

FERNANDA DUTRA SANTIAGO

**MODULAÇÃO FUNCIONAL E GÊNICA DE LÍPIDES E
LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICOS E DA ATEROSCLEROSE
CAROTÍDEA NA HIPERALFALIPOPROTEINEMIA**

CAMPINAS

Unicamp

2007

FERNANDA DUTRA SANTIAGO

**MODULAÇÃO FUNCIONAL E GÊNICA DE LÍPIDES E
LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICOS E DA ATEROSCLEROSE
CAROTÍDEA NA HIPERALFALIPOPROTEINEMIA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica
área de concentração em Ciências Básicas

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ELIANA COTTA DE FARIA

CAMPINAS

Unicamp

2007

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa59m Santiago, Fernanda Dutra
Modulação funcional e gênica de lípidos e lipoproteínas plasmáticas e da aterosclerose carotídea na hiperalfalipoproteinemia. / Fernanda Dutra Santiago. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Eliana Cotta de Faria
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose. 2. Metabolismo. 3. Lipoproteínas. I.
Faria, Eliana Cotta de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em ingles: Functional and genic modulation of serum lipids and lipoproteins of carotid atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemia

Keywords: • Atherosclerosis
 . Metabolism
 . Lipoproteins

Área de Concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

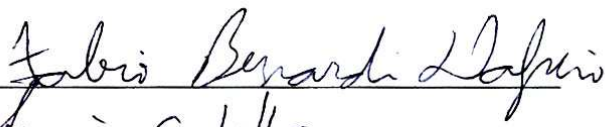
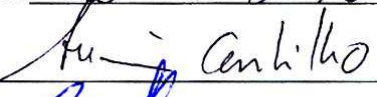
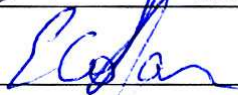
**Banca examinadora: Prof^{ra}.Dr^a. Eliana Cotta de Faria
 Prof^o.Dr^o.Fabio Bernardi Dalpino
 Prof^{ra} Dr^a.Lucia Nassi Castilho**

Data da defesa: 31 - 08 – 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Profª Drª. ELIANA COTTA DE FARIA

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Fabio Bernardi Dalpino 
2. Prof(a). Dr(a). Lucia Nassi Castilho 
3. Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria 

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 31/08/2007

*Aos meus queridos e
amados pais,
Darci e Alcebíades,*

*Ao meu amor,
Antonio José Bassora Junior,*

*A minha amada amiga
Flávia Fernanda Prado (in memorian).*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dra. Eliana Cotta de Faria, pela excelente orientação, pelo seu grande estímulo na realização de todas as etapas do meu mestrado, pela dedicação constante, por acreditar em meu potencial e principalmente pela amizade.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Clínica Médica área de concentração em Ciências Básicas/Faculdade de Ciências Médicas (FCM)/Unicamp pelo apoio para que eu cumprisse esta etapa.

Ao Dr. Rui T. Nakamura do Departamento de Radiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e da Clínica Diagnóstico por Imagem pela participação fundamental neste estudo.

À Professora Dra. Lucia Nassi Castilho, pelo incentivo, atenção e auxílio.

A toda a equipe do Laboratório de Lípidos do NMCE e da Seção de Bioquímica Clínica/HC em especial, Aparecida, Miriam, Marielza, Hilda e Dr. Roberto.

As amigas Aline, Carla, Larissa, Harumi pelos momentos de estudo, de risos e acima de tudo pela amizade e à Dra. Vera pela ajuda na correção da tese.

Ao Laboratório de Lípidos da USP (LIM 10)/HC da Universidade de São Paulo, em colaboração com Prof. Dr. Éder Quintão e Dra. Edna Nakandakare.

À Professora Dra. Helena Coutinho de Oliveira e Professor Dr. Antonio Carlos Boschero do Depto de Fisiologia do IB/Unicamp por abrirem as portas de seus laboratórios para a realização de parte das análises moleculares.

Ao Laboratório de Lípidos da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto em colaboração com Julia Keiko e Prof. Dr. José Ernesto Santos.

Ao Helymar Machado do Serviço de Bioestatística da FCM/Unicamp, pela excelente consultoria estatística.

Aos meus irmãos Anderson e Adriano e meus tios Agnaldo e Lucilene, tão queridos, que além de todo carinho e apoio foram fundamentais para realização de meu trabalho.

A todos os voluntários que possibilitaram este estudo.

*“O valor das coisas
não está no tempo em que elas duram,
mas,
na intensidade com que as coisas acontecem.*

*Por isso,
existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis,
e pessoas incomparáveis”*

Fernando Pessoa

	Pág.
RESUMO.....	<i>xxiii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxix</i>
1- INTRODUÇÃO.....	33
1.1- Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e seu Metabolismo.....	35
1.2- Lipase Hepática.....	38
1.2.1- Polimorfismos Relacionados ao Gene da Lipase Hepática.....	41
1.3- Polimorfismo -514C/T da Região Promotora do Gene da Lipase Hepática.....	42
1.4- Polimorfismo I405V do Gene da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CETP).....	44
1.5- Hiperalfalipoproteinemia (Hiper-A).....	46
2- OBJETIVOS.....	49
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1- Análises Laboratoriais.....	57
3.2- Atividades da Lipase Hepática e Lipoproteína Lipase.....	57
3.3- Atividade da Proteína de Transferência de ésteres de Colesterol.....	58
3.4- Atividade da Proteína de Transferência de Fosfolípidos.....	59
3.5- Análises Moleculares: Extração de DNA.....	59
3.6- Detecção dos Polimorfismos.....	60
3.7- Medida da Espessura da Camada Íntima - Média das Artérias Carótidas (EIM).....	62
3.8- Análises Estatísticas.....	63

4- RESULTADOS.....	65
Trabalho Científico 1- Protective modulation of carotid atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemic individuals.....	67
Trabalho Científico 2- Hepatic lipase –514C/T polymorphism is not associated with high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, hepatic lipase activity and common carotid intima-media thickness in brazilian hyperalphalipoproteinemics.....	87
Trabalho Científico 3- Similarities in the regulation of plasma lipids, lipoproteins and regulating proteins by HL –514C/T and CETP I405V polymorphisms in hyperalphalipoproteinemia.....	99
5- DISCUSSÃO GERAL.....	115
6- CONCLUSÃO GERAL.....	121
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
8- ANEXO.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

Apo AI	apolipoproteína AI
ApoB	apolipoproteína B
Apo CIII	apolipoproteína CIII
Apo E	apolipoproteína E
CETP	proteína de transferência do éster de colesterol (<i>cholesteryl ester transfer protein</i>)
CTL	controles
DAC	doença arterial coronariana
EC	ésteres de colesterol
FL	fosfolípidos
Hiper-A	hiperalfalipoproteinemia/nêmicos
HDL	lipoproteína de alta densidade (<i>high-density lipoprotein</i>)
HDL₂	subfração 2 de lipoproteína de alta densidade
HDL₃	subfração 3 de lipoproteína de alta densidade
HSPG	proteoglicanos de heparan sulfato (<i>heparan sulphate proteoglycans</i>)
IDL	lipoproteína de densidade intermediária (<i>intermediate-density lipoprotein</i>)
LCAT	lecitina colesterol aciltransferase (<i>lecithin-cholesterol acyltransferase</i>)
LDL	lipoproteína de densidade baixa (<i>low-density lipoprotein</i>)
LH	lipase hepática (<i>hepatic lipase</i>)
LIPC	gene da lipase hepática
LPL	lipoproteína lipase (<i>lipoprotein lipase</i>)
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidos (<i>phospholipid transfer protein</i>)
QM	quilomícrons
SR-B1	receptor de varredura de classe B tipo 1 (<i>scavenger receptor class B 1</i>)
TG	triglicérides
TRC	transporte reverso de colesterol
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa (<i>very-low density lipoprotein</i>)

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Potencial Pró e Anti-Aterogênico da Lipase Hepática.....	40
Tabela 2 Frequências do Polimorfismo -514C/T do Gene da Lipase Hepática: Diversos Estudos Mundiais.....	44
Tabela 3 Frequências do Polimorfismo I405V do Gene da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol: Diversos Estudos Mundiais.....	46

LISTA DE FIGURA

	Pág.
Figura 1 Exemplo de imagem ultra-sonográfica da camada íntima-média da artéria carótida comum esquerda.....	63

RESUMO

Está bem estabelecida na literatura especializada a associação inversa entre as concentrações plasmáticas de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e a incidência de doença arterial coronariana (DAC). Além de propriedades anti-oxidante, anti-inflamatória e anti-trombótica, a HDL participa do transporte reverso de colesterol, via pela qual o colesterol é captado das lipoproteínas e das membranas células periféricas e transportado ao fígado para sua excreção na forma livre ou de ácidos biliares.

A lipase hepática (LH) possui função crucial no transporte reverso do colesterol, por sua atividade lipolítica e pela função de ligante à lipoproteínas facilitando sua captação tissular. A proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), e mesma importância metabólica, promove a troca de ésteres de colesterol por triglicérides entre a HDL e as lipoproteínas ricas em triglicérides. Mutações nos genes que codificam estas proteínas têm sido muito estudadas para se compreender a função destas no metabolismo lipídico.

O modelo experimental da hiperalfalipoproteinemia tem sido utilizado no decorrer dos últimos anos com o intuito de elucidar os mecanismos de ação da HDL e das proteínas reguladoras do seu metabolismo. A hiperalfalipoproteinemia é caracterizada pelo aumento das concentrações de HDL-C e é causada principalmente por deficiências genética de CETP e/ou LH.

Os objetivos desta dissertação foram o de se estabelecer à modulação da hiperalfalipoproteinemia sobre os parâmetros antropométricos, bioquímicos, moleculares (–514C/T do gene da LH e I405V do gene da CETP) e radiológicos (espessura da camada íntima média de carótidas) em uma amostra populacional brasileira.

O estudo foi conduzido em 291 voluntários de ambos os sexos, classificados como hiperalfalipoproteinêmicos (Hiper-A), HDL-C ≥ 68 mg/dL, ou controles, HDL-C < 68 e ≥ 32 mg/dL, de acordo com o valor do percentil 90, obtido em um estudo prévio do Laboratório de Lípidos a partir população normolipidêmica.

Os polimorfismos LH-514C/T e CETP I405V foram identificados através de técnicas de reação em cadeia polimerase (PCR) e a espessura da camada íntima-média de carótidas (EIM) pela ultra-sonografia de alta resolução.

Em um primeiro trabalho observou-se em um sub-grupo de 169 indivíduos, com a medida da EIM, que somente a idade foi correlacionada com a EIM na hiperalfalipoproteinemia, enquanto que em controles houve modulação positiva pela idade, sexo masculino, pressão arterial sistólica, e controversamente com relatos da literatura, com HDL-C. Apesar de Hiper-A possuir um perfil com maior número de fatores de risco cardiovasculares, a semelhança encontrada na EIM de carótidas, assim como, da frequência de EIM maior que 1 mm poderia, em parte, ser explicada pela grande diferença de modulação entre os grupos apontando para um traço protetor contra a aterosclerose carotídea em hiperalfalipoproteinemia. A ateroproteção reduzida em controles, tanto em homens quanto em mulheres, está de acordo com a observada associação negativa neste grupo entre EIM e a CETP com possível presença de HDL com a composição química alterada (ricas em TG e pobres em ésteres de colesterol), e ocorreu possivelmente no sub-grupo masculino, com perfil pró-aterogênico evidente.

Em um segundo trabalho, no sub-grupo de 169 indivíduos, com a medida da EIM, foi avaliado o efeito do polimorfismo LH-514C/T sobre a espessura da camada íntima-média de carótidas na hiperalfalipoproteinemia. Não se observou nenhuma variação de EIM em ambos os grupos em função deste polimorfismo. Quando comparados os grupos, o genótipo CC do polimorfismo LH-514C/T mostrou apenas tendência a maior EIM de carótidas em hiperalfalipoproteinemia ($p < 0,09$), mas a frequência de EIM maior que 1 mm foi igual.

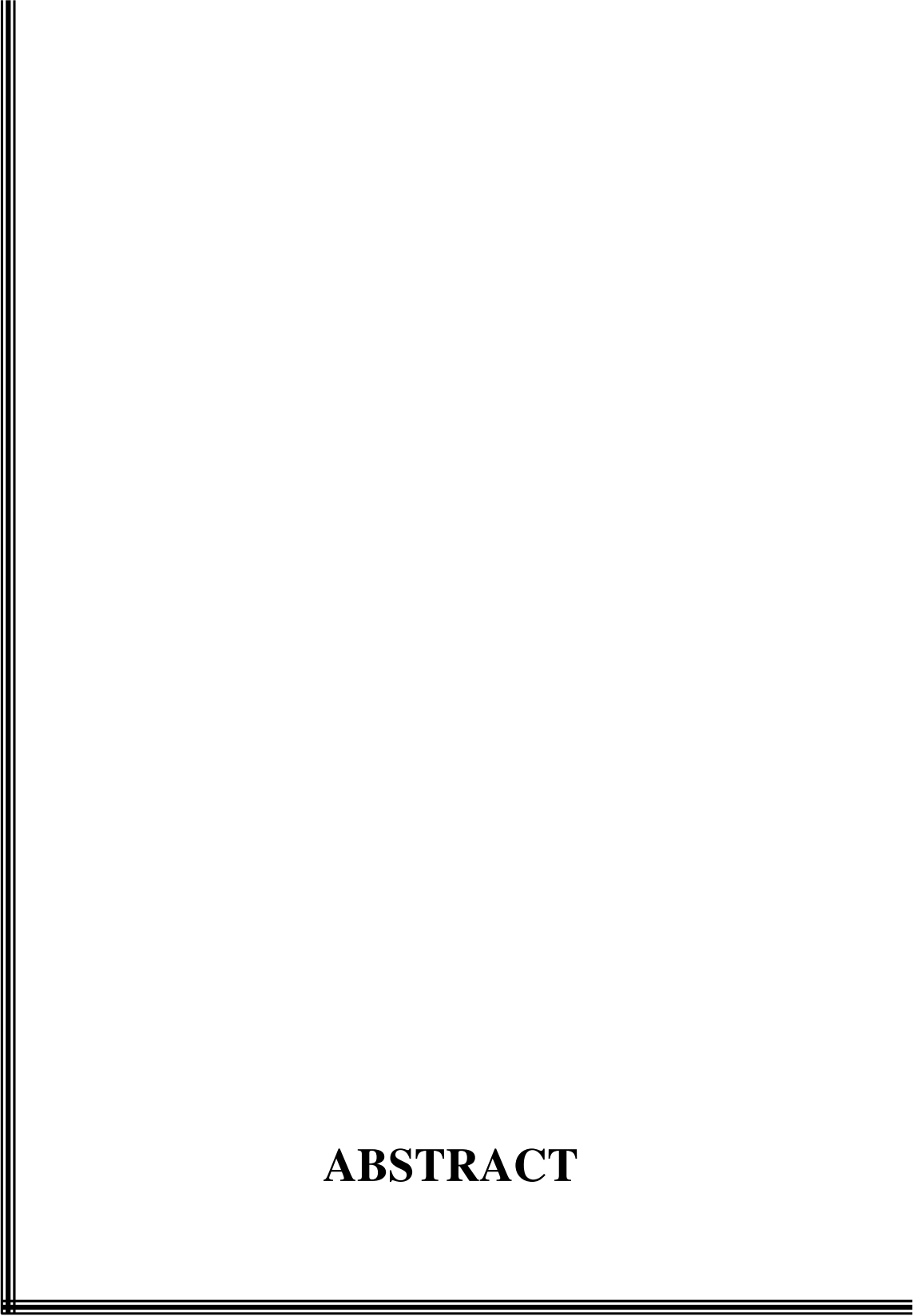
Em um terceiro trabalho, em 282-291 indivíduos foram avaliadas as semelhanças de frequências entre os polimorfismos LH-514C/T e CETP I405V na hiperalfalipoproteinemia e normolipidemia. Ambos apresentaram altas frequências, similares entre grupos e entre o polimorfismo LH-514C/T, CC 39%, CT+TT 61%; e o polimorfismo CETP I405V: II 26%, IV+VV 74% e CTL: CC 40%, CT+TT 60%, II 43% e IV+VV 57%.

Descrevemos o polimorfismo LH-514C/T na hiperalfalipoproteinemia os TT vs CC apresentaram cintura menor, concentrações mais baixas de colesterol plasmático (C), fosfolípides (FL), LDL-C, estimativa do tamanho da LDL (LDL-C/ApoB).

O polimorfismo CETP I405V na hiperalfalipoproteinemia em VV vs II, mostrou alta pressão arterial sanguínea e menores concentrações plasmáticas de HDL₂TG e HDL₃TG.

O genótipo IV teve maiores concentrações plasmáticas de ApoAI e pressão arterial diastólica quando comparado com o genótipo II.

Em resumo esta dissertação aponta para efeitos ateroprotetores ou neutros da hiperalfalipoproteinemia em uma amostra de população brasileira sobre a aterosclerose carotídea, inclusive no polimorfismo LH -514C/T. Os polimorfismos LH-514C/T e CETP I405V foram muito semelhantes com relação aos lípides e lipoproteínas séricos, mas não às proteínas reguladoras, oferecendo modulação protetora na hiperalfalipoproteinemia.



ABSTRACT

There is an inverse relationship between plasma concentration of high-density lipoprotein (HDL-C) and the risk of coronary arterial disease (CAD). Beyond anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-thrombotic properties, HDL plays a role on the reverse cholesterol transport, where cholesterol is taken from lipoproteins and peripheral cells to the liver for excretion. Hepatic lipase (HL) plays a key role in this process, by its lipolytic activities and ligand functions. Cholesterol ester transfer protein (CETP), of equal metabolic importance, facilitates the exchange of cholesterol ester and triglycerides between HDL and triglyceride rich-lipoproteins. Mutations and polymorphisms of these enzymes have been studied in order to evaluate its activity and metabolic consequences. Hyperalphalipoproteinemia (Hyper-A) has been used in the latest years with the purpose of evaluating the anti and pro-atherogenic mechanisms of HDL and of regulating proteins.

The aim of this work was to establish the modulation of hyperalphalipoproteinemia in relation to controls on the anthropometric, biochemical, radiological and molecular manifestations.

This study was conducted on 291 volunteers, classified as Hyper-A, HDL-C $\geq$ 68mg/dL and controls, HDL-C <68 e 32 mg/dL according to the percentile 90th, obtained from a local normolipidemic population study. We determined clinic data, lipid, lipoproteins and radiological parameters of volunteers. The HL-514C/T and CETP I405V polymorphism were determined by polymerase chain reaction methods. The carotid intima-media thickness measurements were performed high performance ultrasound.

We showed in the first manuscript that although possessing a higher risk coronary vascular disease profile the similarity found in carotid could in part be explained by the striking differences in its modulation between the two groups, indicating a protective trait against carotid atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemia. In the Hyper-A population, was only correlated with age, while in controls had a positive correlation with age, male sex, systolic blood pressure, and surprisingly with HDL-C. This dissociation between IMT and HDL-C could be accounted for by a small HDL particle number in CTL.

In the manuscript 2, the -514C/T polymorphism did not contribute to variations in the carotid IMT and Hyper-A did not modulate the IMT variations, contrary to Rundek et al., (2002) who investigated the -514C/T polymorphism on variations in the carotid IMT

in 87 stroke-free subjects suggested that CC genotypes had increase of carotid IMT, FMT and HALP.

The HL-514C/T e CETP I405V polymorphisms, were no associate, were highly prevalent in the two groups but were not associated with HDL-C.

In Hyper-A, LH-514C/T induced lower plasma cholesterol (C), phospholipids (PL), LDL-C and LDL size (LDL-C/ApoB). In Hyper-A CETP I405V decreased blood pressure, reduced TG in HDL subfractions 2 and 3 of (HDL₂TG and HDL₃TG) and increase ApoAI. The HL -514C/T polymorphism in Hyper-A the TT vs CC had lower waist hip-circumference, cholesterol (C) concentrations, phospholipids (PL), LDL-C and estimated size particle by LDL-C/ApoB. The genotype TT was different between 2 groups: in Hyper-A with relation the CTL, had lower HL, estimated size particle by TG/HDL-C and higher HDL₂C, HDL₃C, HDL₃TG, ApoAI and C concentrations and had higher C, estimated size particle by LDL-C/ApoB, ApoAI, HDL₂C, HDL₃C and estimated size particle by TG/HDL-C. The CETP I405V polymorphism in Hyper-A, the VV vs II had higher Systolic Blood Pressure and lower HDL₂TG e HDL₃TG concentrations. The IV genotype had higher ApoAI concentration and Diastolic Blood Pressure. In Hyper A, the VV genotype had higher HDL₂C, HDL₃C, ApoAI, e TG concentrations and reduced concentration of VLDL- and estimated size particle of LDL by TG/HDL-C.

In summary, this work indicates an athero-protector and neutral effect on the carotid atherosclerosis in Hyper-A between HL-514C/T and CETP I405V polymorphisms both modulated for plasma lipids more atheroprotective.

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e seu Metabolismo

Já está bem estabelecida na literatura a associação inversa entre as concentrações plasmáticas de colesterol nas lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e a incidência de doença arterial coronariana (DAC) (Assman et al., 2004; Isaacs et al., 2007). Um Estudo Prospectivo conduzido nos Estados Unidos demonstrou que o aumento de 1mg/dL na concentração de HDL-C, diminui em 2 a 3% o risco de DAC (Gordon et al., 1989). Castelli (1996) também demonstrou que um aumento de 10mg/dL nas concentrações de HDL-C parece estar associado a uma redução de 42% de DAC.

Em um trabalho recente Ohashi et al. (2005) demonstraram que baixas concentrações de HDL₂ e HDL₃ estão associadas com o aumento da progressão da aterosclerose e com o risco de doença cardiovascular. Por outro lado, Matsuzawa et al. 1986 relacionaram o aumento das concentrações de HDL-C com presença de opacidade pré-matura das córneas, sinalizando o acúmulo de lípidos nos tecidos.

