII in familial hyperalphalipoproteinemic and in normal subjects. **Atherosclerosis**, 37: 247-256, 1980.

TEH, E. M.; DOLPHIN, P. J.; BRECKENRIDGE, W. C.; TAN, M. H. Human plasma CETP deficiency: identification of a novel mutation in exon 9 of the CETP gene in a Caucasian subject from North America. **J Lipid Res**, 39: 442-56, 1998.

The WOSCOPS Study Group. Screening experience and baseline characteristics in the West of Scotland Coronary Prevention Study. **Am J Cardiol**, 76:485-91, 1995.

THUREN, T. Hepatic lipase and HDL metabolism. **Curr Opin Lipidol**, 11:277-83, 2000.

TOIKKA, J. O.; AHOTUPA, M.; VIIKARI, J. S. et al. Constantly low HDL-cholesterol concentration relates to endothelial dysfunction and increased in vivo LDL-oxidation in healthy young men. **Atherosclerosis**, 147:133-8, 1999.

TOLLEFSON, J. H.; FAUST, R.; ALBERS, J. J.; CHAIT, A. Secretion of a lipid transfer protein by human monocyte-derived macrophages. **J Biol Chem**, 260:5887-90, 1985.

TOLLEFSON, J. H.; RAVNIK, S.; ALBERS, J. J. Isolation and characterization of a phospholipid transfer protein (LTP-II) from human plasma. **J Lipid Res**, 29:1593-02, 1988.

TU, A.Y.; NISHIDA, H. I.; NISHIDA, T. High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. **J Biol Chem**, 268:23098-105, 1993.

UITTENBOGAAR, A.; SHAUL, P. W.; YUHANNA, I. S., et al. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. **J Biol Chem**. 275:11278-83, 2000.

VAISMAN, B.L.; LAMBERT, G.; AMAR, M.; JOYCE, C.; ITO, T., SHAMBUREK, R.D. et al. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. **J Clin Invest**, 2:303-9, 2001.

VAN TOL, A. Phospholipid transfer protein. **Curr Opin Lipidol**, 13:135-9, 2002.

VAN'T HOOFT, F. M.; LUNDAHL, B.; RAGOGNA, F.; KARPE, F.; OLIVECRONA, G.; HAMSTEN, A. Functional characterization of 4 polymorphisms in promoter region of hepatic lipase gene. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20:1335-47, 2000.

VON ECKARDSTEIN, A.; ASSMANN, G. Prevention of coronary disease by raising high-density lipoprotein cholesterol? **Curr Opin Lipidol**, 11:627-37, 2000.

WANG, J.; QIANG, H.; CHEN, D.; ZHANG, CH.; ZHUANG, Y. CETP gene mutation (D442G) increases low-density lipoprotein particle size in patients with coronary heart disease. **Clin Chem Acta**, 322:85-90, 2002.

WATSON, A. D.; BERLINER, J. A.; HAMA, S. Y. et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **J Clin Invest**, 96:2882-2891, 1995.

WITTRUP, H. H.; TYBJÆRG-HANSEN, A.; NORDESTGAARD, B. G. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease: a meta-analysis. **Circulation**, 99:2901-7, 1999.

WONG, H.; YANG, D.; HILL, J. S.; DAVIS, R. C.; NIKAZY, J.; SCHOTZ, M. C. A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:5594-8, 1997.

XIA, P.; WANG, J.; MORETTI, P. A. et al. Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J Biol Chem*, 277:7996-8003, 2002.

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 protein activity. *Atherosclerosis*, 70:7-12, 1988.

YAMASHITA, S.; SPRECHER, D. L.; SAKAI, N.; MATSUZAWA, Y.; TAURI, S.; HUI, D. Y. Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic human subjects with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest*, 86:688-95, 1990.

YAMASHITA, S.; ISHIGAMI, M.; ARAI, T. Very high density lipoproteins induced by plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) have a potent antiatherogenic function. *Ann N Y Acad Sci*, 748:606-8, 1995.

YAMASHITA, S.; MARUYAMA, T.; HIRANO, K.; SAKAI, N.; NAKAJIMA, N.; MATSUZAWA, Y. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 152:271-85, 2000.

YANG, X. P.; YAN, D.; QIAO, C.; LIU, R. J.; CHEN, J-G.; LI, J. et al. Increased atherosclerotic lesions in apoE mice with plasma phospholipid transfer protein expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:1601-7, 2003.

YEN, F. T.; DECKELBAUM, R. J.; MANN, C. J.; MARCEL, Y. L.; MILNE, R. W.; TALL, A. R. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody. Effects on cholesteryl ester formation and neutral lipid mass transfer in human plasma. *J Clin Invest*, 83: 2018-24, 1989.

ZAMBON, A.; DEEB, S. S.; PAULETTO, P.; CREPALDI, G.; BRUNZELL, J. D. Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. **Curr Opin Lipidol**, 14:179-89, 2003.

ZARATIN, A. C.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; ROCHA, J. C.; NUNES, V. S.; NAKANDAKARE, E. R. et al. Acute in vivo chylomicron metabolism and postprandial lipoprotein alterations in normolipidemic male smokers. **Clin Chim Acta**, 305:99-105, 2001.

ZHONG, S.; SHARP, D. S.; GROVE, J. S.; BRUCE, C.; YANO, K.; CURB, J. D. et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. **J Clin Invest**, 97:2917-23, 1996.