Parte do papel anti-aterogênico da HDL é representado pelo transporte de colesterol dos tecidos periféricos ao fígado, por meio do transporte reverso de colesterol (TRC) (Lupatelli et al., 2003; Curtiss et al., 2006; Isaacs et al., 2007), o qual permite a redistribuição de lípidos entre as lipoproteínas, às células e a HDL. No TRC ocorre o transporte de colesterol ao fígado para ser excretado, ou para outras lipoproteínas captadas pelo fígado (Stampfer et al., 1999; Kontush et al., 2006).

No entanto, também são descritas as propriedades anti-oxidante, anti-trombótica e antiinflamatória, da HDL, independente dos efeitos no transporte reverso de colesterol (Barter et al., 2004; Choi et al., 2006), as quais são moduladas pela inibição de uma enzima conhecida como esfingosina quinase nas células endoteliais, esta diminui a ação da esfingosina 1-fosfato, uma molécula chave no processo inflamatório que também é mediada pelo fator de necrose tumoral (TNF) (Barter et al., 2004; Choi et al., 2006).

O TRC é a via pelo qual o colesterol acumulado na parede dos vasos é transportado para o fígado para sua excreção, prevenindo assim o desenvolvimento da aterosclerose (Ohashi et al. 2005). A HDL origina-se de três fontes: do fígado que secreta

um disco de fosfolípides e Apo-AI chamado HDL nascente ou precursor de HDL; do intestino que sintetiza diretamente pequenas partículas de HDL contendo Apo-AI e da hidrólise de partículas ricas em TG, quilomícrons (QM) e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), que liberam componentes da superfície como Apos A-I, fosfolípides (FL) e colesterol formando pequenos discos precursores de HDL (Mahley et al., 2006).

Estes pequenos discos são designados HDL pré- β_1 , pré- β_2 e pré- β_3 e são excelentes aceptores de colesterol livre (CL) de membranas celulares, recebendo excesso de colesterol de outras lipoproteínas (Lupatelli et al., 2003). A pré- β HDL acomoda somente uma parte de CL. Porém com a esterificação do colesterol (com a cadeia longa de ácidos graxos) e formação dos ésteres, sua hidrofobicidade aumenta iniciando o processo de formação do núcleo rico em ésteres de colesterol (EC) e convertendo os discos em esferas (Mahley et al., 2006). A enzima plasmática que converte CL para EC é lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT) (Lewis e Rader, 2005; Curtiss et al., 2006). A partícula de HDL pequena, esférica e madura, também se caracteriza como boa aceptora para o CL. Quanto mais CL é adquirido e esterificado, mais a partícula aumenta de tamanho, formando a HDL₂. (Mahley et al., 2006).

A HDL₂ possui densidade de 1,063-1,125g/dL tem seu EC transferido para as LDL e VLDL em troca de TG pela proteína de transferência de EC (CETP) que é uma glicoproteína de alto peso molecular com 4 sítios de N-glicosilação e sua forma madura possui 476 aminoácidos (Agellon et al., 1990). A lipase hepática (LH) hidrolisa os FL e TG contidos nessa lipoproteína convertendo a HDL₂ na HDL₃ (densidade de 1.125-1.21g/dL). Estas lipoproteínas retiram o colesterol dos tecidos periféricos, sendo este esterificado pela LCAT (Mahley et al., 2006).

Assim como a LH existem algumas proteínas como CETP e proteína de transferência de fosfolípides (PLTP), e receptores como receptor de varredura classe 1 (SRBI), que regulam o metabolismo da HDL. A Apo AI promove a eficiente transferência de C das células periféricas, incluindo da lesão aterosclerótica para a HDL (Curtiss et al., 2006).

O EC é transferido pela CETP para os QM, VLDL, lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e LDL (Ginsberg et al., 1998; Curtis et al., 2006). Esta proteína não tem papel totalmente definido em relação à aterogênese, pois apesar de influir

positivamente no TRC colesterol periférico para o fígado, aumenta as concentrações de CE em VLDL e seus remanescentes, na IDL e na LDL, potencialmente pró-aterogênicas (Lupatelli, et al., 2003).

Os TG presentes nos QM são hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL). Esta lipoproteína, sintetizada por adipócitos, miócitos esqueléticos e músculo cardíaco, é responsável pela hidrólise de lipoproteínas ricas em TG, facilitando a transferência de FL e apolipoproteínas para HDL (van't Hooft et al., 2000). A LPL exerce, ainda, a função de ligante do LDLr e outros receptores desta família, facilitando a captação dessas lipoproteínas (Olivecrona, 1993), possuindo assim, uma importância particular na transferência de FL e apolipoproteínas para a HDL, desempenhando um papel crítico na formação desta partícula (van't Hooft et al., 2000).

As IDL e LDL que são catabolizadas pelo receptor de LDL (LDLr) hepático, sendo este o TRC indireto.

A HDL torna-se enriquecida com TG depois da transferência de CE, sendo hidrolisada pela Lipase Hepática (LH) (Yamashita et al., 2000; Curtiss et al., 2006) convertendo-se em partículas mais densas que, exercendo a função aceptora de CL, reiniciam o ciclo de captação de colesterol no organismo (Mahley et al., 2006). O EC da HDL pode ser captado pelo SR-B1 no fígado (Lupatelli et al., 2003; Lima e Couto, 2006).

A capacidade da HDL em inibir a oxidação da LDL tem sido comumente atribuída ao seu conteúdo anti-oxidante (α -tocoferol, licopeno, estrógenos), às propriedades anti-oxidantes da apolipoproteínas A-I (Apo A-I) e A-II (Apo A-II), e principalmente, devido à presença de paraoxonase, uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos carboxílicos aromáticos e compostos organofosforados (Barter et al., 2004; Kontush et al., 2005; Kontush & Chapman, 2006).

Outro aspecto a ser considerado, é o estímulo produzido pela HDL sobre a produção de prostaglandina, a qual exerce atividade vasodilatadora e efeito inibitório sobre a expressão de moléculas de adesão, promovendo conseqüentemente a inibição da ativação de leucócitos (Lima e Couto 2006).

Os efeitos anti-trombóticos são observados como uma ação inibitória sobre os fatores que promovem a coagulação, o qual parece estar relacionado à presença de anticoagulantes naturais como a cardiolipina e fosfatidiletanolamina. (Lima e Couto, 2006; Kontush e Chapman, 2006).

Uma técnica não-invasiva que vêm sendo utilizada na avaliação de um marcador para aterosclerose em todas as suas fases, inclusive as mais precoces, é a análise da espessura da camada da íntima-média (EIM) das artérias carótidas. Utilizando imagens ultra-sonográficas é um método seguro, sem exposição à radiação e de baixo custo, sendo útil tanto no diagnóstico como no acompanhamento da aterosclerose (Hovingh et al., 2005).

A medida da EIM das carótidas pode ser utilizada na pesquisa de doença cardiovascular subclínica, mesmo na ausência de outros fatores de risco (Bots et al., 1997). De fato, já foi demonstrado que para cada 0,1 mm de aumento da EIM há um incremento de 11% no risco de infarto agudo do miocárdio e que um incremento na EIM de 0,03 mm ao ano está relacionado a um risco relativo de 3,1 para a ocorrência de morte por DAC, infarto agudo do miocárdio não-fatal e revascularização miocárdica (Hodis et al., 1998; Almeida et al., 2007).

1.2- Lipase Hepática

A LH ou triacilglicerol lipase hepática é uma glicoproteína com 477 aminoácidos que desenvolve um papel importante no metabolismo de lipoproteínas (Rufibach et al., 2006) sendo esta sintetizada pelos hepatócitos (Zambon et al., 2003; Fan et al., 2007) e localizada principalmente na superfície dos sinusóides dos capilares do fígado. Esta enzima está ligada aos proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) sobre a superfície dos sinusóides das células endoteliais e sobre a superfície externa das células parenquimais no espaço de Disse (Perret et al., 2002; Hasam e Pillarisetti 2006).

Deeb et al. (2003) demonstraram a importância da ação lipolítica da LH pelo estímulo da fosfolipase, a qual possui importante papel na hidrólise de FL e na liberação de lisofosfolípidos e ácido graxo livre (AGL). Outros autores, também demonstraram que a LH possui efeito hidrolase sobre glicérides, o qual hidrolisa TG, promovendo a liberação de diglicérides e AGL (Bachorik et al, 2001; Fan et al., 2007).

Outras importantes propriedades atribuídas a LH incluem função no metabolismo das lipoproteínas como VLDL, IDL, LDL e HDL desempenhando a função de ligante ou co-receptor facilitando a interação não só das lipoproteínas, mas, também a captação de lípidos das células no fígado, podendo variar seu efeito sobre a aterosclerose (Hasham e Pillarisetti 2006; Fan et al. 2006; Freeman et al., 2007; Fan et al., 2007).

A atividade fosfolipásica conferida pela LH parece estar relacionada à sua habilidade em converter HDL₂ para a pequena HDL₃. Este mecanismo pode ser explicado, pelo menos em parte, pela relação inversa entre LH e concentrações de HDL₂ colesterol como realmente se demonstrou em alguns estudos (Kuusi, et al., 1980; Deeb et al., 2003). A HDL₂ estimula a hidrólise de TG da VLDL mediada pela LH, enquanto HDL₃ inibe este processo (Dugi et al., 2000). O catabolismo da Apo AI da HDL necessita da função lipolítica da LH, enquanto o catabolismo de Apo AII ocorre independentemente da lipólise (Isaac et al., 2004).

No metabolismo de lipoproteínas, sua atividade catalítica contribui para a remodelação de QM remanescentes, IDL, LDL e na HDL hidrolisa TG e FL podendo influenciar no TRC (Deeb et al., 2003; Lahoz et al., 2005; Lindi et al., 2006). Estes efeitos possivelmente influenciam o processo da aterosclerose.

O papel da LH, na modulação aterogênica, não está claramente definido, mas há evidências na literatura demonstrando o papel pró-aterogênico dessa enzima (Jansen et al., 2002), assim como existem relatos a respeito do papel anti-aterogênico da mesma (Hasam e Pillarisetti 2006). Estas diferenças na literatura são resumidas na tabela 1.

Tabela 1- Potencial pró e anti-aterogênico da Lipase Hepática (Jansen et al 2002)

Ação sobre as Lipoproteínas Plasmáticas		
Ação	Pró-Aterogênica	Anti-Aterogênica
Metabolismo	Diminui o tamanho da LDL (Zambom et al., 2003; Bos et al., 2005).	Estimula o clareamento pós-prandial e a formação de HDL pré- β e HDL3 (Ohashi et al., 2005; Curtiss et al., 2006).
Perfil	Atividade inversamente correlacionada com a HDL e com o tamanho da LDL (Jansen et al., 2002).	Atividade inversamente correlacionada com lípidos pós-prandiais (Hasahm e Pillarissetti 2006).
Aterosclerose e Outras Condições		
Ação	Pró-Aterogênica	Anti-Aterogênica
	Atividade associada com a resistência à insulina (Lindi et al., 2006) e alta na Hipercolesterolemia familiar (Lahoz et al., 2005).	Baixa atividade em pacientes com hipotireoidismo (Sterfan et al., 2005).
Associações com DAC		
Ação	Pró-Aterogênica	Anti-Aterogênica
	Diminuição na atividade durante o uso de drogas hipolipidêmicas associadas com aumento de tamanho da LDL (Jansen et al., 2002; Ruffibach et al., 2006).	Baixa atividade em pacientes com DAC (se acompanhada por baixa CETP) e deficiência associada com aumento do risco de DAC (Santamarina-Fojo et al., 2004; Fan et al., 2007).

Miljkovic-Gacic et al. (2006) demonstraram que esta enzima participa da captação das lipoproteínas HDL e LDL por receptores específicos dos hepatócitos. Além disso, Bachorik et al. (2001) demonstraram que a LH também desenvolve um papel na preparação final dos quilomícrons remanescentes para a captação pelos receptores nos hepatócitos.

Recentemente, a produção e expressão da LH nas paredes dos vasos foram relatadas, podendo resultar no aumento localizado da produção de AGL, aumento da captação de colesterol, retenção da LDL na parede subendotelial e recrutamento de macrófago, todos nos quais aumentaria a formação da lesão. Assim, há evidências de que a LH pode modular o risco aterogênico, independente de mudanças do perfil lipídico. A presença da LH nas paredes arteriais pode alterar significativamente a formação da lesão (Nong et al., 2003; Santamarina-Fojo et al., 2004).

1.2.1- Polimorfismos Relacionados ao gene da Lipase Hepática

Os níveis da expressão da atividade da LH podem ser influenciados por obesidade, colesterol intracelular, terapias que visam baixar as concentrações lipídicas e principalmente pelas variações genéticas. Aproximadamente de 20-30% da variação individual da atividade parece estar relacionada a presença de polimorfismos comuns na região promotora do gene (LIPC) (Eller et al., 2005; Ruffibach et al., 2006).

O LIPC possui tamanho de 135 Kb, está localizado no cromossomo 15 (q15-q21) e codifica 449 aminoácidos, é composto por oito íntrons e nove exons. (Zang et al., 2005; Hasham e Pillarisetti 2006). Na região proximal o gene da LH contém quatro sítios poli mórficos: -514T/C, -250A/G, -710C/T e -763G/A (Perret et al., 2002; Isaacs et al., 2004; Zhao et al., 2006) identificados na região 780 bp à montante do início da transcrição (Deeb et al., 2003) que podem influenciar as concentrações de lípidos e lipoproteínas plasmáticas (Andersen et al., 2003; Zhao et al., 2006).

O polimorfismo -250G/A foi associado com aumento das concentrações de HDL-C, sugerindo que esta variação está envolvida na determinação do perfil de lípidos e lipoproteínas (Zhao et al., 2006), há também uma associação como um fator de risco de doença arterial periférica (Eller et al., 2005). Recentemente, este polimorfismo foi correlacionado com altas concentrações de LDL colesterol (Lindi et al., 2006).

Na região sul brasileiro com descendência européia, de Andrade et al, (2004) verificaram a associação deste polimorfismo com aumento das concentrações de HDL-C e com o risco de DAC, mas, esta associação só foi verificada em homens.

Os polimorfismos V73M, N193S (Hegele et al., 1998), V133V, T202T, T457T, G175G e T344T (Mori et al., 1996; Knudsen et al., 1996) estudados no LIPC não foram associados à redução a atividade da LH. No exon 6 do LIPC foi encontrada a mutação A+884G, na população chinesa com modulação entre a variação genética e a diminuição da atividade da enzima e também predisposição a DAC (Su et al., 2006).

Diversos estudos na literatura mostraram a frequência de polimorfismos no LIPC o -514C/T tem a frequência de 17 a 27% em brancos, 44 a 54% em americanos africanos, 47% em Hispânicos, 37% em Coreanos, 50% em Japoneses (Miljkovic-Gacic et al 2006); -205 G/A foi de 20,3% em pacientes com DAC (Eller et al., 2005); o -710 T/C foi de 20,7% em homens saudáveis (Van't Hooft FM et al, 2000); o -763A/G foi 21% em pacientes com infarto do miocárdio (Andersen et al., 2003).

Na região codificadora do gene também foram encontrados alguns polimorfismos, Cenarro et al, 2005 estudaram +651A/G presente no exon 5, seus participantes eram 32% portadores da mutação em um estudo sobre o uso de Atorvastatina em dislipidemias mista e Zhi-Guang, 2003 estudou o +884A/G presente no exon 6 e encontrou a frequência de 54,9% em pacientes com DAC.

1.3- Polimorfismo -514C/T da Região Promotora do Gene da Lipase Hepática

O polimorfismo -514C/T onde ocorre à troca de C para T é responsável por 20 a 30% de variação de atividade da enzima em ambos os sexos (Deeb e Peng 2000; Ramsamy et al., 2003; Nettleton et al., 2007). De acordo com, Konglund-Andersson et al., (2003) o polimorfismo -514C/T aumenta as concentrações LDL colesterol, LDL triglicérides e ApoB. Zang et al., (2006) sugeriram que a obesidade pode modificar a associação entre o genótipo -514 C/T e o risco de CAD em homens diabético. O alelo C está associado com a alta atividade enzimática, com as baixas concentrações de HDL₂ e teoricamente com a alta no risco aterogênico.

Vários grupos estudaram atividade da LH no polimorfismo -514C/T no LIPC em pacientes com DAC (Jansen et al., 2002; Nettleton et al., 2007).

Os resultados encontrados na literatura são controversos, McCaskie et al., (2006) sugerem em seu estudo com 556 pacientes com DAC comparando com 1111 indivíduos controles, que o polimorfismo -514C/T poderia estar diminuindo o risco de DAC.

Em pacientes obesos portadores de diabetes mellitus tipo 2 não foi verificado a associação do polimorfismo -514C/T e o risco de DAC mas, neste mesmo estudo foi observado resultados significativos entre IMC e o risco de DAC, sugerindo que a obesidade pode modificar esta associação em homens diabético (Zhang et al., 2005).

Os resultados na literatura sobre a relação da concentração de HDL-C e -514C/T são controversos, levando em consideração que o polimorfismo -514C/T reduz a atividade desta enzima, o esperado seria que este polimorfismo estivesse relacionado com o aumento das concentrações de HDL-C, conforme foi verificado em alguns estudos (McCaskie et al. 2006). Porém, Boekhold et al., (2006) avaliaram a contribuição de variações genéticas comuns (ABCAI, ApoAI, ApoE, CETP, LIPC, LCAT, LPL e SRB1) para as variações das concentrações de HDL-C em pacientes com DAC, não encontraram relações significativas entre as concentrações de HDL-C e -514C/T, neste estudo só foram verificadas associações nas variações do gene da CETP -629A e SRB1 1050T.

A tabela 3 resume a frequência do polimorfismo -514C/T e algumas respostas observadas em alguns estudos em diferentes populações, com condições desde fisiológicas até envolvendo pacientes com diabetes mellitus, hipertensão e DAC.

Tabela 2- Frequências do polimorfismo -514C/T do gene da Lipase hepática: diversos estudos mundiais

Autores	Ano	País	n	CC (%)	TC (%)	TT (%)	Respostas Observadas
Nettleton et al.	2007	EUA	12.297	62	33	5	↑HDL-C
Bernard et al.	2007	Canadá	212	56	36	8	↓ hipertensão gestacional
Fan et al.	2007	Finlândia	700	53	40	7	↑Morte Cardíaca Súbita
Zambom et al	2006	Itália	68	66	32	7	↑ LDL
Mc Caskie et al	2006	Austrália	6.487	61	33	6	↑HDL-C
Zhang et al	2006	EUA	805	63	29	8	↑IMC
Boekholdt et al	2006	Holanda	546	61	34	5	-
Stefan et al	2005	Alemanha	1.070	65	32	3	↑Resistência a Insulina
Fan et al	2006	Finlândia	108	49	39	12	-
Bos et al	2005	Holanda	429	64	33	3	↓LH, ↑HDL-C
Lahoz et al	2005	Espanha	236	60	36	4	↑ TG
Zhang et al	2005	EUA	752	63	33	4	↑HDL-C, ↑C
Skoglund-Andersson et al.	2003	Suécia	377	63	33	4	↑LDL-C, ↑LDL-TG,
Kimura et al.	2003	Japão	183	30	43	27	↑HDL-C
Fang et al.	2002	China	823	41	46	13	-
Ordovas et al.	2002	EUA	2130	64	33	3	↑HDL-C, ↑HDL2-C
Inazu et al.	2001	Japão	296	25	51	24	↑HDL-C
Hong et al.	2000	Korea	124	31	49	19	↓LH
Shohet et al.	1999	EUA	47	51	38	11	↓LH
Tahvanainen et al.	1998	Finlândia	376	56	37	7	↑HDL-C, ↑LDL-C

CC= homozigoto sem mutação; TC= heterozigoto com mutação, TT= homozigoto com mutação

1.4- Polimorfismo I405V do gene da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CETP)

O gene da CETP está localizado no cromossomo 16 (16q12-16q-21) compreende 16 exons e 15 íntrons (Agellon et al., 1990) codifica 493 aminoácidos expressos em vários tecidos onde foram encontradas várias mutações e polimorfismos na

população geral entre os mais estudados estão TaqIB e I405V ambos associados com reduzida atividade da CETP e aumento das concentrações plasmáticas de HDL-C (Bruce et al., 1998; Tall et al., 1999)

O polimorfismo com diminuição da atividade o I405V está localizado no exon 14 do gene da CETP, no qual ocorre uma substituição de isoleucina para valina (Bruce et al., 1998). Estudos recentes associaram este polimorfismo ao aumento das concentrações de HDL-C (Isaacs et al., 2007) Boekholdt e Thompson (2003), fizeram uma meta-análise da literatura sobre polimorfismos da CETP, avaliando os efeitos do TaqIB e 405V sobre a massa e atividade da enzima e também com aumento das concentrações de plasmáticas de HDL-C. A massa foi comparada somente para o polimorfismo I405V o genótipo VV teve a massa 0.19mg/dL menor do que o genótipo II e esta redução está associada com aumento na HDL-C.

No *Rotterdam Study* (Isaacs et al., 2007) um estudo prospectivo com 7983 indivíduos, os portadores do alelo V tiveram aumento das concentrações de HDL-C em ambos os sexos mas, somente em homens houve a diminuição do risco do infarto do miocárdio.

Na tabela 3 descrevemos a frequência e respostas observadas no polimorfismo I405V do gene da CETP em estudos mundiais com condições desde fisiológicas até envolvendo pacientes com diabetes mellitus e DAC.

Tabela 3- Frequências do polimorfismo I405V do gene da proteína de transferência de ésteres de colesterol: diversos estudos mundiais

Frequência do polimorfismo I405V em estudos mundiais							
Autores	Ano	País	n	II (%)	IV (%)	VV (%)	Respostas Observadas
Isaacs et al.,	2007	Holanda	6421	46	44	10	↑HDL-C
Padmaja et al.,	2007	Índia	171	23	47	30	-
Kaplan et al.,	2007	Brasil	294	34	49	17	-
Vergane et al.	2006	Itália	200	36	52	12	-
Celline et al.,	2005	Itália	189	40	50	10	-
Zheng et al.,	2004	China	100	31	50	19	↑HDL-C
Blankenberg et al.,	2004	Alemanha	754	50	42	8	-
Blankenberg et al.,	2003	Alemanha	1211	50	42	8	↓ CETP
Freeman et al.,	2003	Reino Unido	498	48	42	10	↑HDL-C
Lottenberg et al.,	2003	Brasil	51	29	53	18	↓ CETP e C
Okumura et al.,	2002	Japão	136	28	49	23	↓ CETP e ↑HDL-C
Goto et al.,	2001	Japão	106	23	40	37	-
Kakko et al.	2000	Finlândia	506	40	45	15	↓ CETP
Gudnason et al.	1999	Finlândia	756	52	41	7	↓ CETP e ↑HDL-C

II= homozigoto sem mutuação, IV= heterozigoto para a mutuação, VV= homozigoto para a mutuação

1.5- Hiperalfalipoproteinemia (Hiper-A)

A Hiperalfalipoproteinemia (Hiper-A) caracteriza-se por altas concentrações plasmáticas de HDL₂, por deficiência de CETP ou por diminuição da atividade da LH. Ambas as anormalidades foram associadas com a síndrome da longevidade ou a proteção ao risco de DAC (Sich et al., 1998). Por outro lado, Hirano et al. (1995) observaram uma aterosclerose prematura em pacientes Hiper-A com deficiência de CETP e com diminuição na atividade de LH. Matsuzawa et al. (1986) descreveram dois casos de Hiper-A severa com opacidade prematura das córneas, sinalizando o depósito de lípides nos tecidos, sendo que um destes casos foi acompanhado de angina peitoral. Entretanto, este foi o

primeiro relato que Hiper-A pode ser um defeito do TRC, ou que a HDL pode ser disfuncional, podendo ser um potencial mecanismo conduzindo ao aumento de aterosclerose apesar de altas concentrações séricas de HDL-C (Matsuzawa et al., 1986 e Yamashita et al., 2000).

Hiper-A primária ou familiar pode ocorrer devido a deficiência de genética de CETP, LH por aumento na produção de ApoAI, ou por etiologia desconhecida (Yamashita et al., 2000; Kontush et al., 2004).

A atividade da LH está inversamente correlacionada com as concentrações de HDL₂, pois esta enzima hidrolisa TG e FL da HDL₂, no qual são assim convertidas a HDL₃ e age também no metabolismo de lipoproteínas ricas em TG, convertendo VLDL em LDL. Em portadores de Hiper-A com maiores concentrações de HDL₂, a LH foi menor e associado com prevenção do início ou progressão da lesão aterosclerótica (Sich et al., 1998).

A Hiper-A secundária associa-se a uma variedade de doenças e fatores. Pode ser secundária à ingestão de álcool em longo prazo, cirrose biliar primária, enfisema e uso de alguns medicamentos corticosteróides, insulina, estrógenos fibratos, nicotina, inibidor da HMG-CoA redutase e fenitoína (Yamashita et al., 2000). A ingestão de álcool é acompanhada pelo aumento sérico de HDL-C, por reduzir a atividade e massa da CETP (Hirano et al., 1992).

Em estudos anteriores do nosso laboratório, Alarcon et al., (2004) pesquisaram em 95 voluntários adultos as modulações de Hiper-A comparando com voluntários controles em uma amostra populacional brasileira, e seus resultados mostraram que nos portadores de Hiper-A não houve diferenças entre a frequência de fatores de risco de DAC e as concentrações de HDL-C foram influenciadas por LPL, ApoAI e IMC. Posteriormente, Kaplan et al., (2006) avaliou duas mutações (Int14A e D442G) no gene da CETP numa população de Controles e Hiper-A; Hiper-A não foi associado com quaisquer das mutações estudadas.

Pacientes com deficiência genética de HDL apresentam ou não aterosclerose pré-matura. Hiper-A pode ser pró-aterogênico quando ocorrer à deficiência de LH.

Consta na literatura ocorrência de DAC nesta deficiência se associada com a deficiência de CETP, entretanto, Hiper-A pode ser anti-aterogênico quando houver a superprodução de ApoAI. (Brand et al., 1996; Yamashita et al., 2000).

O modelo experimental da Hiper-A tem sido utilizado no decorrer dos últimos anos com o intuito de elucidar os mecanismos anti-aterogênicos ou pró-aterogênicos da HDL e das proteínas reguladoras do seu metabolismo (Gehrish et al., 1999; Alarcon et al., 2004; Kaplan et al., 2006).

Desde 1978 estudos demonstraram que a LH é fortemente influenciada por fatores genéticos (Kuusi et al., 1978). Foram descobertas algumas mutações no LIPC associadas com as concentrações de HDL-C (Guerra et al., 1997; St-Pierre et al., 2003; Zhang et al., 2005; Fan et al., 2007; Nettleton et al., 2007). Em Hiper-A Gehrish et al., (1999) estudou 10 mutações do gene da LH +290G/A, +472T/G, +597A/G, +651A/G, +679G/C, +873C/T, +1074A/C, +1100G/C, +1105G/A e +1221C/T em portadores de Hiper-A com hipertrigliceridemia combinada e mostrou que o impacto destas mutações sobre a condição de Hiper-A foi muito fraco, mas nada na literatura sobre o polimorfismo -514C/T e sua relação em Hiper-A foi encontrada.

2- OBJETIVOS

Em uma amostra populacional brasileira:

- 2.1- Estabelecer a modulação da hiperalfalipoproteinemia sobre parâmetros antropométricos, bioquímicos, gênicos e a medida da espessura da camada íntima-média das artérias carótidas.

- 2.2- Caracterizar os efeitos dos polimorfismos –514C/T do gene da lipase hepática e I405V da proteína de transferência de ésteres de colesterol sobre parâmetros antropométricos e bioquímicos séricos assim como a modulação da hiperalfalipoproteinemia sobre estes.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Duzentos e noventa e um voluntários adultos de ambos os sexos foram selecionados a partir de consulta aos resultados de exames laboratoriais e às pastas do Serviço de Arquivamento Médico (SAM) do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Participaram desta seleção alunos de pós-graduação, médicos e funcionários do laboratório de Lípides.

Foram excluídos pacientes com hepatopatias, nefropatias, pneumopatias, endocrinopatias, diabetes mellitus ou intolerância glicídica, ingestão crônica de bebida alcoólica (>75g/dia) e uso de alguns medicamentos como corticosteróides, insulina, fibratos, ácido nicotínico, estatinas, fenitoína, hidrocarbonetos clorados e inibidores de proteases.

O atendimento médico no Ambulatório de Dislipidemias obteve o registro da história pessoal e familiar e exame físico completo com medidas da pressão arterial, cintura, índice de massa corpórea (IMC), padrão de dieta, sedentarismo, definido como ausência de atividade física aeróbica, moderada-intensiva por no mínimo de 30 minutos sobre 5 dias da semana ou atividade física aeróbica intensiva por no mínimo 20 minutos por 3 dias na semana (Haskell et al., 2007), hipertensão arterial definida como pressão arterial sistólica (PAS) >120 (mmHg) e/ou pressão arterial diastólica (PAD) >80 (mmHg), tabagismo, definido como uso regular de cigarros, menopausa, definida com o corte de idade de 51 anos (Pedro et al., 2003), dislipidemias definidas como (TG≥150mg/dL e/ou C≥200mg/dL e/ou HDL-C<40mg/dL) (Sposito et al., 2007).

O critério de “doença cardiovascular aterosclerótica estabelecida” (DAC) abrangeram infarto agudo do miocárdio prévio (detectado em serviço hospitalar), infarto agudo do miocárdio silencioso baseado no eletrocardiograma (ECG) e/ou angina do peito. O infarto agudo do miocárdio foi definido pela presença de ao menos dois dos três critérios: dor torácica típica, ECG com alterações, elevação característica das enzimas cardíacas plasmáticas. A angina do peito foi definida por episódios de desconforto torácico breve (maiores ou iguais a 15 minutos), que pioraram com o 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 a revascularização miocárdica. DAC familiar define-se como DAC em parentes de 1º grau

com idade <45 anos para homens and <55 anos para mulheres, de acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (Sposito et al., 2007).

No questionário de exame físico aplicado aos voluntários, contaram a identificação do paciente (nome, número do registro hospitalar, idade, sexo, cor, raça, estado civil, número de filhos, endereço e telefone), dados antropométricos, índice de massa corpórea (IMC) e circunferência da cintura (CC), dados clínicos (pressão arterial), hábitos de vida presentes (etilismo ou não, tabagismo ou não, padrão alimentar ou hábito de atividade física), histórico individual (medicamentos em uso; doenças atuais e anteriores, informações sobre a menopausa e histórico familiar).

Em visita posterior ocorreu a punção venosa no Setor de Coleta da Divisão de Patologia Clínica e em salas de procedimentos experimentais do Hospital das Clínicas, para obtenção de soro e/ou plasma, com o voluntário em jejum de 12 horas e realizada em duas etapas: a primeira (10-15mL de sangue) e a segunda (4mL de sangue) após administração de heparina, (Liquemine[®], Roche, São Paulo, SP) na dose de 100U.I./Kg de peso corporal, E.V., para a mensuração das atividades de LPL e LH no plasma.

Uma parte do material foi submetida imediatamente às análises laboratoriais na Seção de Bioquímica Clínica do HC e a outra parte foi armazenada por congelamento (-20° e -80° C) para realização posterior de outras análises. As análises ocorreram no Laboratório de Lípidos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp, ou no Laboratório de Lípidos, USP, São Paulo, ou no Laboratório de Pâncreas Endocrinologia no Instituto de Biologia (IB) da Unicamp, ou no Laboratório de Lípidos da Universidade de São Paulo/ Ribeirão Preto. Portanto este protocolo foi desenvolvido em várias etapas e por diferentes profissionais.

Os voluntários foram separados em dois grupos e definidos pelos valores de HDL-C como controles (CTL HDL-C <68 e > 30 mg/dL) ou hiperalfalipoproteinêmicos (Hiper-A, HDL-C ≥68mg/dL) e, conforme o valor de percentil 90, obtido para uma população local de 1700 indivíduos de um estudo anterior no Laboratório de Lípidos/NMCE (de Faria, comunicação pessoal).

Após o esclarecimento dos objetivos e transtornos dos procedimentos inerentes ao estudo, os selecionados assinaram o termo de consentimento livre e de esclarecimento (**anexo 1**). O protocolo foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médica da Unicamp (protocolo nº-78/2006).

3.1- Análises Laboratoriais

Os lípides plasmáticos e outras análises foram determinados por métodos enzimáticos-colorimétricos; o colesterol das lipoproteínas HDL por métodos homogêneos diretos, o colesterol da LDL foi obtido ou pelo método homogêneo direto ou indiretamente utilizando a fórmula de Friedwald (Friedwald et al., 1972) e as apolipoproteínas (Apo) A-I, ApoB e a Lp(a) por nefelometria.

3.2- Atividades de Lipase Hepática e Lipoproteína Lipase

As atividades da LPL e da LH foram obtidas por um método radiométrico através da medida da liberação de ácidos graxos livres resultantes da hidrólise de um substrato artificial de trioleína triciada (Ehnholm C. et al, 1998). O substrato foi preparado pela adição de trioleína fria [(1, 2, 3-Tris [cis-9-octadecenoleo]glicerol)] e trioleína radioativa [(9,10³H] (N)-trioleína], atividade específica de 26,8 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, EUA) estabilizadas por uma solução de goma arábica a 5% (Sigma, St Louis, MO, EUA). A mistura foi submetida à 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. A albumina bovina sérica livre de ácidos graxos à 10% é acrescentada após a sonicação para quelar os ácidos graxos livres, e a LPL é inibida pela adição de 2M NaCl.

A reação foi incubada por 60 minutos à 37° C e interrompida com a adição de uma solução de metanol: clorofórmio: heptano (1,41: 1,25: 1; V/V/V), seguida de uma mistura de bicarbonato de potássio/ácido bórico (pH=10,5). A radioatividade foi

determinada num contador de cintilação líquida modelo LS-5000/75B (Beckman, Beckman Instruments, Palo Alto, EUA). A atividade de LPL foi calculada pela diferença entre as atividades de lipase total e LH e expressas como nmoles de ácidos graxos liberados/mL de plasma/ por hora.

3.3- Atividade da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol

A atividade da CETP foi mensurada através da medida de transferência de CE de HDL marcada radioativamente para as lipoproteínas contendo apoB, segundo o método radiométrico exógeno (Lagrost et al., 1998). As partículas aceptoras de CE (LDL e VLDL, $d < 1,063$ g/mL) e as doadoras de CE (HDL, $d > 1,063$ g/mL) foram obtidas por ultracentrifugação sequencial a partir de um *pool* de soros normolipidêmicos em ultracentrifuga, modelo L80/75B da Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA), utilizando um rotor 50Ti. As HDL foram isotópicamente marcadas com [4- 14 C]-colesteril oleato (New England Nuclear, EUA) e purificadas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo utilizando um rotor SW40 da Beckman.

Os ensaios de transferência de CE foram realizados em duplicata pela adição do doador marcado (14 C-HDL diluída para 40 mg/dL de colesterol), do acceptor (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 como fonte de CETP. A mistura foi homogeneizada, incubada por 4 horas à 37°C, resfriada e precipitada com uma 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 a contagem de radioatividade num contador de cintilação líquida Beckman modelo LS-5000 (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA),

A porcentagem de transferência de EC é calculada pela equação:
% transferência de EC = $[1 - (\text{dpm amostra} / \text{dpm branco}) \times 100]$.

3.4- Atividade da Proteína de Transferência de Fosfolípides

A atividade da PLTP foi mensurada através da medida de transferência de [^{14}C] fosfatidilcolina, entre lipossomas e HDL (Damen et al. 1982). Para preparar 1mL de lipossomas radioativamente marcados, secou-se, num frasco limpo, contendo 125 μmol de fosfatidilcolina, ^{14}C fosfatidilcolina e hidroxitolueno butilado. A mistura lipídica foi sonicada com tampão contendo NaCl (150mM), tris-HCl (10mM) e EDTA (1mM), pH7,4; repetindo por 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 FL), HDL (250 μg de proteína) e tampão Tris, pH 7,4 (NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM), para um volume final de 400 μL .

Os lipossomas foram precipitados com solução precipitante (500mM de NaCl, 125mM de MgCl_2 e 140U de heparina/tubo), e o sobrenadante coletado para determinar a medida da radiatividade.

A porcentagem de transferência de FL foi calculada através da equação: % de transferência de FL radioativo = $(\text{dpm amostra} - \text{dpm branco} / \text{dpm total} - \text{dpm branco}) \times 100$.

3.5- Análises moleculares: extração de DNA

A extração de DNA genômico de leucócitos foi realizada em sangue periférico segundo o método de Salazar L.A. 1998.

O sangue total foi coletado em tubos contendo EDTA (10%, 0,1 mL). Em um tubo de microcentrífuga 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 foi acrescentada uma 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, a fase aquosa (superior) foi cuidadosamente removida e transferida para outro microtubo estéril. Foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado e incubados por 3 minutos para a precipitação do DNA genômico. Centrifugou-se à 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 (10700 x g) por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA após secar a temperatura ambiente foi ressuspensão 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 a 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 a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) e corado com brometo de etídeo (0,5 ug/mL). A separação eletroforética foi realizada à 100V por 45 minutos e a visualização das bandas de DNA em transiluminador sob a luz ultravioleta.

3.6- Detecção dos Polimorfismos

Os Polimorfismos foram realizados utilizando o termociclador *Gradient System Eppendorf* ou *Applied BioSystem*. As análises dos polimorfismos TaqIB e I405V da CETP foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Lípidos USP/Ribeirão Preto, com a coordenação de Dr. José Ernesto dos Santos.

Polimorfismo -514C/T do gene da Lipase Hepática

O -514C/T foi determinado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizada para amplificação de 285 pares de base dos fragmentos de DNA dos pacientes em estudos. A sequência de pares de bases foi 5'-TCT AGG ATC ACC TCT CAA TGG GTC

A-3' e 5'-GGT GGC TTC CAC GTG GCT GCC TAA G-3' seguindo as seguintes condições: Tampão Taq (10x), MgCl₂ (50mM), dNTP (5mM), TaqDNA Polimerase (5U/μL), água reagente tipo estéril. A reação de PCR foi iniciada com a desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, associação à 63°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, e uma extensão final à 72°C por 7 minutos. Para a verificação da amplificação do produto de PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose à 2,0% em tampão TBE (Tris a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) e corado com brometo de etídeo (0,8 ug/mL). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 45 minutos e a visualização das bandas de DNA em transiluminador sob a luz ultravioleta (Guerra et al., 1997)

Para a digestão do produto de PCR foi utilizada com 1U da enzima de restrição NlaIII. A integridade das moléculas de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão TBE (Tris a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) e corado com brometo de etídeo (0,5 ug/mL). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 45 minutos e a visualização das bandas de DNA em transiluminador sob a luz ultravioleta. Os fragmentos da digestão foram 300 e 215 pb para o alelo C e 85 pb para T (Ji et al., 2002).

Polimorfismo I405V do gene da proteína de transferência de ésteres de colesterol

Para a determinação do polimorfismo I405V, um fragmento de 142bp no exon 14 do gene da CETP foi amplificado pela PCR, com os seguintes iniciadores *sense*: 5'-TTGACTGCAGGAAGCTCTGGC-3'-*antisense*: 5'-TATTTTTTTCACGGATGGGCA-3'. Para a amplificação foram utilizados 100ng de DNA genômico, em volume de 50μL contendo 40pmol de cada oligonucleotídeo, 200μM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 10 mM de Tris pH8,4 e 0,25U de Taq DNA polimerase. A PCR foi iniciada com a desnaturação à 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 à 95°C por 15 segundos, hibridação à 60° por 30 segundos e polimerização à 72°C por 30 segundos. Finalmente, polimerização a 72° por 5 minutos. O produto amplificado de PCR foi digerido a 37°C durante 1 hora, com 2U de

enzima de restrição Msp1, em solução tampão contendo 50 mM Tris-HCl, em pH=8,0, 10mM MgCl₂ e 50mM de NaCl. Os fragmentos da digestão foram 308bp e 268pb para o alelo I e V respectivamente (Gunadson et al., 1999).

3.7- Medida da espessura da camada íntima-media das artérias carótidas (EIM)

Os pacientes foram encaminhados à ultra-sonografia *doppler* para a medida da espessura da camada íntima-média das carótidas.

Os pacientes foram examinados em decúbito dorsal com a cabeça elevada em cerca de 20 graus e com rotação de 45 graus. Utilizou-se a ultrasonografia doppler realizada em 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 4-12 MHz. O protocolo, em todos os casos, foi realizado pelo médico ultrasonografista Dr. Rui T. Nakamura e consistiu de várias medidas longitudinais de segmentos das artérias carótidas comum direita e esquerda, de acordo com a literatura (Simons et al., 1999). Os resultados foram expressos como média aritmética das espessuras em milímetros das carótidas direita e esquerda conforme mostrado na figura 1, a presença de lesão aterosclerótica foi assumida quando a espessura da camada íntima-média de carótidas foi igual ou maior que 1mm como relatado por Chambless et al., (1997).

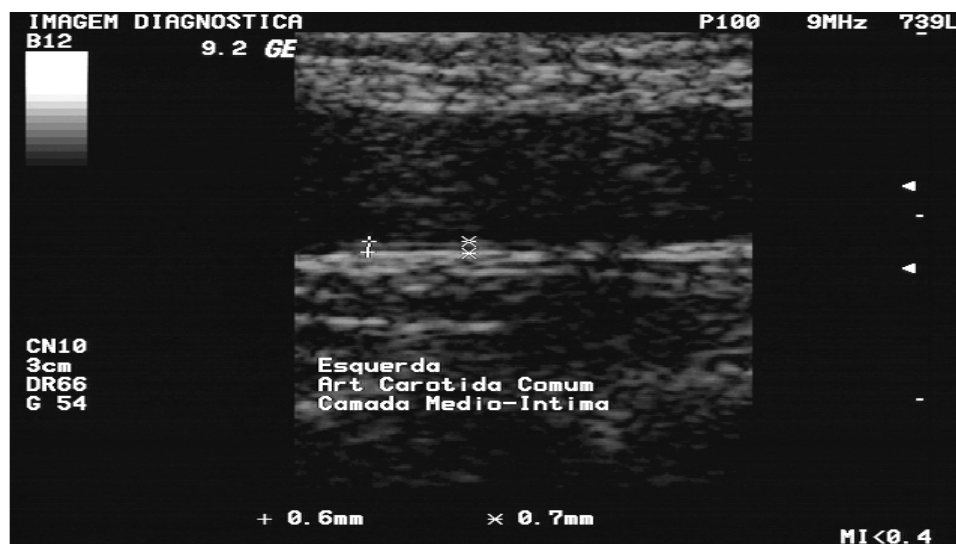


Figura 1- Exemplo de imagem ultra-sonográfica da camada íntima-média da artéria carótida comum.

3.8- Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os *software* SAS e SPSS com o apoio do Setor de Estatística da FCM.

Foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos, transformação de algumas variáveis quando não paramétricas, análises descritivas, comparativas, de covariância, correlações ajustadas e análises multivariadas utilizando o critério *stepwise* de seleção das variáveis.

Utilizou-se o nível de significância de 5% para as diferenças significativas e para limítrofes maior que 5 e menor que 10%.

4- RESULTADOS

PROTECTIVE MODULATION OF CAROTID ATHEROSCLEROSIS IN HYPERALPHALIPOPROTEINEMIC INDIVIDUALS

Santiago F.D.¹ Nakamura R.T.^{2,4}; Kaplan D.^{1,3}; de Faria E.C.^{1,3}

Clinical Pathology¹ and Radiology Departments², Dyslipidemia Out-patient Service³,
Medical School, University of Campinas, Diagnostic Image Laboratory⁴, Campinas,
São Paulo, Brazil

Keywords- hyperalphalipoproteinemia, carotid atherosclerosis, modulation

Trabalho científico 1- em preparo para submissão ao *Metabolism*

Abstract

Objective: A high plasma concentration of high-density cholesterol is possibly associated with protection against coronary artery disease (CAD). Whether hyperalphalipoproteinemia modifies carotid intima-media (cIMT) thickness and/or influences the relationship of clinical and biochemical parameters with cIMT it remains to be determined.

Methods: This study was conducted on 169 asymptomatic individuals classified as hyperalphalipoproteinemic (Hyper-A, n=71, HDL-C above or equal 68.0 mg/dL) and controls (CTL, n=98, HDL-C above 32 and below 68.0 mg/dL). The prevalence of dyslipidemia, hypertension, smoking, sedentariness, menopausal women, coronary artery disease (CAD) and familial CAD were determined. Enzymatic, nephelometric and ultracentrifugation methods were used for biochemical determinations. Hepatic lipase (HL), lipoprotein lipase (LPL) and activities of cholesteryl ester (CETP) and phospholipid (PLTP) transfer proteins were measured by radiometric exogenous methods. A high-resolution β -mode carotid ultrasonography was performed for carotid assessing intima-media thickness.

Results: Hyper-A were older and had higher frequencies of hypercholesterolemia, hypertension, sedentariness and menopausal women. Although hyperalphalipoproteinemic individuals had higher prevalence of cardiovascular disease (CVD) risk factors their CAD frequency, carotid right, left and mean cIMT and the prevalence of thickness (>1 mm) were similar to controls. In multivariate models age represented the only significant predictor of carotid IMT in Hyper-A ($r=0.041$, $p<0.001$) independent of other clinical or biochemical factors, in contrast to CTL, where age ($r=0.63$, $p<0.001$), male sex ($r=0.03$, $p<0.001$), blood pressure ($r=0.006$, $p<0.001$) and HDL-C ($r=0.02$, $p<0.022$) accounted for IMT variations. Surprisingly in CTL the mean carotid IMT correlated positively with HDL-cholesterol and this association was present in both sexes only in CTL, but it was negative in Hyper-A.

Conclusions: Although possessing a higher risk CVD profile the similarities found in carotid IMT could in part be explained by the striking differences in its modulation between the two groups indicating a protective trait against carotid atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemia. The reduced protection in controls is in accord with the positive correlation of IMT with HDL-C.

Introduction

Prospective studies have shown that CHD risk increases by 2% in men or 3% in women for each 1 mg/dL of HDL-C reduction (1, 2).

HDL, a lipoprotein with multifunctional roles, possess key atheroprotective biological properties, including cellular cholesterol efflux from arterial wall cells to the liver, a role in reverse cholesterol transport (RCT), anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-apoptotic activities and anti-thrombotic activities (3, 4).

Hyperalphalipoproteinemia (Hyper-A) is characterized by increased HDL-cholesterol concentrations. HDL₂ has been related either to CETP deficiency or to decrease HL activity (5, 6, 7) both abnormalities associated with longevity syndrome or with cardiovascular protection (8). It can be idiopathic or caused by secondary causes (9).

Previous studies in our laboratory showed that HDL-C was modulated by several clinical and metabolic factors like BMI, age, LPL, apoAI (10). Kaplan et al (11) in 2006 showed that CETP mutations were not associated with HDL. More recently Santiago et al. demonstrated that hepatic lipase polymorphism -514C/T did not account for a great part of cIMT, HDL-C and HL variation in Hyper-A (submitted to Journal of Human Genetics, 2007).

Lately controversial studies had reported premature atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemic individuals with CETP or HL deficiencies (12, 13,14) indicated that high HDL-C do not necessarily protect against CAD and Sich et al (6) presented information of increased carotid plaques in severe Hyper-A.

The carotid artery intima-media thickness (IMT) is a reliable surrogate marker of the arteriosclerosis and could be easily investigated with high resolution B-mode sonography. Due to its good reproducibility, the IMT measurement is optimal for tracking the progression or regression of atherosclerotic disease. High-resolution ultrasonography is a non invasive technique that allows changes in the arterial wall of carotid and femoral arteries to be seen and measures the thickness of the arterial intima-media complex.

Cross-sectional and population studies indicate an association between carotid IMT and cardiovascular disease prevalence, CAD risk factors (15). More importantly in prospective studies, carotid (cIMT) was able to predict coronary artery disease (CAD).

As was shown in prospective epidemiological studies, a modest increase in IMT substantially increases the risk for myocardial infarction (16). Noninvasive IMT studies have allowed a more refined view of the progression of atherosclerosis over age both in large epidemiological studies as well as in small study groups (17).

The increase of IMT is influenced by numerous vascular risk factors (age, smoking, hypertension, dyslipidemia, alcohol etc.) and positively associated with the incidence of vascular events in the arterial vasculature (stroke, myocardial infarct). Studies with lipid-lowering, antihypertensive, antidiabetic drugs, hormones confirmed that modifying of vascular risk factors significantly reduces the progression of IMT. It is probable, that reduced progression of IMT is also accompanied with the decrease of future vascular events (18).

Whether hyperalphalipoproteinemia and HDL subfractions can modify carotid intima-media (cIMT) thickness and/or influences the relationship of clinical and biochemical parameters with cIMT it remains to be clearly determined

The present study has important clinical implications. It was initiated to test the hypothesis that in hyperalphalipoproteinemic individuals the variation in intima-media thickness, an accepted marker of sub-clinical atherosclerosis, is independent of antropometrical and metabolic factors.

Materials and Methods

Subjects

This study was conducted on 169 consecutive individuals, native to an urban area in the State of São Paulo in Brazil (113 females and 56 males), aged from 16 to 78 years old, who were classified as hyperalphalipoproteinemic (Hyper-A, n = total 71, 60 Females, F and 11 Males, M) defined by HDL-cholesterol (C) above or equal to 68.0 mg/dL), according to the 90th percentile value obtained from a local normolipidemic population sample (n=1700) in a previous study (de Faria et al., unpublished data) and controls (CTL, n=total 98, 53 F and 45 M), with HDL-C above 32 and below 68.0 mg/dL).

These individuals were chosen after a preliminary laboratory and clinical selection of asymptomatic individuals and were invited by a letter to take part in this study. In a second visit their anthropometric data were taken and they answered a questionnaire including the presence of angina pectoris, myocardial infarction, coronary insufficiency, the history of coronary revascularization procedures, coronary angioplasty and coronary grafting bypass. The presence of menopause was assumed among women aged >51 years old in accordance with the North American Menopause criteria (19).

The Ethical Committee of the School of Medicine of the State of São Paulo approved all procedures and the participants gave written informed consent to participate in the study.

Individuals were excluded if they fulfilled one of the following criteria: BMI>30 (Kg/m²), diabetes mellitus, liver and kidney diseases and a history of alcohol abuse. The two groups were matched by ethnicity, body mass index and waist circumference.

Smoking was defined as the repetitive habit of smoking cigarettes and sedentaryness as the absence of moderate-intensity aerobic physical activity for a minimum of 30 min on five days each week or vigorous-intensity aerobic physical activity for a minimum of 20 min on three days each week (20).

Combined dyslipidemia was defined as in NCEP's recommendation (21): C $\geq$ 200mg/dL (Hypercholesterolemia) and TG $\geq$ 150mg/dL (Hypertriglyceridemia) or TG $\geq$ 150mg/dL and HDL-C<40mg/dL or C $\geq$ 200mg/dL and HDL-C<40mg/dL.

Established coronary artery disease (CAD) included acute myocardial infarct cases (detected in a hospital facility), silent myocardial infarct based in the electrocardiogram (ECG) and/or angina pectoris.

Familial CAD was defined as CAD in 1st degree relatives, with ages <45y men and <55 in women, as recommended by the *IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterorclerose* (21).

Biochemical measurements

Blood samples were collected at baseline from participants after an overnight fast Cholesterol (C), triglyceride (TG), glucose (Glu) uric acid and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured using specific enzymatic reagents in an automated system (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). The low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated by Friedewald (22) formula Lp(a), Apolipoproteins AI and B100 were measured by nephelometry (Dade Behring, Marburg, Germany).

Isolation of HDL₂ and HDL₃ by microultracentrifugation (Airfuge, Beckman) enabled the isolation of the plasma lipoproteins with a continuous KBr gradient using the general procedure of Eyre J. et al (23).

Determination of lipases and transfer proteins

Hepatic Lipase (HL) and lipoprotein lipase (LPL) activities were measured in post-heparin plasma samples. Heparin was injected intravenously (100 international units/kg of body weight) and the samples were collected 15min later.

The activity was measured on the basis of fatty acids 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).

The activity of CETP was measured by an exogenous assay (25). That measures the transfer of radiolabelled cholesteryl ester between a normal donor pool of [¹⁴C] cholesteryl ester-HDL and unlabelled acceptor mixture of VLDL plus LDL with plasma as CETP source. The results were expressed as a percentage of cholesteryl ester transferred from HDL to apoB containing lipoproteins (VLDL+LDL) in 4 hours at 37°.

The activity of PLTP was measured by an exogenous radiometric method using phospholipid liposomes as substrate (26) and an HDL pool obtained from healthy donors as the acceptor.

Carotid β -mode ultrasound

High resolution B-mode carotid ultrasonography was performed by a single trained sonographer, who was blinded to the subject's identity, using a 4-12 MHz linear array ultrasound imaging system (ATL HDI 1500 and 3500 Ultrasound System, Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA and Logic 400, General Electric Healthcare, Milwaukee, EUA). The far wall of the distal 1 cm of the left and right common carotid arteries was scanned according to a standardized method (27). The carotid intima-media thickness (IMT) was calculated as the mean of five measurements on each side (right and left common carotid). The IMT individual results were expressed as right and left and as a mean of both in mm. The presence of atherosclerotic lesion was assumed with equal or above 1mm in accordance with Clambless et al., (28).

Statistical Analysis

Statistical evaluations were performed using SPSS software. Logarithmic transformation was performed on individual values of skewed variables, if not otherwise stated. Sex and age adjusted data values were used in most analyses using partial correlations. Group differences in continuous and categorical variables were determined by using Mann Whitney, Kruskal Wallis respectively, ANCOVA and Chi-square test. Partial Spearman correlation coefficients assessed the association between the parameters. Stepwise linear regression analysis were performed for right, left and mean cIMT as the dependent variables and using the stepwise method by entering each dependent variable with the maximal difference. The dependent variables were: age, BMI, waist-to-hip ratio (WHR), blood pressure, C, TG, PL, HDL-C, HDL₂C, HDL₂TG, HDL₃C, HDL₃TG, LDL-C, LDL size (LDL/ApoB), VLDL-C, Lp(a), ApoAI, ApoB100, LH, LPL, CETP and PLTP.

Differences and correlations at p-values <0.05 were considered statistically significant, and p values ≥ 0.05 and ≤ 0.10 were considered statistically borderline.

Results

Clinical and biochemical characteristics

The characteristics of the selected individuals are shown in Table 1. The population sample was composed of 169 subjects, 113 females (67%) and 56 males (33 %, $p \leq 0.001$). In Hyper-A ($n=71$) there were 60 females (85%) and 11 males (15%, $p \leq 0.001$), with equal mean ages (F, 56 ± 12 vs M, 52 ± 16 , NS). The CTL group ($n=98$) was comprised of 53 females (54%) and 45 males (46%, NS), with different average ages (f, 45 ± 14 vs m, 34 ± 15 , $p \leq 0.001$) males being younger.

Hyper-A was older than CTL ($p \leq 0.001$), had higher frequency of hypercholesterolemia ($n=56$, $p \leq 0.002$), hypertension ($n=44$, $p \leq 0.004$), sedentariness ($n=52$, $p \leq 0.001$) and menopausal women, ($n=45$, $p \leq 0.001$) than CTL.

Table 1- Clinical characteristics of hyperalphalipoproteinemic (Hyper-A) and control (CTL) individuals

PARAMETERS	Hyper-A (68-71)	CTL (95-98)	p-VALUES
Age (years)	55 ± 12	40 ± 16	<0.001
Sex (F/M)	60/11	53/45	<0.001
BMI (Kg/m2)	26 ± 6	24 ± 4	NS
WHR (cm)	82 ± 13	80 ± 10	NS
Systolic BP(mmHg)	129 ± 16	123 ± 14	NS
Diastolic BP (mmHg)	82 ± 10	80 ± 10	NS
Combined Dyslipidemias *	65/6 (6/0)	86/12 (9/3)	NS
Hypercholesterolemia*	15/56 (50/6)	67/31(26/5)	≤0.002
Hypertriglyceridemia*	65/6 (6/0)	86/12 (9/3)	NS
Hypoalphalipoproteinemia*	0/0	84/14 (3/11)	-
Smoking*	66/3	89/4	NS
Hypertension*	27/44 (35/9)	58/38 (25/13)	≤0.004
Sedentariness*	17/52 (47/5)	54 /37 (27/15)	≤0.001
Menopause*	15/45	32/21	≤0.001
CAD*	62/7 (6/1)	56/5 (2/3)	NS
Familial CAD*	32/35 (31/4)	38/23 (15/8)	NS

Values expressed by means ± standard deviations (sample numbers); *No/Yes; (F/M) (females/males); BMI= Body Mass Index, WHR= Waist-to-Hip ratio, Systolic BP= Systolic Blood Pressure, Diastolic BP=Diastolic Blood Pressure; CAD= Coronary Artery Disease; Mann-Whitney and Qui-Square for controls vs Hyper-A, adjusted for age and sex by ANCOVA; NS= not significant

Hyper-A phenotype was characterized as in Table 2 by increased cholesterol, ApoAI, and HDL-C and C in subfractions 2 and 3 and reduced HL activity.

Table 2- Biochemical characteristics of hyperalphalipoproteinemic (Hyper-A) and control (CTL) individuals

PARAMETERS	Hyper-A (61-71)	CTL (84-98)	p-VALUES
C (mg/dL)	228 ± 35	179 ± 41	≤0.001
TG (mg/dL)	92 ± 38	91 ± 45	NS
PL (mg/dL)	224 ± 42	202 ± 58	NS
HDL-C (mg/dL)	80 ± 9	52 ± 10	***
HDL2-C (mg/dL)	18 ± 4	12 ± 7	≤0.001
HDL2-TG (mg/dL)	9 ± 5	7 ± 6	NS
HDL3-C (mg/dL)	60 ± 7	38 ± 10	≤0.001
HDL3-TG(mg/dL)	23 ± 10	18 ± 10	NS
LDL-C (mg/dL)	130 ± 33	110 ± 32	NS
LDL (LDL-C/ApoB)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 1.3	NS
VLDL-C (mg/dL)	18 ± 8	18 ± 9	NS
Lp(a) (mg/dL)	34 ± 33	26 ± 31	NS
Apo AI (mg/dL)	187 ± 31	144 ± 32	≤0.001
ApoB (mg/dL)	103 ± 24	89 ± 29	NS
HL (nmol FFA/mL/h)	1441 ± 1021	2531 ± 1517	≤0.001
LPL(nmol FFA/mL/h)	2671 ± 1730	2329 ± 1187	NS
CETP (%)	10 ± 8	15 ± 8	NS
PLTP (%)	16 ± 10	13 ± 9	NS
Glucose (mg/dL)	85 ± 8	84 ± 8	NS

Values expressed by means ± standard deviations (sample numbers); Mann-Whitney for controls vs. Hyper-A, adjusted for age and sex by ANCOVA; NS=not significant; ***= definition difference, C- Cholesterol, TG- Triglycerides, PL- Phospholipids, HDL- High-Density Lipoprotein, LDL- Low-Density Lipoprotein, VLDL- Very-Low Density Lipoprotein, Lp(a)- Lipoprotein (a), Apo AI- Apolipoprotein AI, ApoB- Apolipoprotein B, HL- Hepatic lipase, LPL- Lipoprotein lipase, CETP- Cholesteryl ester transfer protein, PLTP- Phospholipd transfer protein.

In Table 3 the carotid IMT values are shown and also the frequencies of IMT larger than 1mm for both groups.

Table 3- Radiological characteristics of hyperalipoproteinemic (Hyper-A) and control (CTL) individuals

PARAMETERS	Hyper-A (68-71)	CTL (95-98)	p-VALUES
IMT R (mm)	0.87 ± 0.25	0.69 ± 0.18	NS
IMT L (mm)	0.85 ± 0.24	0.68 ± 0.18	NS
Mean IMT (mm)	0.85 ± 0.24	0.69 ± 0.17	NS
Mean IMT (≥1/ ≤1mm)*	17/54	7/91	NS
IMT R (≥1/ ≤1mm)*	21/50	7/91	NS
IMT L (≥1/ ≤1mm) *	16/55	6/92	NS

IMT R (Right), L (Left) and mean carotid intima media thickness *no/yes; Mann-Whitney and Chi-square for Hyper-A vs CTL after ANCOVA adjustment for age and sex

As seen in Table 4 several variables correlated positively with cIMT in CTL, SysB, VLDL-C and negatively CETP, but none in Hyper-A as shown in Table 3. Surprisingly HDL-C and HDL₃-TG interacted positively with IMT in CTL.

Table 4- Spearman correlation coefficients of carotid artery intima-media thickness (IMT) with anthropometric and biochemical parameters in hyperalipolipoproteinemic (Hyper-A) and control (CTL) individuals

GROUPS	Carotid IMT (mm)	SysBP	HDL-C	HDL ₃ -TG	VLDL-C	CETP
Hyper-A (n= 53)	IMT R	-	-	-	-	-
	IMT L	-	-	-	-	-
	Mean IMT	-	-	-	-	-
CTL (n=73)	IMT R	0.29 ^a	-	-	-	-0.23 ^h
	IMT L	0.31 ^b	0.24 ^d	0.27 ^f	0.23 ^g	-
	Mean IMT	0.30 ^c	0.25 ^e	-	-	-

Sys BP= Systolic Blood pressure, HDL-C High-density lipoprotein cholesterol, HDL₃-TG= high-density lipoprotein 3 triglycerides, VLDL-C= very-low density lipoprotein, CETP= cholesteryl ester transfer protein, IMT R (Right), L (Left) and mean carotid intima media thickness; Spearman correlation coefficients, adjusted for age and sex; p values: a=0.011 b=0.008 c=0.010 d=0.037 e=0.033 f=0.022 g=0.049.

We further investigated the relationship of IMT with several metabolic variables in CTL (females and males). Although none of the following correlations reached statistical significance, we observed that in CTL men and women presented a positive correlation of IMT with HDL-C (M, $r=0.17$; F, $r= 0.21$) but on the contrary, in Hyper-A both sexes showed negative associations (M, $r= -0.13$; F, $r= -0.23$). The significant and positive correlations with IMT were: blood pressure (F, CTL). Table 5 displays the striking differences between the 2 groups indicating a pro-atherogenic phenotype in men, except for younger age.

Table 5- Clinical characteristics in controls (CTL) stratified by sex

PARAMETERS	Female (n=49-53)	Male (n=40-45)	p-VALUES
Age (years)	45 ± 14	34 ± 15	<0.001
Mean carotid IMT (mm)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.013
HDL-C (mg/dL)	57 ± 8	47 ± 10	<0.001
HDL2-C (mg/dL)	15 ± 8	10 ± 3	<0.001
HDL3-C (mg/dL)	41 ± 8	34 ± 10	0.013
Hepatic Lipase (nmol FFA/mL/h)	1965 ± 1497	3227 ± 1240	<0.001
Uric acid (mg/dL)	4 ± 1	10 ± 11	<0.001

Values expressed by means ± standard deviations (sample numbers); Mann-Whitney for controls vs. Hyper-A, adjusted for age and sex by ANCOVA

A stepwise linear regression analysis (Table 6) was performed with carotid mean and right and left IMT as the dependent variables and age, BMI, WHR, SysB, DiasBP, C, TG, PL, HDL-C, HDL₂C, HDL₂TG, HDL₃C, HDL₃TG, LDL-C, LDL (LDL/ApoB), VLDL-C, Lp(a), ApoAI, ApoB100, LH, LPL, CETP and PLTP as independent ones.

Carotid IMT was explained truly and independently by age in Hyper-A. Age explained positively 42% of the variations in carotid IMT. No other variable showed a direct relationship with IMT.

In CTL the main modulation was by age (63%) and by male sex (3%), systolic blood pressure (6%) and HDL₃C (2%).

Table 6- Influence of clinical and biochemical parameters on carotid artery intima-media-thickness (IMT) in hyperalipolipoproteinemic (Hyper-A) and control (CTL) individuals

Groups	Dependent Variables	Independent Variables	B (SE)	p-Values	Partial R ² (%)
Hyper-A	IMT R (n=53)	Age	0.72 (0.12)	<0.001	42
	IMT L (n=53)	Age	0.74 (0.12)	<0.001	44
	Mean IMT (n=53)	Age	0.69 (0.12)	<0.001	41
CTL	IMT R (n=73)	Age	0.37 (0.06)	<0.001	55
		Male sex	0.05 (0.02)	0.005	3
		SysBP	0.47 (0.15)	0.003	5
		HDL ₃ C	0.16 (0.08)	0.044	2
	IMT L (n=73)	Age	0.43 (0.05)	<0.001	62
		Male sex	0.05 (0.01)	0.003	2
		SysBP	0.47 (0.14)	0.001	5
		HDL-C	0.19 (0.09)	0.035	1
	Mean IMT (n=73)	Age	0.39 (0.05)	<0.001	63
		Male sex	0.04 (0.01)	0.001	3
		SysBP	0.50 (0.13)	<0.001	6
		HDL ₃ C	0.16 (0.07)	0.022	2

Independent Variables: Age, BMI, WHR, SysB, DiasBP, C, TG, PL, HDL-C, HDL₂C, HDL₂TG, HDL₃C, HDL₃TG, LDL-C, LDL (LDL/ApoB), VLDL-C, Lp(a), ApoAI, ApoB100, LH, LPL, CETP and PLTP; IMTR (right) / IMTL (left) = carotid artery intima media thickness; Systolic BP= Systolic Blood Pressure, HDL-C = High-Density Lipoprotein Cholesterol and HDL₃C= High-Density Lipoprotein ₃ cholesterol
 CTL: IMT R = -2.00 + 0.37 x age + 0.05 x sex + 0.47 x SysBP+ 0.16 x HDL₃C, IMT L = -2.00 + 0.37 x age + 0.05 x sex + 0.47 x SysBP+ 0.16 x HDL-C; Mean IMT = -2.00 + 0.37 x age + 0.05 x sex + 0.47 x SysBP+ 0.16 x HDL₃C where: female sex =0 and male sex =1; IMT R, age, SysBP and HDL₃C are transformed in logarithmically (log10); Hyper-A: IMT R, IMT L and mean IMT = -1.32 + 0.72 x age where: IMT and age are transformed in logarithm (log10).

Discussion

The main new finding of this study is that carotid IMT is regulated only by age but not by clinical, anthropometric or biochemical factors in hyperlipoproteinemic individuals.

Hyper-A is characterized by plasma HDL-Cholesterol above the 90th percentile for the age and sex-matched general population. It is characterized by high-density lipoprotein particles with altered composition, metabolism, and function. It is a state that can be associated with low CAD risk and increased longevity (6).

In adults measuring carotid IMT has gained acceptance as a non-invasive, inexpensive method to assess the extent of atherosclerosis. Measurements of carotid IMT correlates well with pathological states like coronary heart disease, stroke, cardiovascular risk factors and it is a reproducible method (29).

However there are limited data on concerning carotid IMT in moderate hyperlipoproteinemia. In 1998 (6) Sich showed different plaque frequencies in two different Hyper-A phenotypes and recently (30) in 55 Hyper-A indicated a cIMT similarity with CTL plaque number between Hyper-A and CTL, and an elevation of HDL-C did not lead to a further reduction

Age and male sex are classical and important modulators of IMT definitely shown in ARIC study (31).

In this study, age, male sex, blood pressure (32) VLDL-C and CETP (inverse) were predictors of cIMT in CTL but in Hyper-A no relationship of IMT with these variables was seen.

The negative association of HDL-C and IMT mirrors the results of a vast literature on CHD as expected. But surprisingly CTL presented a positive association of IMT and HDL-C, not Hyper-A. The mechanism of the apparent weakening of HDL atheroprotection in controls remains to be better better clarified.

We analyzed the correlations between HDL-C and carotid mean cIMT in both groups and separated them by sex: Hyper-A females (n= 43; p=0.14) and males (n=10; p=0.71) both negative; IMT L (n= 43; r= -0.29; p=0.053). In CTL females (n=41; p=0.20) and males (n=32; p=0.06) both positive. These data indicated that CTL was the

responsible for the unexpected relationship found. The less protective plasma profile may be part of the inverse relationship with HDL-C.

It also could be speculated that an altered chemical composition and/or functionality of HDL may contribute to dissociation with IMT. Low HDL-C subjects can display elevated oxidative stress and possess HDL particle subspecies with attenuated intrinsic antioxidative activity which is intimately related to their altered chemical composition. Altered chemical composition (core triglyceride enrichment, cholesteryl ester depletion) paralleled antioxidative dysfunction of HDL subfractions (33). In relation to these findings in common metabolic diseases, such as in type 2 diabetes and metabolic syndrome, deficiency of HDL particle number and function favor accelerated atherosclerosis (4). IMT and CETP in controls displayed an inverse relationship that could be consonant with core triglyceride enrichment and cholesteryl ester depletion, leading to dysfunctional HDL.

The main result of this study was the resistance to modulation of IMT by several metabolic and anthropometric factors in Hyper-A. Although possessing a higher risk CVD profile the similarity found in cIMT could in part be explained by the striking differences in its modulation between the two groups indicating a protective trait against carotid atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemia. It was assumed that these findings were an indication of atheroprotection being carotid IMT variation resistant to modulating factors as in CTL.

In summary we examined the association of several anthropometric and biochemical variables on carotid IMT in hyperalphalipoproteinemic asymptomatic individuals at baseline. Our hypothesis was confirmed. The reduced protection in controls is in accord with the positive correlation of IMT with HDL-C.

Acknowledgements

We thank Miriam Danelon for the excellent technical work, and Helymar Machado for statistical support. This work was supported in part by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- 1- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1):8-15.
- 2- Bruckert E, Hansel B. HDL-c is a powerful lipid predictor of cardiovascular diseases. *Int J Clin Pract*. 2007 *article in press*.
- 3- Fielding PE, Fielding CJ. Intracellular transport of low-density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry*. 1996; 35(47):14932-8.
- 4- Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall ? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; (3):144-53. Review.
- 5- Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, et al. Increased high-density-lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med*, 1990, 323(18):1234-8
- 6- Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Egloff M, Auer C, Gautier V, Turpin G, Beucler I. Hyperalphalipoproteinemia: Characterization of a Cardioprotective Profile associating increased High-Density Lipoprotein² Levels and Decreased Hepatic Lipase Activity. *Metabolism* 1998; 47 (8): 965-973
- 7- Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. Antioxidative activity of HDL particle subspecies is impaired in hyperalphalipoproteinemia: relevance of enzymatic and physicochemical properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(3): 526-33.
- 8- Hovingh GK, de Groot E, van der Steeg W, Boekholdt SM, Hutten BA, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2005; (2): 139-45.
- 9- Yamashita S, Maruyama T, Hirano K, Sakai N, Nakajima N Matsuzawa Y. Molecular mechanisms, lipoproteins abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2000;152:271-85.

- 10- Alarcon BK, Oliveira HCF, Harada LM, Nunes VS, Kaplan D, et al. Moderate hyperalphalipoproteinemia in a Brazilian population is related to lipoprotein lipase activity, alipoprotein A-I concentration, age and body mass index. *Clin Sci* 2004;106:11-17.
- 11- Kaplan DB, Schreiber R, Oliveira HC, Harada LM, Nakamura RT, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene mutations in Brazilian hyperalphalipoproteinemia. *Clin Gen* 2006; 69(5) 455-457.
- 12- Matsuzawa Y, Yamashita S, Funahashi T, Yamamoto A, Tarui S. Selective reduction of cholesterol in HDL₂ fraction by probucol in familial hypercholesterolemia and hyper HDL₂ cholesterolemia with abnormal cholesteryl ester transfer. *Am J Cardiol.* (1989); 62: 66B–72B.
- 13- Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nosaki S, et al. Atherosclerosis disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1849-56.
- 14- Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A; Elevated HDL cholesterol is a risk factor for ischemic heart disease in white women when caused by a common mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene. *Circulation.* 2000; 101(16):1907-12
- 15- Zureik M, Ducimetière P, Touboul PJ, Courbon D, Bonithon-Kopp C, Berr C, Magne C. Common carotid intima-media thickness predicts occurrence of carotid atherosclerotic plaques: longitudinal results from the Aging Vascular Study (EVA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(6):1622-9.
- 16- Hoving GK, de Groot E, van der Steeg W, Boekhoudt SM, Hutten BA, et al. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2005; 16(2):139-45.
- 17- de Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart JC, Kastelein JJ Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation.* 2004 Jun 15; 109 (23 Suppl 1):III33-8. Review.

- 18- Csiba L. Carotid intima-media thickness measured by ultrasonography: effect of different pharmacotherapies on atherosclerosis progression. *Orv Hetil.* 2005; 146 (23):1239-44.
- 19- Pedro AO, Neto AMP, Paiva LHS, Osis MJ, Hardy E. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. *Rev Saude Publica.* 2003 Dec; 37(6): 735-42
- 20- Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, et al., Physical Activity and Public Health. Updated Recommendation for Adults From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 2007; *article in press*
- 21- Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2007; 88 (1): 2-19.
- 22- Friedwald WF, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of LDL-cholesterol concentration without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
- 23- Eyre JA, Hammett F, Miller NE. A micro-method for the rapid ultracentrifugal separation of human plasma high density lipoprotein subfractions, HDL₂ and HDL₃. *Clin Chim Acta* 1981; 114 (2-3): 225-231
- 24- Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1998;129: 716-38.
- 25- Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* 1998; 110: 231-41.
- 26- Damen J, Regts J, Scherphorp G. Transfer of [14C] phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of transfer stimulation plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta* 1982;712:444-452.

- 27- Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of arterial disease). *Circulation*. 1999; 100(9): 951-7
- 28- Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol*. 1997; 146(6): 483-94.
- 29- de Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart JC, Kastelein JJ. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109(23 Suppl 1):III33-8. Review
- 30- Baldassamare D, Amato M, Pustina L, Tremoli H, Sirtori C, Calabresi L, Franceschini G. Increased Carotid Artery intima-Media Thickness in Subjects With Primary Hypoalphalipoproteinemia. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2002; 22(2): 317-22.
- 31- Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, Burke GL. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. *Stroke*. 1993; 24(9):1297-304.
- 32- Holaj R, Zelinka T, Wichterle D, Petrák O, Strauch B, Widimský J Jr. Increased intima-media thickness of the common carotid artery in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension. *J Hypertens*. 2007; (8): 1749.
- 33- Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis*. 2005; 182(2):277-85.

**HEPATIC LIPASE –514C/T POLYMORPHISM IS NOT ASSOCIATED WITH
HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN (HDL)-CHOLESTEROL, HEPATIC LIPASE
ACTIVITY AND COMMON CAROTID INTIMA-MEDIA THICKNESS IN
BRAZILIAN HYPERALPHALIPOPROTEINEMICS**

Santiago F.D.¹; Schreiber R.²; Nakamura R.T.⁴; de Faria E.C.^{1,2,3}

Clinical Pathology¹ and Internal Medicine² Departments, Dislipidemia Out-patient Service,
HC³, University of Campinas and Diagnostic Image Laboratory, Campinas,⁴
São Paulo, Brazil

Trabalho Científico 2- submetido ao *Journal of Human Genetics*

Abstract

Hepatic lipase (HL) is a key enzyme involved in lipid metabolism and atherosclerosis. The aim of this study was to evaluate the effects of HL -514 C/T polymorphism on carotid intima-media thickness (cIMT) in hyperalphalipoproteinemic (Hyper-A) individuals. One-hundred and sixty-nine individuals comprised this study- 71 Hyper-A (HDL-C $\geq$ 68 mg/dL) and 98 controls (CTL, n=98, HDL-C $\geq$ 32 and <68 mg/d). There were no group differences in HL -514 C/T genotype frequencies. The polymorphism did not contribute to variations in cIMT, to atherosclerotic lesion frequencies equal and above 1mm and HDL-cholesterol in Hyper-A individuals. No associations among HL -514 C/T polymorphism, HDL-cholesterol, hepatic lipase activity and cIMT were found.

Keywords- -514C/T polymorphism, carotid intima-media thickness, hepatic lipase, HDL-cholesterol, hyperalphalipoproteinemia

Introduction

Hepatic Lipase (HL) hydrolyzes triglycerides and phospholipids in lipoproteins and acts as a ligand between lipoproteins and liver receptors (1).

Hyperalphalipoproteinemia (Hyper-A) provides a good model to study some gene polymorphisms because it is characterized by high plasma HDL-cholesterol related mainly to HL or cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiencies (2; 3).

The HL-514C/T polymorphism, C allele characterized by higher HL activity, has been associated with greater carotid intima-media thickness (cIMT) (4) and was an increased risk factor for acute myocardial infarction in early middle-aged men (5).

Although the T allele of HL-514C/T polymorphism associated with low HL activity has been recently suggested to be a novel risk factor for coronary heart disease (CHD) (6) but, other studies found neutral effects (7).

Some studies showed that the -514C/T polymorphism did not change the cIMT (8; 9). Thus, the relationship between cIMT or CHD risk and HL-514 C/T has not yet been clearly established.

No other studies were found about HL-514C/T polymorphism in Hyper-A individuals and cIMT; however a study associated the T allele with HDL concentration increase in Hyper-A (9).). It would be expected that HL-514C/T conferred atheroprotection on Hyper-A individuals.

The aim of this paper was to determine the effects of HL-514 C/T polymorphism on cIMT in moderate Hyper-A.

Materials and Method

All the 169 individuals, 113 women and 56 men, aged 16 to 79 years old - did not present clinical atherosclerotic manifestations. They were classified in two groups as controls (CTL, n=98, HDL-C ≥ 32 and < 68 mg/dL) or hyperalipoproteinemic (Hyper-A, n= 71, HDL-C ≥ 68 mg/dL) according to HDL-C 90th percentile value obtained from a local population in a previous study (de Faria E, unpublished data).

The Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine Science, UNICAMP approved all procedures and the participants signed written informed consent to participate in the study.

Lipids and lipoproteins were measured by conventional enzymatic and/or homogeneous techniques and separated by microultracentrifugation. HL activity was measured in post-heparin plasma samples on basis of the fatty acid release, using a radiolabelled triolein emulsion as the substrate (10).

The HL-514C/T genotypes were identified by PCR, using the restriction enzyme NlaIII, according to Jansen et al. (11). The genotypes were CC, TC, TT; TC and TT were combined for analyses.

In accordance with Simons et al (12) the individuals underwent high resolution B-mode carotid ultrasonography, which was conducted by a single trained sonographer, blinded to the subject's identity, using a 4-12 MHz linear array ultrasound imaging system (ATL HDI 1500 and 3500 Ultrasound Systems, Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA). The presence of atherosclerotic lesions was considered with cIMT ≥ 1 mm as related by Chambless et al. (13)

Statistical tests were used for variable comparisons and associations. Significant and borderline differences were detected when $p \leq 0.05$ or $p < 0.10$ respectively.

Results

The figure 1 shows PCR digestion of -514C/T polymorphism assay using NlaIII on agarose gel.

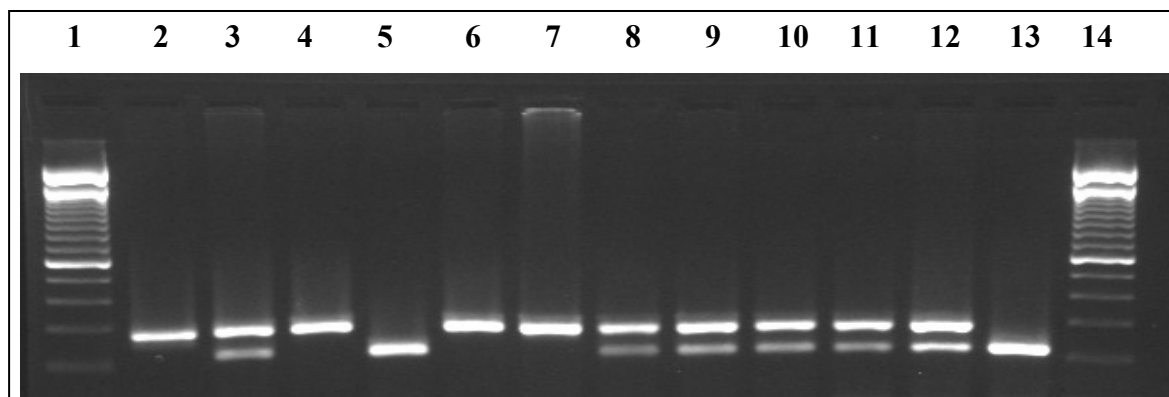


Figure 1- HL-514C/T polymorphism. PCR digestion assay using NlaIII on agarose gel: lanes 2, 4, 6 and 7:CC (-/-) (300 bp), lanes 3, 8-12: TC (+/-) (215 bp), lanes 5, 13: TT (+/+) (85 bp; lanes 1,14: molecular weight markers- 100 bp

The polymorphism was highly prevalent in Hyper-A individuals as well as in controls and no differences in frequencies were observed among the genotypes in both groups ($p \leq 0.454$). The genotypic frequencies were: CC 41%, TC 37%, TT 22%, TC+TT 59% in Hyper-A individuals and CC 42%, TC 43%, TT 15%, TC+TT 61% in controls (test for Hardy-Weinberg equilibrium in Hyper-A individuals $p = 0.041$ and CTL, $p = 0.440$). Another study in our lab (not published) using a larger Brazilian population sample ($n = 291$) indicated that HL-514C/T polymorphism frequency was similar in eight out of 40 study reports (13- 20).

Table 1 presents lipids, lipoproteins and anthropometric data. The Hyper-A individuals total were older ($p \leq 0.001$), had a higher female frequency (66%) ($p \leq 0.001$), as well as higher cholesterol concentration (35%) ($p \leq 0.001$) and HDL-C sub-fractions (33%) ($p \leq 0.001$); their HL activity was lower (43%) ($p \leq 0.021$).

Table 1- Inter group and inter genotypic characteristics by -514C/T genotypes of hyperalphalipoproteinemic (Hyper-A), controls (CTL) and inter groups (TOTAL)

PARAMETERS	Hyper-A			CTL		
	Total (68-71)	CC (n= 27-29)	TC+TT (n= 39-42)	Total (95-98)	CC (n= 27-29)	TC+TT (n= 55-57)
Age (years)	55 ± 12*	54 ± 11†	51 ± 13†	40 ± 16	42 ± 16†	42 ± 15†
Sex F/M (n)	60/11*	27/2	33/9	53/45	18/23	35/22
C (mg/dL)	228 ± 35*	233 ± 35†	225 ± 35†	179 ± 41	177 ± 37†	179 ± 44†
TG (mg/dL)	92 ± 38	91 ± 38	93 ± 38	91 ± 45	89 ± 40	92 ± 48
HDL-C (mg/dL)	80 ± 9	79 ± 9	81 ± 8	52 ± 10	49 ± 10 ^e	54 ± 10 ^e
HDL ₂ C (mg/dL)	18 ± 4*	13 ± 4	18 ± 5	12 ± 7	12 ± 9 ^f	18 ± 4 ^f
HDL ₂ TG (mg/dL)	9 ± 5	7 ± 5	9 ± 5	7 ± 6	7 ± 6	8 ± 4
HDL ₃ C (mg/dL)	60 ± 7*	40 ± 10	60 ± 7	38 ± 10	35 ± 9 ^g	60 ± 7 ^g
HDL ₃ TG (mg/dL)	23 ± 10	19 ± 10	24 ± 10	18 ± 10	17 ± 11	23 ± 9
LDL-C (mg/dL)	130 ± 33	135 ± 34	125 ± 32	110 ± 32	112 ± 31	109 ± 33
VLDL-C (mg/dL)	18 ± 8	18 ± 8	18 ± 7	18 ± 9	18 ± 8	19 ± 9
HL (nmol FFA/mL/h)	1441 ± 1021†	1681 ± 989	1269 ± 1022†	2531 ± 1517	2974 ± 1511 ^h	2187 ± 1445 ^{h,†}

Mann-Whitney for CC vs TC+TT; C, TG, HDL-C, LDL-C and HL- values expressed by mean ± standard deviation and (sample number); adjustment by ANCOVA; p-Values adjusted for age and sex to Hyper-A vs CTL: *=<0.001, †=0.021; ‡ =inter groups: a<0.001, b=<0.001, c=0.005, d=0.001, inter-genotypic e=0.033, f=0.010, g=0.009, h=0.006, i=0.025

Intergenotypic differences between the CC vs TC and TT genotypes were observed in CTL: HDL-C (9%) ($p \leq 0.033$), HDL₂C (33%) ($p \leq 0.010$), HDL₃C (8%) ($p \leq 0.009$) and HL activity was 26% reduced ($p \leq 0.006$).

The intergroup differences between genotypes were: Hyper-A individuals older ($p \leq 0.001$), higher cholesterol ($p < 0.005$) in both genotypes and reduced HL activity in TC and TT ($p = 0.025$) decreased HL activity in allele T carriers and increased cholesterol in both genotypes but they did not cIMT, after correction for age and sex. This finding could indicate an attenuation of carotid atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemia.

Table 2 presents the carotid ultrasound results. There were no differences in cIMT (mm) and frequency of cIMT values equal and above 1mm among genotypes in both groups however cIMT tended to be higher in CC genotype in Hyper-A individuals ($p<0.09$).

Table 2- Inter group and inter genotypic carotid INTIMA-MEDIA thickness by hepatic lipase -514C/T genotypes in hiperalphalipoproteinemic (Hyper-A), controls (CTL) and inter groups (TOTAL)

PARAMETERS	Hyper-A			CTL		
	Total (71)	CC (27-29)	TC+TT (39-42)	Total (98)	CC (27-29)	TC+TT (55-57)
IMT R (mm)	0.87 ± 0.25	0.86 ± 0.21^a	0.87 ± 0.26	0.69 ± 0.18	0.68 ± 0.15^a	0.70 ± 0.19
IMT L (mm)	0.85 ± 0.24	0.83 ± 0.17	0.86 ± 0.27	0.68 ± 0.18	0.66 ± 0.17	0.68 ± 0.18
Mean IMT (mm)	0.85 ± 0.24	0.87 ± 0.17^b	0.86 ± 0.24	0.69 ± 0.17	0.59 ± 0.17^b	0.57 ± 0.18
IMT R ($\geq 1\text{mm}$)*	50/21	23/6	27/12	91/7	39/2	52/5
IMT L ($\geq 1\text{mm}$)*	55/16	24/5	31/11	92/6	39/2	53/4
Mean IMT (≥ 1) *	54/17	24/5	30/12	91/7	40/2	52/5

Values expressed by mean $\pm$ standard deviation and (sample number); adjustment by sex and age by ANCOVA; Mann-Whitney and Chi-Square for CC vs TC+T; a=0.083; b= 0.096; IMT R (Right), L (Left) and mean carotid intima-media thickness; *No/Yes, ($\geq 1\text{mm}$)

In addition, associations of -514C/T polymorphism with HDL-C ($p\leq 0.157$), hepatic lipase ($p\leq 0.408$), cIMT ($p\leq 0.554$) and cIMT values equal and above 1mm frequency ($p\leq 0.220$) in both groups were not significant.

Discussion

To our knowledge, this is the first study in the literature that investigates the effects of HL-514C/T polymorphism on cIMT in hyperalphalipoproteinemic individuals.

There are only 3 reports concerning cIMT and HL-514C/T polymorphism all in different situations. Rundek et al (4) found CC genotypes and increased cIMT in stroke-free individuals but, Burdon et al. (8) with type 2 diabetes mellitus and Isaacs et al. (9) in a large prospective cohort study found no associations

In other studies, the CC genotype was positively associated with an abundance of macrophages in patients with severe carotid artery stenosis (21), while the C allele was associated with decreased neointimal formation (22). The T allele was found beneficial in hormone replacement therapy users on atherosclerosis progression (5).

In the present study, the characterization of a biochemical Hyper-A profile with HL deficiency was accomplished as well as of HL-514C/T polymorphism. There were no differences among genotypes on Hyper-A individuals and CTL in cIMT mean and frequency of values equal and above 1mm. The CC genotype only tended to increase in Hyper-A individuals.

We conclude that the HL-514C/T polymorphism did not contribute to variations of cIMT as well as in cIMT values equal and above 1mm in moderate hyperalphalipoproteinemia.

Aknowledgements

We thank Miriam Danelon and Maria Laura Yamashita Cruz for the excellent technical work. This work was supported in part by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- 1- Hegele RA, Little JÁ, Vezina C, Maguire GF, Tu L, Wolever TS, Jenkins DJ, Connelly PW. Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. *Arterioscler Thromb* 1993; (5): 720-728.
- 2- Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990; 323 (18): 1234-1238.
- 3- Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, Arai T, Yanagi K, Takami S, Menju M, Ishigami M, Yoshida Y, Kameda-Takemura K, Hayashi K, Matsuzawa Y. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15 (11): 1849-1856.
- 4- Rundek T, Elkind MS, Pittman J, Boden-Albala B, Martin S, Humphries SE, Juo SH, Sacco RL. Carotid intima-media thickness is associated with allelic variants of stromelysin-1, interleukin-6, and hepatic lipase genes: the Northern Manhattan Prospective Cohort Study. *Stroke* 2002; 33 (5): 1420-1423.
- 5- Fan YM, Lehtimäki T, Rontu R, Ilveskoski E, Goebeler S, Kajander O, Mikkelsen J, Perola M, Karhunen PJ. Age-dependent association between hepatic lipase gene -480C/T polymorphism and the risk of pré-hospital sudden cardiac death: The Helsinki Sudden death study. *Atherosclerosis* 2007; 192 (2): 421-427.
- 6- Dugi KA, Brandauer K, Schmidt N, Nau B, Schneider JG, Mentz S, Keiper T, Schaefer JR, Meissner C, Kather H, Bahner ML, Filhn W, Kreizer J. Low hepatic lipase activity is a novel risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104(25):3057-3062.
- 7- Zhang C, Lopez-Ridaura R, Rimm EB, Li T, Hunter DJ, Hu FB. Genetic variation in the hepatic lipase gene and the risk of coronary heart disease among US diabetic men: potential interaction with obesity. *Diabetologia* 2006; 49: 1552-1559.

- 8- Burdon KP, Langefeld CD, Beck SR, Wagenknecht LE, Carr JJ, Freedman BI, Herrington D, Bowden DW. Association of gene of lipid metabolism with measures of subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. *J Med Genet* 2005; 42: 720-724.
- 9- Isaacs A, Sayed-Tabatabaei FA, Hofman A, Oostra BA, Klungel OH, et al. The cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with increased high-density lipoprotein levels and decreased risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007; 14 (3):419-21.
- 10- Guerra R, Wang J, Grundy SM, Cohen JC. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94 (9): 4532-4537.
- 11- Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1998; 129:716-738.
- 12- Jansen H, Verhoeven AMJ, Weeks L, Kastelein JJ, Halley DJ, van den Ouweland A, Jukema JW, Seidell JC, Birkenhäger JC. 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* 1997; 17 (117): 2837-2842.
- 13- Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of arterial disease). *Circulation* 1999; 100 (9): 951-957
- 14- Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, Clegg LX. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 1997; 146 (6): 483-494.
- 15- Vega GL, Clark LT, Tang A, Marcovina S, Grundy SM, Cohen JC. Hepatic lipase activity is lower in African American men than in white American men: effects of 5' flanking polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC). *J Lipid Res* 1998; 39 (1): 228-232.

- 16- Nie L, Wang J, Clark LT, Vega ATGL, Grundy SM, Cohen JC. Body mass index and hepatic lipase gene (*LIPC*) polymorphism jointly influence postheparin plasma hepatic lipase activity J. Lipid Res 1998; 39: 1127–1130.
- 17- Grundy SM, Vega GL, Otvos JD, Rainwater DL, Cohen JC. Hepatic lipase activity influences high density lipoprotein subclass distribution in normotriglyceridemic men. Genetic and pharmacological evidence. J Lipid Res 1999; 40 (2): 229-234.
- 18- Hong SH, Song J, Kim JQ. Genetic variations of the hepatic lipase gene in Korean patients with coronary artery disease. Clin Chem 2000; 33 (4): 291-296.
- 19- Zambon A, Deeb SS, Brown BG, Honkanson JE, Brunzell JD. Common hepatic lipase gene promoter variant determines clinical response to intensive lipid-lowering treatment. Circulation 2001; 103 (6): 792-798.
- 20- Somekawa Y, Umeki H, Kobayashi K, Tomura S, Aso T Hamaguchi H Effects of hormone replacement therapy and hepatic lipase polymorphism on serum lipid profiles in postmenopausal Japanese women. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 4766-4770.
- 21- Yamakawa-Kobayashi K, Somekawa Y, Fujimura M, Tomura S, Arinami T, Hamaguchi H. Relation of the -514C/T polymorphism in the hepatic lipase gene to serum HDL and LDL cholesterol levels in postmenopausal women under hormone replacement therapy. Atherosclerosis 2002; 162 (1):17-21.
- 22- Fan YM, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Laine H, Raitakari OT. The influence of hepatic lipase -480C/T polymorphism on coronary flow reserve in young men is independent of the plasma cholesterol level. Atherosclerosis 2006; 188 (2): 391-397.
- 23- Faggini E, Zambon A, Puato M, Deeb SS, Bertocco S, Sartore S, Crepaldi G, Pessina AC, Pauleto P. 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. 2002; 40 (6):1059-66.

- 24- Zambon A, Puato M, Faggini E et al. Common hepatic lipase gene promoter variant predicts the degree of neointima formation after carotid endarterectomy: impact of plaque composition and lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis* 2006; 185 (1): 121-126.

**SIMILARITIES IN THE MODULATION OF PLASMA LIPIDS, LIPOPROTEINS
AND REGULATING PROTEINS BY HL -514C/T AND CETP I405V
POLYMORPHISMS IN HYPERALPHALIPOPROTEINEMIA**

Santiago F.D.^{1,2}, Kaplan D^{1,3}, Schreiber R.², Santos JE⁴, de Faria E.C^{1,2,3}

Clinical Pathology¹ and Internal Medicine² Department, FCM, and Dyslipidemia Out-patient Service³, HC, University of Campinas, University of São Paulo Medichal School⁴, Ribeirão Preto- Brazil

Keywords- Atherosclerosis, hepatic lipase polymorphism, cholesteryl ester transfer protein polymorphism, HDL and hyperalphalipoproteinemia

Trabalho científico 3- Em preparo para submissão ao *International Journal of Molecular Medicine*

Abstract

Objective: In order to investigate the hepatic lipase (HL) -514 C/T, cholesteryl ester transfer protein (CETP) I405V polymorphisms, on lipids parameters in a Brazilian population sample of hyperalphalipoproteinemic individuals.

Methods and Results: This study was conducted on 291 individuals, who are classified as control (CTL, n=138, HDL-C < 68.0 mg/dL or hyperalphalipoproteinemic (Hyper-A, n= 153, HDL-C $\geq$ 68.0 mg/dL). Lipids and lipoproteins were measured using specific enzymatic reagents except LDL-C that was calculated by Friedewald's equation. Apolipoproteins (Apo) AI and B100 were measured by nephelometric assay; isolation of HDL₂ and HDL₃ were performed by ultracentrifugation. HL, LPL, CETP and PLTP activities were measured in exogenous method. The polymorphisms are determined following the amplification of fragment using the polymerase chain reaction (PCR).

Conclusions: There was no association between HL-514C/T and CETP I405V polymorphisms and HDL-C concentration in Hyper-A there was only a reduced of LDL estimated particle size.

Introduction

Numerous epidemiologic studies confirmed that high plasma levels of high-density lipoprotein (HDL) protect against the development of atherosclerosis (1, 2, 3). Of the various athero protective properties that has been ascribed to this lipoprotein, its role in reverse cholesterol transport (RCT), the transport of cholesterol from peripheral cells to the liver, has been emphasized most strongly (4).

Both HL and CETP are involved in HDL metabolism. The common C-to-T substitution at -514 or -480 of the promoter region on the HL gene (LIPC) has been shown to be significantly associated with lower HL activity relative to the wild type (5; 6), in some population demonstrate significant positive effects on plasma HDL levels (5; 7). However, other studies fail to demonstrate an association between -514C/T and HDL-C (8). Shohet et al., 1999 (9) found in men with cardiovascular arterial disease (CAD), post heparin plasma hepatic lipase activity was 15% to 30 % lower in allele T carried and does not influence susceptibility to CAD.

Studying common CETP gene variants has not unfortunately provided clear insight into the relationship between CETP and atherosclerosis. Significant association of the II I405V with CETP activity or concentration and lower HDL levels were found in several studies (3, 10) but this was not consistently observed (11, 12)

Hyperalphalipoproteinemia (Hyper-A) characterized by high plasma HDL₂ levels has been related either to CETP deficiency or to decrease HL activity (13, 14) both abnormalities that were associated with longevity syndrome or with cardiovascular protection. The aim of this study was to determine the association between the -514C/T polymorphism in the promoter region of the LIPC and I405V polymorphism in the CETP gene in Hyper-A and their repercussion in plasma lipids and lipoproteins.

Materials and Methods

Subjects

This study was conducted on 291 individuals (212 females and 79 males), aged 16 to 79 years old, who are classified as control (CTL, n = 138, HDL-C below 68.0 mg/dL or hyperalphalipoproteinemic (Hyper-A, n = 153, HDL-C above or equal 68.0 mg/dL) according to the 90th percentile value obtained for the local population in previous study (de Faria et al., unpublished data)

The Ethical Committee of the School of Medicine of the State of São Paulo approved all procedures and the participants gave written informed consent to participate in the study.

Measurement of lipids and lipoproteins

Blood samples were collected at baseline from patients and controls after on overnight fast. The cholesterol (C), trygliceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was measured using specific enzymatic in the Hitashi-917 (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). The low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated by Friedewald formula (15). Apolipoproteins AI and B100 were measured by nephelometric assay in the Array 360 system.

Isolation of HDL₂ and HDL₃ by gradient density ultracentrifugation enabled isolation of the plasma lipoproteins with a continuous KBr gradient using the general procedure of Eyre J. et al 1981 (16).

Determination of lipases and transfer proteins

HL and lipoprotein lipase (LPL) activities were measured in post-heparin plasma sample on basis of the fatty acid release (17), using a radiolabelled triolein emulsion as the substrate and NaCl (1M) at the LPL inhibitor. The results were expressed as nmol of non-etherified fatty acid (NEFA).

The activity of CETP was measured by an exogenous assay that measures the transfer of radiolabelled cholesterol ester between a normal donor pool of [^{14}C] cholesterol ester-HDL and unlabelled acceptor mixture of VLDL plus LDL with plasma as CETP source. The results were expressed as a percentage of cholesterol ester transferred from HDL to apoB containing lipoproteins (VLDL+LDL) in 4 hours (18).

Polymorphism -514C/T of the hepatic lipase gene

Genomic DNA was prepared from peripheral blood leukocytes using the Salazar et al. method and stored at 4°C

This polymorphism is determined following the amplification of a 285bp fragment using the polymerase chain reaction (PCR). The primer sequences used were forward 5' TCT AGG ATC ACC TCT CAA TGG GTC a-3' and reverse 5'-GGT GGC TTC CAC GTG GCT GCC TAA G-3'. Following the digestion of the PCR product with NlaIII restriction enzyme, the fragments were separated by electrophoresis in 2.0% agarose gel and visualized under ultraviolet light (19).

Polymorphism I405V of the CETP gene

The determination of I405V was performed as described by Gudnason et al., (1999) (20). The fragments were amplified by PCR. The sequences primer used were forward: 5' TTGACT GCAGGAAGCTCTGGC-3' and reverse: 5'- TATTTTTTTCACGGATGGGCA-3', 142bp). The PCR products were subject to restriction enzyme analysis by digestion of the restriction endonuclease MspI at 37°C for 1h, and the length cut of 121 bp and 21 bp were found in the common V allele.

Statistical Analysis

Statistical evaluations were performed using SAS and SPSS software. The quantitative variables are presented as the means and standard deviation. Mean values were compared by Mann Whitney test, Kruskal Wallis test, ANCOVA and Chi-Square test and the differences were considered significant at p-values 0,05.

Results

The population studied was composed 291 subjects (212 females and 79 males) of whom 73% were females and 27% males with mean of age 47 years. The Hyper-A group was comprised of 84% females and 16% males, with an average age equal 52 years and CTL was comprised of 60% females and 40% males with an average age equal to 47. The two groups were slightly different in age and gender, and this is the reason why all statistics between groups were age and gender adjusted. The CTL group was comprised of 60% females and 40% males, with an age range of 41 years. Their HDL-C was 35% lower than the Hyper-A.

Table 1 shows genotype frequency in CTL, Hyper-A and the Studied Population. The frequency of IV in Hyper-A was larger than II in CTL.

No interaction was observed between HL -514C/T and CETP I405V polymorphisms.

Table 1- Genotypic frequencies for hiperalphalipoproteinemic (Hyper-A), controls (CTL) and total population sample

Polymorphism	Genotypes	Hyper-A * (n = 153)	CTL* (n = 138)	Studied Population* (n = 291)	p-Values*
LH -514C/T (n=291)	CC	60/39	55/40	115/39	NS
	TC	59/39	60/44	119/41	
	TT	34/22	23/16	57/ 10	
CETP I405V (n=282)	II	40/26	55/43	95/34	0.009
	IV	87/57	52/40	139/49	
	VV	26/17	22/17	48/17	

*values expressed as n/%; Abbreviations: CTL- Controls, HIPER-A- Hyperalphalipoproteinemic, LH= Hepatic lipase, CETP colesteryl ester transfer protein, -p-values by Qui-Square between CTL and HIPER-A.

The observed genotype frequencies in CTL were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium: CTL: HL -514C/T polymorphism $p=0.341$ and CETP I405V polymorphism $p=0.118$; in Hyper-A: HL -514C/T polymorphism $p=0.010$ and CETP I405V polymorphism $p=0.927$.

Table 2 and 3 summarize the influences of genotypes of HL-514C/T and CETP I405V polymorphisms on anthropometric and biochemical parameters in controls and hyperalipolipoproteinemic individuals.

Table 2- Influence of -514C/T polymorphism on anthropometric and biochemical parameters in hiperalipolipoproteinemic (Hyper-A), controls (CTL) and total population sample

Group Parameters	Hyper-A				p-Values
	Total sample (138-153)	CC (57-60)	TC (51-59)	TT (30-34)	p 1
Age (year)	52 ± 12	54 ± 11	52 ± 13	50 ± 15	NS
Gender F/M	129/24	55/5	46/13	28/6	NS
BMI (Kg/m ²)	25 ± 5	26 ± 6	24 ± 4	26 ± 6	0.011
WHR (cm)	81 ± 13	83 ± 11	77 ± 13	82 ± 13	NS
Systolic BP(mmHg)	126 ± 15	12 ± 17	124 ± 15	126 ± 14	NS
Diastolic BP (mmHg)	81 ± 11	82 ± 9	80 ± 12	81 ± 11	NS
C (mg/dL)	229 ± 41	238 ± 43	225 ± 42	217 ± 32	0.042
TG (mg/dL)	91 ± 39	95 ± 40	88 ± 40	89 ± 35	NS
PL (mg/dL)	226 ± 46	230 ± 47	232 ± 47	209 ± 39	0.049
HDL-C (mg/dL)	82 ± 11	80 ± 10	85 ± 14	80 ± 8	NS
HDL ₂ -C (mg/dL)	19 ± 5	18 ± 4	20 ± 6	18 ± 6	NS
HDL ₂ -TG (mg/dL)	9 ± 5	9 ± 6	8 ± 5	10 ± 5	NS
HDL ₃ -C (mg/dL)	60 ± 9	60 ± 9	61 ± 8	59 ± 10	NS
HDL ₃ -TG(mg/dL)	24 ± 10	23 ± 9	24 ± 10	24 ± 11	NS
LDL-C(mg/dL)	128 ± 37	139 ± 39	123 ± 36	119 ± 30	0.015
LDL (LDL/ApoB)	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.028
VLDL-C (mg/dL)	18 ± 8	19 ± 8	17 ± 8	18 ± 7	NS
Apo AI (mg/dL)	191 ± 34	186 ± 27	197 ± 42	189 ± 25	NS
ApoB (mg/dL)	102 ± 27	106 ± 27	101 ± 28	97 ± 23	NS
HL (nmol FFA/mL/h)	1496 ± 966	1744 ± 1027	1294 ± 847	1386 ± 968	NS
LPL(nmol FFA/mL/h)	2758 ± 1669	2684 ± 1626	2826 ± 1678	2777 ± 1777	NS
CETP (%)	10 ± 7	11 ± 7	9 ± 7	12 ± 9	NS
PLTP (%)	18 ± 11	18 ± 10	17 ± 11	20 ± 11	NS

Group Parameters	CTL				p-Values
	Total sample (118-138)	CC (41-55)	TC (42-60)	TT (15-23)	p1
Age (year)	42 ± 16	42 ± 16	41 ± 15	45 ± 16	NS
Gender F/M	83/55	27/28	39/21	17/6	NS
BMI (Kg/m ²)	25 ± 5	25 ± 5	25 ± 4	25 ± 6	NS
WHR (cm)	79 ± 10	80 ± 10	79 ± 9	79 ± 11	NS
Systolic BP(mmHg)	122 ± 14	121 ± 12	124 ± 17	120 ± 12	NS
Diastolic BP (mmHg)	79 ± 10	79 ± 10	80 ± 10	79 ± 8	NS
C (mg/dL)	186 ± 48 ^a	184 ± 43 ^a	187 ± 54 ^a	187 ± 43 ^a	NS
TG (mg/dL)	93 ± 46	98 ± 49	93 ± 49	83 ± 31	NS
PL (mg/dL)	201 ± 55 ^b	207 ± 53 ^b	203 ± 56 ^b	184 ± 54	NS
HDL-C (mg/dL)	53 ± 10	50 ± 10	54 ± 10	56 ± 9	0.048
HDL ₂ C (mg/dL)	12 ± 6 ^c	12 ± 8 ^c	12,6 ± 4 ^c	12 ± 4 ^b	NS
HDL ₂ TG (mg/dL)	8 ± 5	8 ± 6 ^d	8 ± 4	8 ± 6	NS
HDL ₃ C (mg/dL)	38 ± 10 ^d	36 ± 11 ^e	41 ± 10 ^d	41 ± 9 ^c	0.027
HDL ₃ TG(mg/dL)	19 ± 10 ^e	19 ± 11 ^f	20 ± 10 ^e	18 ± 8 ^d	NS
LDL-C (mg/dL)	115 ± 40	115 ± 34 ^g	115 ± 46	116 ± 34	NS
LDL (LDL/ApoB)	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.1 ^h	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.4	NS
VLDL-C (mg/dL)	19 ± 9	20 ± 10	19 ± 10	17 ± 6	NS
Apo AI (mg/dL)	145 ± 30 ^f	143 ± 29 ⁱ	148 ± 28 ^f	141 ± 39 ^e	NS
ApoB (mg/dL)	93 ± 32	96 ± 30	93 ± 35	88 ± 29	NS
HL (nmol FFA/mL/h)	2481 ± 1474 ^g	2776 ± 1489 ^j	2351 ± 1499 ^g	2084 ± 1284 ^f	NS
LPL (nmol FFA/mL/h)	2345 ± 1196 ^h	2116 ± 1248 ^k	2379 ± 1118	2828 ± 1161	0.026
CETP (%)	14 ± 8	15 ± 8 ^l	14 ± 8 ^h	13 ± 7	NS
PLTP (%)	15 ± 10	14 ± 10 ^m	15 ± 10	16 ± 11	NS

p-values adjusted for age and gender

Total Sample: CTL x Hyper-A a=<0.001, b= 0.031, c=<0.001, d= <0.001, e= 0.007, f= <0.001, g= <0.001, h=<0.001, I=0.029.

Polymorphism -514C/T

CC CTL versus CC Hyper-A a= <0.001, b= 0.037, c= <0.001, d=0.034, e= <0.001, f= 0.007, g= <0.001, h=<0.001, i= 0.007, j=<0.001, k= 0.048, l=0.007, m=0.049.

TC CTL versus TC Hyper-A a=<0.001, b=0.013, c=<0.001, d=<0.001, e= 0.019, f=<0.001, g=<0.001, h= <0.001, TT CTL versus TT Hyper-A a=0.008, b=<0.001, c=<0.001, d=0.032, e=<0.001, f=0.045.

Table 3- Influence of I405V polymorphism on anthropometric and biochemical parameters in hiperalphalipoproteinemic (Hyper-A) and control (CTL) and population sample individuals

Group Parameters	Hyper-A				p-Values
	Total Sample (138-153)	II (36-40)	IV (78-87)	VV (20-26)	p1
Age (year)	52 ± 12	51 ± 13	52 ± 13	53 ± 12	NS
Gender F/M	129/24	37/8	56/11	36/5	NS
BMI (Kg/m ²)	25± 5	25 ± 7	26 ± 5	25 ± 4	NS
WHR (cm)	81 ± 13	76 ± 12	83 ± 14	80 ± 9	NS
Systolic BP(mmHg)	126 ± 15	120 ± 14	128 ± 16	128 ± 14	0.028
Diastolic BP (mmHg)	81 ± 11	76 ± 10	83 ± 10	81 ± 11	0.012
C (mg/dL)	229 ± 41	219 ± 35	231 ± 44	236 ± 39	NS
TG (mg/dL)	91 ± 39	88 ± 38	93 ± 39	88 ± 39	NS
PL (mg/dL)	226± 46	230 ± 48	228 ± 47	215 ± 39	NS
HDL-C (mg/dL)	82 ± 11	79 ± 7	84 ± 13	80 ± 9	NS
HDL ₂ -C (mg/dL)	19 ± 5	18 ± 5	19 ± 6	19 ± 4	NS
HDL ₂ -TG (mg/dL)	9 ± 5	9 ± 4	10 ± 6	7 ± 6	0.012
HDL ₃ -C (mg/dL)	60 ± 9	58 ± 10	62 ± 9	59 ± 8	NS
HDL ₃ -TG(mg/dL)	24 ± 10	24 ± 9	24 ± 10	21 ± 9	0.043
LDL-C(mg/dL)	128 ± 37	122 ± 33	128 ± 38	139 ± 35	NS
LDL (LDL/ApoB)	1. 2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	NS
VLDL-C (mg/dL)	18 ± 8	18 ± 8	18 ± 8	17 ± 8	NS
Apo AI (mg/dL)	191 ± 34	179 ± 32	198 ± 37	184 ± 19	0.016
ApoB (mg/dL)	102 ± 27	99 ± 23	103 ± 29	105 ± 27	NS
HL (nmol FFA/mL/h)	1496 ± 966	1404 ± 838	1549 ± 1022	1461 ± 972	NS
LPL (nmol FFA/mL/h)	2758 ± 1669	2835 ± 1774	2663 ± 1489	2964 ± 2090	NS
CETP (%)	10 ± 7	13 ± 9	24 ± 10	10 ± 7	NS
PLTP (%)	18 ± 11	23 ± 11	17 ± 10	15 ± 11	NS

Group Parameters	CTL				p-Values
	Total (118-138)	II (42-55)	IV (45-52)	VV (20-22)	p1
Age (year)	42 ± 16	41 ± 16	44 ± 15	32 ± 12	NS
Gender F/M	83/55	34/21	35/17	11/11	<0.001
BMI (Kg/m ²)	25 ± 5	24 ± 5 ^a	25 ± 5	24 ± 4	NS
WHR (cm)	79 ± 10	79 ± 11 ^b	81 ± 11	76 ± 8	NS
Systolic BP(mmHg)	122 ± 14	120 ± 12 ^c	122 ± 13 ^a	119 ± 10	NS
Diastolic BP (mmHg)	79 ± 10	79 ± 9 ^d	79 ± 9	79 ± 7	NS
C (mg/dL)	186 ± 48 ^a	193 ± 43 ^e	191 ± 56 ^b	173 ± 36	NS
TG (mg/dL)	93 ± 46	102 ± 50	94 ± 48	83 ± 33 ^a	NS
PL (mg/dL)	201 ± 55 ^b	208 ± 60	199 ± 55	193 ± 50	NS
HDL-C (mg/dL)	53 ± 10	53 ± 11	55 ± 10	51 ± 9	NS
HDL ₂ -C (mg/dL)	12 ± 6 ^c	12 ± 4 ^f	13 ± 9 ^c	13 ± 4 ^b	NS
HDL ₂ -TG (mg/dL)	8 ± 5	9 ± 6	8 ± 6	6 ± 3	NS
HDL ₃ -C (mg/dL)	38 ± 10 ^d	39 ± 12 ^g	39 ± 9 ^d	36 ± 8 ^c	NS
HDL ₃ -TG(mg/dL)	19 ± 10 ^e	22 ± 12	20 ± 10	17 ± 8	NS
LDL-C(mg/dL)	115 ± 40	121 ± 34	118 ± 49	107 ± 28	NS
LDL (LDL/ApoB)	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.4	NS
VLDL-C (mg/dL)	19 ± 9	21 ± 10	19 ± 10	17 ± 7 ^d	NS
Apo AI (mg/dL)	145 ± 30 ^f	148 ± 29 ⁱ	148 ± 32 ^e	134 ± 31 ^e	NS
ApoB (mg/dL)	93 ± 32	96 ± 27	99 ± 40	85 ± 22	NS
HL (nmol FFA/mL/h)	2481 ± 1474 ^g	2411 ± 1365 ^j	2204 ± 1289	2878 ± 1450	NS
LPL (nmol FFA/mL/h)	2345 ± 1196 ^h	2234 ± 1266	2206 ± 1239 ^f	2996 ± 1356	NS
CETP (%)	14 ± 8	13 ± 7	20 ± 10	14 ± 6	NS
PLTP (%)	15 ± 10	12 ± 8	14 ± 9	9 ± 4	0.004

p-values adjusted for age and gender

Polymorphism I405V

II CTL versus II Hyper-A a=0.014, b=0.040, c=0.025, d=0.048, e=0.024, f=<0.001, g=<0.001, i=0.028,

IV CTL versus IV Hyper-A a=0.035, b=<0.001, c=<0.001, d=<0.001, e=0.021, f=<0.001,

VV CTL versus VV Hyper-A a=0.021, b=0.002, c=<0.001, d=0.018, e=<0.001.

No association between HL-514C/T and CETP I405V polymorphism, p=0.175 by Chi-Square test.

Discussion

Controversy exists on whether HL and CETP activity acts in pro-atherogenic or anti-atherogenic (21, 22, 23). The HL-514C/T and CETP polymorphism are associated with lower activity of enzymes HL and CETP respectively (24, 25).

Likewise, the association of the -514C/T polymorphism with lipids and lipoproteins is controversial, some groups found that this polymorphism -514C/T modulates HDL-C concentration (26, 27) while others (28, 29) related that this polymorphism is not association with HDL-C concentration. Thus, there is a controversy in the literature.

Hyper-A is usually considered an anti-atherogenic factor, but it can be accompanied by a high atherosclerotic risk under certain condition. Guerra et al. (1997) (30) associated the T allele of HL-514C/T polymorphism with Hyper-A. Gherisch S. et al 1999 (31) investigated phenotypes of patients with hypertriglyceridemia combined with Hyper-A. They compared the frequency of mutations of HL Val-73-Met, Ser-267-Phe (Exon 3), Thr -383-Met (Exon 6), Leu-334-Phe (Exon 8) and Glu-343Gln (Exon 7). The frequency was two to three times higher in the hypertriglyceridemia combined Hyper-A subjects. In previous study in our lab, CETP mutations (Intron 14A and exon 15 missense mutation, D442G) were not associated with Hyper-A probably due to a small number of analyzed mutants (32).

Summarizing, (Table 4) in Hyper-A the modulating effects of HL-514C/T and CETP I405V led to increased HDL₂C and HDL₃C.

The HL-514C/T and CETP I405V polymorphisms were very similar with relation to lipids and lipoproteins but different in respect to transfer proteins and enzymes as expected. The mutants were similar in increasing HDL₂C and Apo AI.

Table 4- Summary of the percent changes of hyperalipoproteinemia on lipids and lipoproteins by HL-514C/T and CETP I405V Genotypes

Parameters	HL-514C/T			CETP I405V		
	CC	TC	TT	II	IV	VV
HDL₂C	↑33	↑35	↑ 33	↑ 33	↑ 32	↑ 31
HDL₂TG	↑11	-	-	-	-	-
HDL₃C	↑61	↑33	↑ 18	↑ 32	↑ 37	↑ 39
HDL₃TG	↑17	↑17	↑ 25	-	-	-
Apo AI	↑23	↑25	↑ 25	↑ 17	↑ 36	↑ 27
LDL/ Apo AI	↑ 8	-	-	-	-	-
HL	↓37	↓45	↓ 25	↓ 42	-	-
LPL	↑21	-	-	-	↑ 17	-
CETP	↓26	↓36	-	-	-	-
C	↑23	↑17	↑ 14	↑12	↑ 17	-
TG	-	-	-	-	-	↑ 6
PL	↑10	↑12	-	-	-	-
LDL-C	↑17	-	-	-	-	-

Overall we can state from these data that both polymorphisms can lead to a anti-atherogenic lipid profile in Hyper-A.

Aknowledgements

We thank Maria Laura Y. Cruz for excellent technical work, and Dra. 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 a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- 1- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1):8-15.
- 2- Assman G, Gotto Jr AM. HDL cholesterol and protective factor in atherosclerosis. *Cir* 2004; (suppIII): III8-III14.
- 3- Isaacs A, Sayed-Tabatabaei FA, Hoffman A, Oostra BA, Klungel OH, et al. The cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with increased high-density lipoprotein levels and decreased risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007; 14(3):419-21.
- 4- Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Research* 1995; 36: 211-28.
- 5- Jansen H, Verhoeven AJM, Sijbrands EJG. Hepatic lipase: a pro or anti-atherogenic protein? *J Lipid Res* 2002; 43: 1352-1362.
- 6- Ramsamy TA, Boucher J, Brown RJ, Yao Z, Sparks DL. HDL regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans and hydrolysis of VLDL triacylglycerol. *J Lipi Res* 2003; 44:733-41.
- 7- Zambon A, Deeb S.S, Hokanson B, Brown G, Brunzel JD. Common variants in the promoter of hepatic lipase gene are associated with lower levels of hepatic lipase activity, buoyant LDL, and higher HDL₂ cholesterol. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 1998; 18:1723-1729.
- 8- Fang DZ; Liu BW. Polymorphism of HL+1075C, but not -480T, is associated with plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein AI in men of a Chinese population. *Atherosclerosis* 2002; 161: 417-424.

- 9- Shohet RV, Vega GL, Anwar A, Cigarroa JE, Grundy SM, et al. Hepatic lipase (LIPC) promoter polymorphism in men with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1975-1978.
- 10- Miltiadows G, Hatzivassiliou M, Liberopoulos E, Bairaktari E, Tselepis A, et al. Gene polymorphisms affecting HDL-cholesterol levels in the normolipidemic population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005; 15(3): 219-24.
- 11- Padmaja N, Ravindra Kumar M, Soya SS, Adithan C. Common variants of Cholesteryl ester transfer protein gene and their association with lipid parameters in healthy volunteers of Tamilian population. *Clin Chim Acta*. 2007; 375(1-2):140-6.
- 12- Sy RG, Cutiongco EM, Punzalan FE, Santos RS, Geronimo FR, et al. Human cholesteryl ester transfer protein (TaqIB) polymorphism among Filipinos with cardiovascular risk factors. *J Atheroscler Thromb* 2007; 14(3): 116-21.
- 13- Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990; 323(18): 1234
- 14- Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki 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(11): 1849-56.
- 15- Friedwald WF, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of LDL-cholesterol concentration without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
- 16- Eyre JA, Hammett F, Miller NE. A micro-method for the rapid ultracentrifugal separation of human plasma high density lipoprotein subfractions, HDL₂ and HDL₃. *Clin Chim Acta* 1981; 114 (2-3): 225-231
- 17- Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1998; 129:716-38.
- 18- Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* 1998; 110: 231-41.

- 19- Guerra R, Wang J, Grundy SM, Cohen JC. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94(9): 4532-7.
- 20- Gudnason V, Kakko S, Nicaud V, Savolainen MJ, Kesaniemi YA, 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(2):116-28.
- 21- Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(10): 1750-4.
- 22- Salerno AG, Silva TR, Amaral ME, Alberici LC, Bonfleur ML, et al., Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. *Int J Obes (Lond)*. 2007 article in press
- 23- Okamoto H, Miyai A, Sasase T, Furukawa N, Matsushita M, et al., .Cholesteryl ester transfer protein promotes the formation of cholesterol-rich remnant like lipoprotein particles in human plasma *Clin Chim Acta*. 2007;375(1-2):92-8.
- 24- Isaacs A, Sayed-Tabatabael AF, Njajou OT, Witteman JCM, Duijn, CM. The -514C/T hepatic lipase promoter region polymorphism, and plasma lipids: a meta-analysis *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(8): 3858-63.
- 25- Okumura K, Matsui H, Kamiya H, Saburi Y, Hayashi K et al., Differential effect of two polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene on low-density lipoprotein particle size. *Atherosclerosis* 2002; 161: 425-431.
- 26- Fan YM, Lehtimäki T, Rontu R, Ilveskoski E, Goebeler S, Kajander O, et al. Age-dependent association between hepatic lipase gene -480C/T polymorphism and the risk of pre-hospital sudden cardiac death: The Helsinki Sudden death study. *Atherosclerosis* 2007; 192 (2): 421-427.
- 27- Nettleton JA, Steffen LM, Ballantyne CM, Boerwinkle E, Folsom AR. Associations between HDL-cholesterol and polymorphisms in hepatic lipase genes are modified by

dietary fat intake in African American and White adults. *Atherosclerosis* 2007; *in press*.

- 28- Boekholdt SM, Souverein OW, Tanck MWT, Hovingh GK, Kuivenhoven JA, Peters RJG, et al. Common variants of multiple genes that control reverse cholesterol transport together explain only a minor part of variation of HDL cholesterol levels. *Clin Genet* 2006; 69:263-270.
- 29- Zambon A, Puato M, Faggin E et al. Common hepatic lipase gene promoter variant predicts the degree of neointima formation after carotid endarterectomy: impact of plaque composition and lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis* 2006; 185 (1): 121-126.
- 30- Okumura K, Matsui H, Kamiya H, Saburi Y, Hayashi K, et al. Differential effect of two common polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene on low-density lipoprotein particle size. *Atherosclerosis* 2002; 161(2):425-31.
- 31- Gehrisch S, Kostka H, Tiebel M, Patzak A, Paetzold A. Mutations of the human hepatic lipase gene in patients with combined hypertriglyceridemia/hyperalphalipoproteinemia and in patients with familial combined hyperlipidemia. *J Mol Med* 1999; 77(10): 728-34.
- 32- Kaplan DB, Schreiber R, Oliveira HC, Harada LM, Nakamura RT, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene mutations in Brazilian hyperalphalipoproteinemia. *Clin Genet* 2006; 69(5): 455-7

5- DISCUSSÃO GERAL

Definiu-se neste estudo hiperalfalipoproteinemia como indivíduos com HDL-C igual ou maior que 68mg/dL conforme o valor de percentil 90, obtido para uma população local de 1700 indivíduos de um estudo anterior no Laboratório de Lípides/NMCE (de Faria, comunicação pessoal). Os sujeitos de estudo foram n= 291, a maioria do sexo feminino (n=212, 73%), com média de idade de 47 anos atendidos no Ambulatório de Dislipidemias do Hospital das Clínicas-UNICAMP.

Este é o primeiro estudo brasileiro que avalia o polimorfismo -514C/T da lipase hepática em portadores de hiperalfalipoproteinemia. Também é o primeiro trabalho na literatura sobre os efeitos deste polimorfismo na espessura da camada íntima-média de carótidas (EIM) na hiperalfalipoproteinemia. No modelo experimental, o fenótipo de hiperalfalipoproteinemia foi caracterizado por aumento de 35% na concentração de HDL-C e redução da atividade da LH em 43% e este resultado estão de acordo com os relatos da literatura (Inazu et al., 1990; Yamashita et al., 1991; Hirano et al., 1995; Alarcon et al., 2004).

Em estudos prévios realizados no Laboratório de Lípides (Alarcon et al., 2004) foram investigadas modulações de hiperalfalipoproteinemia na população brasileira, Observou-se deficiência de CETP e LH, vários fatores regulatórios sobre a HDL e foi sugerido que polimorfismos genéticos destas proteínas modulariam a condição de hiperalfalipoproteinemia. Em outro estudo posterior Kaplan et al., (2006) descreveram duas mutações no gene da CETP (D442G e Int14A) bem como dois polimorfismos que frequentemente estão descritos na literatura (TaqIB e I405V) na hiperalfalipoproteinemia.

No presente trabalho, avaliou-se a espessura da camada íntima-média de carótidas na hiperalfalipoproteinemia. A espessura da camada íntima-média de carótidas se correlacionou somente com a idade na hiperalfalipoproteinemia, entretanto, em controles (HDL-colesterol entre 32 e 68 mg/dL) idade, sexo masculino, pressão arterial e surpreendentemente HDL-colesterol apresentou correlação positiva com este parâmetro, contrariando relatos da literatura (Miller et al., 2007).

Foi avaliada também, utilizando o mesmo modelo experimental a espessura da camada íntima-média de carótidas sobre os efeitos do polimorfismo LH-514C/T.

Na presença do raro alelo T houve redução da atividade da LH tanto em hiperalfalipoproteinemia como em controles. Houve tendência a maior espessura da íntima-média de carótidas no genótipo CC em indivíduos com hiperalfalipoproteinemia quando comparados com controles. Rundek et al., (2002) relatou que a presença do genótipo CC está associado com aumento da EIM de carótidas sugerindo que o polimorfismo -514C/T desenvolva um papel atero-protetor.

Estudos clínicos relatam a associação inversa entre as concentrações de HDL-C e atividade da LH e CETP (Hirano et al., 1995; Isaacs et al., 2004) e o papel destas proteínas no desenvolvimento de aterosclerose não está claramente definido (Santamaria-Fojo et al., 2004; Hasham e Pillarisetti 2006; Salerno et al., 2007; Okamoto et al., 2007). Foram relatados que a presença dos polimorfismos o LH-514C/T e CETP I405V estão associados com redução da atividade das lipoproteínas (Kakko et al., 2000; Boekholdt e Thompson 2003; Nettleton et al., 2007).

Foram avaliados os efeitos da hiperalfalipoproteinemia sobre dois polimorfismos que frequentemente são descritos na literatura o LH-514C/T e CETP I405V e suas modulações em lípides, lipoproteínas e proteínas reguladoras. Em nossa população, ambos polimorfismos foram de alta frequência como relatado na literatura (Okumura et al., 2002; Nettleton et al., 2007; Padmaja et al., 2007)

O polimorfismo LH-514C/T foi associado com a redução da atividade enzimática da LH (Lahoz et al., 2005; Fan et al., 2006), mas, o polimorfismo CETP I405V não reduziu a atividade da CETP, e estes resultados não estão de acordo com a literatura (Kakko et al., 2000; Boekholdt e Thompson 2003)

Na hiperalfalipoproteinemia o polimorfismo LH-514C/T (TT vs CC) foi associado à redução da circunferência da cintura em 7%, menores de concentrações colesterol plasmático em 10%, redução das concentrações plasmáticas de fosfolípidos em 10%, redução de 14% das concentrações plasmáticas de LDL-C, o tamanho estimado da LDL por LDL-C/ApoB foi menor em 7%. As concentrações plasmáticas de HDL-C não se modificaram no alelo T (polimorfismo LH -514C/T).

As modulações destes polimorfismos sobre as concentrações de HDL-C na literatura são controversas. Há vários trabalhos que relatam que os polimorfismos estão associados com concentrações plasmáticas de HDL-C (Lahoz et al., 2005, Fan et al., 2006), mas estes dados não foram consistentes, pois outros pesquisadores não encontraram a mesma associação (Boekholdt et al 2006; Zambon et al 2006).

O genótipo TT diferiu entre os 2 grupos: na hiperalfalipoproteinemia com relação aos CTL houve redução da atividade da LH em 25% e maiores concentrações plasmáticas de HDL₂C em 33%, HDL₃TG em 25%, ApoAI em 25% e C em 14%. Um único estudo na literatura onde se avaliaram os efeitos do polimorfismo LH -514C/T em indivíduos com hiperalfalipoproteinemia somente as concentrações de HDL-C foram associadas com o genótipo (Guerra et al., 1997).

O polimorfismo CETP I405V na hiperalfalipoproteinemia os VV vs II apresentaram aumento de alta em 6% pressão arteriais sanguínea e menores concentrações de HDL₂TG em 30% e HDL₃TG em 12%. O genótipo IV teve maiores concentrações de ApoAI em 10% e pressão arterial diastólica em 8% quando comparado com o genótipo II. Não houve variações da atividade da CETP e das concentrações de HDL-C.

Em hiperalfalipoproteinemia o genótipo VV apresentou maiores concentrações plasmáticas de HDL₂C em 31% HDL₃C em 39%, ApoAI em 27% e TG em 6% e menores concentrações plasmáticas de VLDL-C, quando comparados ao genótipo VV dos controles.

A redução das concentrações da LDL-C e redução da estimativa do seu tamanho calculado por LDL-C/ApoB, foi associada com a presença do alelo menos comum do polimorfismo LH-514C/T, quando comparados com o genótipo CC em hiperalfalipoproteinemia, entretanto os dados na presença do polimorfismo CETP I405V foram consistentes com Carr et al., (2002) que relatou que o polimorfismo da CETP não é determinante no tamanho da LDL.

Na hiperalfalipoproteinemia todos os genótipos dos dois polimorfismos foram associados com altas concentrações de HDL₂C, HDL₃C, ApoAI, sugerindo ateroproteção em hiperalfalipoproteinemia. A redução do tamanho da LDL nestes polimorfismos foi observada por Miljkovic-Gacic et al., (2006) e Okumura et al., (2002).

Quando avaliada a semelhança dos dois polimorfismos LH -514C/T (a presença do alelo T) e CETP I405V (presença do alelo V) maiores concentrações de colesterol das subfrações 2 e 3 da HDL em indivíduos com hiperalfalipoproteinemia foram observados.

Esta dissertação aponta para a hiperalfalipoproteinemia como ateroprotetora ou de efeitos neutros sobre a aterosclerose carotídea, pois o polimorfismo LH -514C/T não modifica a espessura da camada íntima média de carótidas. E houve entre os polimorfismos LH -514C/T e CETP I405V modulação para um perfil plasmático ateroprotetor.

Estudos sobre a funcionalidade da HDL na hiperalfalipoproteinemia serão posteriormente conduzidos no laboratório com o objetivo de explicar os possíveis mecanismos na modulação desta condição.

6- CONCLUSÃO GERAL

Este estudo mostra que a hiperalfalipoproteinemia moderada é modulada por vários parâmetros antropométricos, bioquímicos e genéticos na aterosclerose carotídea. Estes efeitos têm caráter predominantemente anti-aterogênico ou são neutros.

Os polimorfismos -514C/T do gene da lipase hepática e o I405V do gene da proteína de transferência de ésteres de colesterol ocorreram em altas frequências na amostra populacional estudada, similares às de outros estudos na literatura.

Este é o primeiro estudo brasileiro que avalia o polimorfismo -514C/T do gene da lipase hepática em portadores de hiperalfalipoproteinemia. Estudos da funcionalidade da lipoproteína de alta densidade na hiperalfalipoproteinemia deverão dar continuidade a este para uma exploração mais ampla dos aspectos mecanísticos desta modulação.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agellon LB, Quinet EM, Gillete TG, Drayna DT, Brown ML et al. Organization of cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry* 1990; 29: 1372-1376.

Alarcon BK, Oliveira HCF, Harada LM, Nunes VS, Nunes D, Kaplan D, et al. Moderate hyperalphalipoproteinemia in a Brazilian population is related to lipoprotein lipase activity, apolipoprotein A-I concentration, age and body mass index. *Clin Sci* 2004; 106: 11-17.

Almeida CA, Teixeira PFS, Soares DV, Cabral MD, Costa SM et al. Espessura-íntima média carotídea como marcador de risco cardiovascular em pacientes com hipotireoidismo subclínico. *Arq Brás Endocrinol Metabol* 2007; 51/3: 472-477.

Andersen RV, Wittrup HH, Tybjærg-Hansen A, Steffensen R, Schnohr P et al. Hepatic lipase mutations, elevated high-density lipoprotein cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(11):1972-82.

Andrade FM, Silveira FR, Arsand M, Antunes ALS, Torres MR, Zago AJ, Callegari-Jaques SM, Hutz MH. Association between -250G/A polymorphism of the hepatic lipase gene promoter and coronary artery disease and HDL-C levels in a Southern Brazilian population. *Clin Gen* 2004; 65: 390-395.

Assman G, Gotto Jr AM. HDL cholesterol and protective factor in atherosclerosis. *Cir* 2004; (suppIII): III8-III14.

Bachorik PS, Denke MA, Stein EA, Rifking BM. Lipids and dyslipoproteinemia. In: Henry JB. *Clinical Diagnosis and management by laboratory methods*, 20 ed, USA, W.B. Saunders Company, 2001. p. 224-248.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004; 95(8):764-72. Review

Bernard N, Girouard J, Forest JC, Guguère Y. The combination of ApoCIII, hepatic lipase and hormone sensitive lipase gene polymorphism suggests an association with susceptibility to gestational hypertension. *J Hum Genet* 2007; 52: 244-254.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Jiang XC, Poirier O, et al. Common genetic variation of the cholesteryl ester transfer protein gene strongly predicts future cardiovascular death in patients with coronary artery disease J Am Coll Cardiol 2003; 41(11):1983-9.

Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Schlitt A, Jungmair W, et al. Genetic variation of the cholesterol ester transfer protein gene and the prevalence of coronary artery disease. The AtheroGene case control study Z Kardiol. 2004; 93 Suppl 4:IV16-23.

Boekholdt FM e Thompson JF. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. J Lipid Res 2003 44(6):1080-93.

Boekholdt SM, Souverein OW, Tanck MWT, Hovingh GK, Kuivenhoven JA, Peters RJG, et al. Common variants of multiple genes that control reverse cholesterol transport together explain only a minor part of variation of HDL cholesterol levels. Clin Genet 2006; 69:263-270.

Bos G, Dekker JM, Feskens EJM, Ocke MC, Nijpels G, Stehouwer CDA, et al. Interactions of dietary fat intake and hepatic lipase -480C/T polymorphism in determining hepatic lipase activity: the Hoorn Study. Am J Clin Nutr 2005; 81: 911-915.

Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid-intima media thickness and risk of stroke and myocardial infarction. The Rotterdam Study. Circulation 1997;96: 1432-7.

Brand K, Dugi KA, Brunzell JD, Nevin DN and Santamarina-Fojo S. A novel A→G mutation in intron I of the hepatic lipase gene leads to alternative splicing resulting in enzyme deficiency. J Lipid Res 1996; 37: 1213–1223.

Bruce C, Beamer LJ, Tall AR. The implications of the structure of the bactericidal/permeability-increasing protein on the lipid-transfer on the lipid-transfer function of the cholesteryl ester transfer protein. Curr Opin Struct Biol 1998; 8: 426-51.

Carr MC, Ayyobi AF, Murdoch SJ, Deeb SS, Brunzell JD. Contribution of hepatic lipase, lipoprotein lipase, and cholesteryl ester transfer protein to LDL and HDL heterogeneity in healthy women. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22(4):667-73

Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis*. 1996; 124 Suppl: S1-9.

Cellini E, Nacmias B, Olivieri F, Ortenzi L, Tedde A, et al. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) I405V polymorphism and longevity in Italian centenarians. *Mech Ageing Dev* 2005; 126(6-7):826-8. 2005

Cenarro A, Artieda M, Gonzalvo C, Meriño-Ibarra E, Arístegui R et al. Genetic variation in the hepatic lipase gene is associated with combined hyperlipidemia, plasma lipid concentrations, and lipid-lowering drug response.

Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, Clegg LX. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 1997; 146 (6): 483-494.

Choi BG, Vilahur G, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ. The role of high-density lipoprotein cholesterol in atherothrombosis. *Mt Sinai J Med*. 2006; 73(4):690-701.

Curtiss LK, Valenta DT, Hime NJ, Rye KA. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(1):12-9 Review.

Damen J, Regts J, Scherphop G. transfer of [¹⁴C] phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta* 1982; 712: 444-452.

Deeb e Peng. The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity. *J Lip Res* 2000; 41(1):155-8.

Deeb SS, Zambon A, Carr MC, Ayyobi AF and Brunzell JD. Hepatic Lipase and dyslipidemia: interactions among genetic variants, obesity, gender, and diet. *J Lipid Res* 2003; 44:1279-86.

Dugi KA, Amar MJA, Haudenschild CC, Shamburek RD, Bensadoun A, Hoyt JRR F et al. In vivo evidence for both lipolytic and nonlytic function of hepatic lipase in metabolism of HDL. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2000; 20:793-811.

Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1998; 129:716-38.

Eller P, Schgoer W, Mueller T, Tancevski I, Wehinger A, Ulmer H, et al. Hepatic Lipase polymorphism and increase risk of peripheral arterial disease. *J of Inter Med* 2005; 258: 344-348.

Fan YM, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Laine H, Raitakari OT. The influence of hepatic lipase -480C/T polymorphism on coronary flow reserve in young men is independent of the plasma cholesterol level. *Atherosclerosis* 2006; 188 (2): 391-397.

Fan YM, Dastidar P, Jokela H, Punnonen R, Lehtimäki T. Review: Hepatic lipase C-480T genotype-dependent benefit from long-term hormones replacement therapy for atherosclerosis progression in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90 (6): 3786-92.

Fan YM, Lehtimäki T, Rontu R, Ilveskoski E, Goebeler S, Kajander O, et al. Age-dependent association between hepatic lipase gene -480C/T polymorphism and the risk of pré-hospital sudden cardiac death: The Helsinki Sudden death study. *Atherosclerosis* 2007; 192 (2): 421-427.

Fang DZ, Liu BW. Polymorphism of HL+1075C, but not -480T, is associated with plasma high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein AI in men of a Chinese population. *Atherosclerosis* 2002; 161: 417-424.

Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V, McMahon AD, Braund PS, 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(20):1833-42.

Freeman L, Amar MJ, Shamburek R, Paigen B, Brewer HB Jr, et al. Lipolytic and ligand-binding functions of hepatic lipase protect against atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res.* 2007; 48(1): 104-13.

Friedwald WF, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of LDL-cholesterol concentration without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.

Gehrisch S, Kostka H, Tiebel M, Patzak A, Paetzold A Mutations of the human hepatic lipase gene in patients with combined hypertriglyceridemia/hyperalphalipoproteinemia and in patients with familial combined hyperlipidemia. *J Mol Med* 1999; 77(10): 728-34.

Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27 (3): 503-519.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1):8-15.

Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, et al. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: a study based on coronary angiography. *Atherosclerosis* 2001; 159(1):153-63.

Gudnason V, Kakko S, Nicaud V, Savolainen MJ, Kesaniemi YA, 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(2):116-28.

Guerra R, Wang J, Grundy SM, Cohen JC. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94(9): 4532-7.

Hasam SN e Pillarisetti S. Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2006; 372(1-2): 179-83.

Hegele RA, Breckenridge WC, Cox DW, Maguire GF, Little JA, et al. Elevated LDL triglyceride concentrations in subjects heterozygous for the hepatic lipase S267F variant. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(8): 1212-6.

Hirano K, Yamashita S, Sakai N, Hiraoka H, Ueyama Y, et al. Low-density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic heavy alcohol drinkers have reduced affinity for the low-density lipoprotein receptor. *Clin. Biochem* 1992; (25) 357-362.

Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki 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(11): 1849-56

Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 1998; 128: 262-9.

Hong SH, Song J, Kim JQ. Genetic variations of the hepatic lipase gene in Korean patients with coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2000 ; 33(4):291-6.

Hovingh GK, de Groot E, van der Steeg W, Boekholdt SM, Hutten BA, et al. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2005; 16(2):139-45.

Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990; 323(18): 1234-8.

Inazu A, Nishimura Y, Terada Y, Mabuchi H. Effects of hepatic lipase gene promoter nucleotide variations on serum HDL cholesterol concentration in the general Japanese population. *J Hum Genet* 2001; 46: 172-177.

Isaacs A, Sayed-Tabatabael AF, Njajou OT, Witteman JCM, Duijn, CM. The -514C/T hepatic lipase promoter region polymorphism, and plasma lipids: a meta-analysis *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(8): 3858-63.

Isaacs A, Sayed-Tabatabaei FA, Hofman A, Oostra BA, Klungel OH, et al. The cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with increased high-density lipoprotein levels and decreased risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007; 14(3):419-21.

Jansen H, Verhoeven AJM, Sijbrands EJG. Hepatic lipase: a pro or anti-atherogenic protein? *J Lipid Res* 2002; 43: 1352-1362.

Ji J, Herbison CE, Mamotte CDS, Burke V, Taylor R, et al. Hepatic lipase gene -514C/T polymorphism and premature coronary heart disease. *J Cardiol Risk* 2002; 9:105-113.

Kakko S., Tamminen M., Paäivaänsalo M., Kauma H., Rantala A. O., et al. Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms are associated with carotid atherosclerosis in men *European Journal of Clinical Investigation* 2000; 30: 18-25

Kaplan DB, Schreiber R, Oliveira HC, Harada LM, Nakamura RT, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene mutations in Brazilian hyperalphalipoproteinemia. *Clin Genet* 2006; 69(5): 455-7

Kimura H, Miyazaki R, Imura T, Masunaga S, Suzuki S, Gejyo F et al. Hepatic lipase mutation may reduce vascular disease prevalence in hemodialysis patients with high CETP levels. *Kidney International* 2003; 64 1829-1837.

Knudsen P, Antikainen M, Uusi-Oukari M, Ehnholm S, Lahdenpera S, et al. Heterozygous hepatic lipase deficiency, due to two missense mutations R186H and L334F, in the HL gene. *Atherosclerosis*. 1997; 128(2): 165-74.

Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. Antioxidative activity of HDL particle subspecies is impaired in hyperalphalipoproteinemia: relevance of enzymatic and physicochemical properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(3):526-33.

Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterized by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis* 2005; 182 (2):277-85.

Kontush A e Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 2006; 58(3):342-74. Review.

Kuusi, T., P. Saarinen, e E. A. Nikkila.. Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein² in man. *Atherosclerosis* 1980. 36: 589-593

Kuusi T, Ehnholm C, Viikari J, Harkonen R, Vartiainen E. Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipase are determinants of hypo- and hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1989; 30(8): 1117-26.

Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* 1998; 110: 231-41.

Lahoz C, Peña R, Mostaza JM, Laguna F, García-Iglesias M.F, et al. The -514C/T polymorphism of the hepatic lipase gene significantly modulates the HDL-cholesterol response to statin treatment. *Atherosclerosis* 2005; 182: 129-34.

Lewis GF e Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96(12):1221-32. Review

Lima ES e Couto RD. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42 (3): 169-178.

Lindi V, Schwab U, Louheranta A, Vessby B, Hermansen K, et al. The G-250A polymorphism in the hepatic lipase gene promoter is associated with changes in hepatic lipase activity and LDL cholesterol: The KANWU Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007 *Article in press*

Lottenberg AM, Nunes VS, Nakandakare ER, Neves M, Bernik M, et al. The human cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with plasma cholesterol concentration and its reduction by dietary phytosterol esters. *J Nutr* 2003; 133(6):1800-5.

Lupatelli G, Marchesi S, Lombardini R, Siepi D, Bagaglia F, Pirro M, et al. Mechanisms of high-density lipoprotein cholesterol effects on endothelial function in hyperlipidemia. *Metabolism* 2003; 52 (9): 1191-5.

Mahley RW, Weisgraber KH, Farese Jr RV. Disorders of Lipid Metabolism. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. *Williams Textbook of Endocrinology.* 10th ed. New York: Saunders, 2002 1642-1705.

Mahley RW, Weisgraber KH and Faren Jr RV. Disorders of Lipid Metabolism. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM and Larsen PR. Williams Textbook Endocrinology. 11th ed. New York: Saunders, 2006 1642-1705.

Matsuzawa Y, Yamashita S, Kameda K, Kubo M, Tarui S, Hara I. Marked hyper-HDL2-cholesterolemia associated with premature corneal opacity. A case report 1986 *Atherosclerosis*. 1984; 53(2): 207-12.

McCaskie PA, Cadby G, Hung J, McQuillan BM, Chapman CML, Carter KW, Thompson PL, Palmer LJ, Beilby JT. The C-480T hepatic lipase polymorphism is associated with HDL-C but not with risk of coronary heart disease. *Clinical Genetics*: 114- 121, 2006.

Miljkovic-Gacic I, Bunker CH, Ferrell RE, Kammerer CM, Evans RE, Patrick AL, et al. Lipoprotein subclass and particle size differences in Afro-Caribbeans, African Americans, and white Americans: associations with hepatic lipase gene variation. *Metab Clin Experim* 2006; 55: 96-102.

Miller M, Rhyne J, Hong SH, Friel G, Dolinar C, Riley W. Do mutations causing low HDL-C promote increased carotid intima-media thickness? *Clin Chim Acta*. 2007; 377(1-2):273-5.

Mori A, Takagi A, Ikeda Y, Ashida Y, Yamamoto A. An AvaII polymorphism in exon 5 of the human hepatic triglyceride lipase gene. *Mol Cell Probes*. 1996; 10(4): 309-11.

Nettleton JA, Steffen LM, Ballantyne CM, Boerwinkle E, Folsom AR. Associations between HDL-cholesterol and polymorphisms in hepatic lipase genes are modified by dietary fat intake in African American and White adults. *Atherosclerosis* 2007; *in press*.

Nong Z, Gonzalez-Navarro H, Amar M, Freeman L, Knapper C, et al. Hepatic lipase expression in macrophages contributes to atherosclerosis in apoE-deficient and LCAT-transgenic mice. *J Clin Invest* 2003; 112(3): 367-78.

Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005; 98(12):845-56.

Okamoto H, Miyai A, Sasase T, Furukawa N, Matsushita M, Nakano T, Nakajima K. Cholesteryl ester transfer protein promotes the formation of cholesterol-rich remnant like lipoprotein particles in human plasma. Clin Chim Acta. 2007; 375(1-2):92-8.

Okumura K, Matsui H, Kamiya H, Saburi Y, Hayashi K, et al. Differential effect of two common polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene on low-density lipoprotein particle size. Atherosclerosis 2002; 161(2):425-31.

Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase. Curr Opin Lipidol 1993; 4: 187-96.

Ordovas JM, Corella D, Demissie S, Cupples A, Couture P, Coltell O, et al. Dietary fat intake determines the effects of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on high-density lipoprotein metabolism. Circulation 2002; 106: 2315-2321.

Padmaja N, Ravindra Kumar M, Soya SS, Adithan C. Common variants of Cholesteryl ester transfer protein gene and their association with lipid parameters in healthy volunteers of Tamilian population. Clin Chim Acta. 2007; 375(1-2):140-6.

Pedro, Adriana Orcesi; Pinto Neto, Aarão Mendes; Paiva, Lucia Helena Simões da Costa; Osis Maria José; Hardy Ellen. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. Cad. Saúde Pública, vol.19, nº.1 2003, Rio de Janeiro Jan./Feb.

Perret B, Mabile L, Martinez L, Tercé F, Barbaras R, Collet X. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation J Lipid Res 2002; 43:1163-69.

Ramsamy TA, Boucher J, Brown RJ, Yao Z, Sparks DL. HDL regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans and hydrolysis of VLDL triacylglycerol. J Lipid Res 2003; 44:733-41.

Rufibach LE, Duncan SA, Battle M, Deeb SS. Transcriptional regulation of the human hepatic lipase (LIPC) gene promoter. J Lipid Res 2006; 47(7):1463-77.

Rundek T, Elkind MS, Pittman J, Boden-Albala B, Martin S, Humphries SE, Juo SH, Sacco RL. Carotid intima-media thickness is associated with allelic variants of stromelysin-1, interleukin-6, and hepatic lipase genes: the Northern Manhattan Prospective Cohort Study. *Stroke* 2002; 33 (5): 1420-1423.

Salazar LA, Melo CE, Cavalli AS, Hinuy HM, Hirata MH, Hirata RDC. Micrométodo para extração de DNA genômico útil no diagnóstico molecular da hipercolesterolemia familiar. *RBAC* 2001; 33: 111-116.

Salerno AG, Silva TR, Amaral ME, Alberici LC, Bonfleur ML, et al., Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. *Int J Obes (Lond)*. 2007 article in press

Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(10): 1750-4.

Shohet RV, Vega GL, Anwar A, Cigarroa JE, Grundy SM, Cohen JC. Hepatic lipase (LIPC) promoter polymorphism in men with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1975-1978.

Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Egloff M, Auer C, Gautier V, Turpin G, Beucler I. Hyperalphalipoproteinemia: Characterization of a Cardioprotective Profile associating increased High-Density Lipoprotein2 Levels and Decreased Hepatic Lipase Activity. *Metabolism* 1998; 47 (8): 965-973.

Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARTERial disease). *Circulation*. 1999; 100(9): 951-7.

Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E, Fisher RM, Olivecrona G, Hamsten A, Karpe F. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and Apo E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. *Atherosclerosis* 2003; 167: 311-317.

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 2007; 88 (1): 2-19.

Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willet WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apoproteins and risk of myocardial infarction. N Engl Med 1991, 325: 373-81.

Sterfan N, Schäfer S, Machicao F, Machan J, Schick F, Claussen CD, et al. Liver fat and insulin resistance are independently associated with the -514C/T polymorphism of the hepatic lipase gene. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:4238-4243.

St-Pierre J, Miller-Felix I, Paradis ME, Bergeron J, Lamarche B, et al. Visceral obesity attenuates the effect of the hepatic lipase -514C>T polymorphism on plasma HDL-cholesterol levels in French-Canadian men. Mol Genet Metab 2003; 78(1): 31-6.

Su ZG, Zhang SZ, Zhang L, Tong Y, Xiao CY, et al. A novel polymorphism A (+884) →G in the hepatic lipase gene and its association with coronary artery disease. ACTA Biochimica et Biophysica Sinica. 2003; 35(7): 606-10.

Tahvanainen E, Syväne M, Frick MH, Murtomäki-Repo S, Antikainen M, Kesäniemi A, et al. Association of variation in hepatic lipase activity with promoter variation in the hepatic lipase gene. J Clin Invest 1998; 101:956-960.

Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. J Lipid Res 1993; 34: 1255-74.

Van't Hooft FM, Lundahl B, Ragnotta F, Karpe F, Olivecrona G, Hamsten A. Functional characterization of 4 polymorphism in promoter region of hepatic lipase gene, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000 20 (5): 1335-9.

Vergani C, Lucchi T, Caloni M, Ceconi I, Calabresi C, et al. I405V polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in young and very old people. Archives of Gerontology and Geriatrics 2006; 43: 213–221

Yamashita S, Hui DY, Wetterau JR, Sprecher DL, Harmony JA, et al. Characterization of plasma lipoproteins in patients heterozygous for human plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency: plasma CETP regulates high-density lipoprotein concentration and composition. Metabolism. 1991; 40(7):756-63.

Yamashita S, Maruyama T, Hirano K, Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms, lipoproteins abnormalities and atherogenicity of hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2000; 152: 271-85.

Zambon A, Bertocco S, Vitturi N, Polentarutti V, Vianello D, et al. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(5):1070-4. Review

Zambon A, Puato M, Faggin E et al. Common hepatic lipase gene promoter variant predicts the degree of neointima formation after carotid endarterectomy: impact of plaque composition and lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis* 2006; 185 (1): 121-126.

Zhang C, Lopez-Ridaura R, Rimm EB, Rifai N, Hunter DJ, Hu FB. Interactions between the -514C/T polymorphism of the hepatic lipase gene and lifestyle factors in relation to HDL concentrations among US diabetic men. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1429-1435.

Zhang C, Lopez-Ridaura R, Rimm EB, Li T, Hunter DJ, Hu FB. Genetic variation in the hepatic lipase gene and the risk of coronary heart disease among US diabetic men: potential interaction with obesity. *Diabetologia* 2006; 49: 1552-1559.

Zhao S, Xie X, Nie S. The -250G/A polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter affects blood lipids in Chinese. *Clin Chim Acta* 2006; 365(1-2): 149-52.

Zheng KQ, Zhang SZ, He Y, Zhang L, Zhang KL, et al. Association between cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and variations in lipid levels in patients with coronary heart disease. *Chin Med J (Engl).* 2004; 117(9):1288-92.

8- ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Eu, _____,
fui informado, em detalhes, sobre o estudo “Modulação Funcional e Gênica de Lípidos e Lipoproteínas Plasmáticas e da Aterosclerose Carotídea na Hiperalfalipoproteinemia”.

Eu entendo que minha participação não constitui numa exigência condicional desta Instituição para que eu possa doar sangue, realizar exames laboratoriais, internamentos ou ser acompanhado ambulatorialmente.

O objetivo deste estudo é estabelecer a frequência e de uma mutação genética e de suas conseqüências nas proteínas que modificam os níveis do bom colesterol e de outras gorduras no sangue, e no aparecimento de aterosclerose.

Os resultados de todos os meus exames me serão comunicados por escrito.

Todos os dados pertencentes à minha participação neste estudo serão documentados e mantidos em segredo pelo grupo da pesquisa envolvido e, se os resultados da pesquisa forem publicados, não serei identificado publicamente. Eu estou consciente de que não estou correndo nenhum risco de vida ou prejuízo à minha saúde física ou moral. Entendo também que podem ocorrer efeitos negativos leves devido à punção venosa.

Por ser a minha participação totalmente voluntária, posso desistir do estudo a qualquer momento sem que isto resulte em qualquer penalidade ou perda dos benefícios desta instituição.

Se eu tiver alguma dúvida ou opinião com relação ao estudo, aos meus direitos, à minha participação, ou se quiser relatar um evento adverso ou desconforto, eu devo entrar em contato com a equipe médica do Ambulatório de Dislipidemias do qual sou paciente.

Concordo em cumprir as indicações do grupo que monitoriza e conduz este estudo e estou ciente de que vou obter os benefícios possíveis da atenção médica oferecida pelo mesmo.

Nome do paciente:_____

Assinatura:_____

Data: ____/____/____

Endereço:_____

Telefones:_____

Assinatura do primeiro autor e equipe de médicos e pesquisadores responsáveis pelo projeto:

Fernanda Dutra Santiago:_____

Profa Dra Eliana Cotta de Faria/Departamento de Patologia Clínica/NMCE/Ambulatório,
fone: 3521-7064/17387 - Dra Vera Castanho/Ambulatório de Dislipidemias,
fone: 3521-7231.