

CARLA EVELYN COIMBRA NUÑEZ

G
R. 2211

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas, da aluna Carla Evelyn Coimbra Nuñez, RA: 069336. Campinas, 06 de outubro de 2008.



Prof. Dra. Eliana Cotta de Faria – Orientadora

**BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE OXIDABILIDADE
E INFLAMAÇÃO EM PORTADORES DE
HIPERALFALIPOPROTEINEMIA E SUA RELAÇÃO COM
A ATEROSCLEROSE PRECOCE**

CAMPINAS

Unicamp

2008

CARLA EVELYN COIMBRA NUÑEZ

**BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE OXIDABILIDADE
E INFLAMAÇÃO EM PORTADORES DE
HIPERALFALIPOPROTEINEMIA E SUA RELAÇÃO COM
A ATEROSCLEROSE PRECOCE**

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

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

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

N922b Nuñez, Carla Evelyn Coimbra
 “Biomarcadores plasmáticos de oxidabilidade e inflamação em
portadores de hiperalfalipoproteinemia e sua relação com a
aterosclerose precoce” / Carla Evelyn Coimbra Nuñez. Campinas, SP
: [s.n.], 2008.

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

1. Lipoproteínas HDL. 2. Fator de necrose tumoral alfa . 3.
Artéria carótida. I. Faria, Eliana Cotta de. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : “ Plasma biomarkers of oxidizability and inflammation in
hyperalphalipoproteinemia carriers and their relation with early
atherosclerosis”**

Keywords: • Lipoproteins, HDL
 • Tumor Necrosis Factor-alpha
 • Carotid Arteries

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria
Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho
Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa

Data da defesa: 06 - 10 - 2008

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Carla Evelyn Coimbra Nuñez

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

Membros:

1. Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria -

2. Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa -

3. Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho -

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

Data: 06/10/2008

DEDICATÓRIA

Ao meu amado Bruno, por diversas vezes ter enxugado minhas lágrimas e me feito sorrir, mas acima de tudo por tornar “nosso” o sonho que um dia fora “meu”.

Aos meus pais Yara e Marcos, pelo apoio incondicional e amor, ambos fundamentais para minha formação.

Aos generosos amigos Cris e Vicente;

E ao meu amado avô Gerson (in memorian) que desde cedo me ensinou que o único bem que não pode ser roubado ou perdido é o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à profª Drª Eliana Cotta de Faria por ter me recebido em sua equipe e pelos ótimos resultados de sua orientação;

Às professoras Lúcia Nassi Castilho, por todo apoio, Silvia de Barros Mazon pelas dosagens de “TNF- α ” e Angélica Bicudo Zeferino pela orientação no estágio docente;

Ao Dr. Rui Nakamura, pela realização dos exames de carótidas e por sua disponibilidade para me proporcionar uma visão prática do método;

Ao estatístico Helymar, pelo dedicado apoio técnico;

Aos voluntários e a toda a equipe que trabalhou na seleção, convocação, coleta, enfim, àqueles que foram fundamentais para a realização deste trabalho;

Às colegas Aline, Fernanda e Larissa pela ajuda e pela colaboração em meu amadurecimento;

À Miriam, Aparecida, Mary, Ilda, Ronise e à equipe da Seção de Bioquímica do Hospital de Clínicas – HC/Unicamp pelo empenho em me ensinar as técnicas e por todo apoio;

À Vera Castanho, Harumi, Martha, Bia, Carol e Regina pela amizade e apoio em circunstâncias diversas e à Cidinha por me fazer acreditar em minha capacidade e por me dar forças para persistir em meu sonho;

À Vera pelos momentos felizes e pelo “ombro amigo” e à Syntia por todo apoio;

Aqueles que me ofereceram um lar em Campinas: Cris, Vicente, Felipe e Carol;

À minha amada família, “porto seguro” ao fim de todas as minhas “viagens”: Yara Lúcia, Marcos, Selma, Márcio, Bruno, Yara Helena, Déborah, Brunna e Jhade. Principalmente à minha mãe Yara, não só por entender o motivo de minha ausência, como me apoiar em todas as minhas escolhas;

E a todos que, mesmo não citados, me ajudaram a superar as dificuldades desta caminhada.

*“Foi o caminho, não que eu tracei para mim,
mas que minha caminhada traçou:
Caminhante, não há caminho, o caminho se
faz com o caminhar”.*

Nurimar Maria Falci

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xi</i>
ABSTRACT.....	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1- Aterosclerose: epidemiologia, fatores de risco e fisiopatologia.....	17
1.2 - Proteína C-reativa (PCR), Fator de necrose Tumoral – alfa (TNF- α) e Lipoproteína de baixa densidade oxidada: fatores pró-inflamatórios na progressão da aterosclerose.....	21
1.3- Proteínas de transferência de ésteres de colesterol ou fosfolípides, Lipoproteína Lipase e Lipase Hepática.....	24
1.4- Capacidade antioxidante e antiinflamatória da HDL.....	26
1.5- O modelo de hiperalfalipoproteinemia.....	28
2- OBJETIVOS.....	32
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1- Protocolo experimental.....	35
3.2- Análises bioquímicas gerais.....	38
3.3- Lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas.....	38
3.4- Atividade das proteínas de transferência de ésteres de colesterol ou fosfolípides, (CETP ou PLTP) da lipoproteína lipase (LPL) e da lipase hepática(LH).....	38
3.5- Determinação da concentração da proteína C reativa.....	39
3.6- Determinação da concentração do fator de necrose tumoral alfa.....	39
3.7- Determinação dos anticorpos anti-LDL oxidada.....	39

3.8- Ultra-sonografia <i>doppler</i> de artérias carótidas.....	40
3.9- Análises estatísticas.....	41
4- RESULTADOS.....	42
Trabalho Científico – “C-REACTIVE PROTEIN (hsCRP), TUMOR NECROSIS FACTOR-α (TNF-α) AND AUTOANTIBODIES AGAISNT OXIDIZED LDL DO NOT CHANGE IN SUBJECTS WITH DIFERENT GRADES OF HYPERALPHALIPOPROTEINEMIA”.....	43
5- DISCUSSÃO GERAL.....	65
6- CONCLUSÃO GERAL.....	69
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	“ATP- binding cassette transporter 1”
AcLDL_{ox}	auto-anticorpos anti- LDL oxidada “Autoantibodies to epitopes of oxidized LDL” (Ab- oxLDL)
Apo AI	apolipoproteína AI
Apo B100	apolipoproteína B 100
AVC	Acidente vascular cerebral (“Stroke”)
BMI	Body mass index
BP	Blood pressure
C	colesterol (“cholesterol”)
CETP	“cholesteryl ester transfer protein” (proteína de transferência de éster de colesterol)
CTL	controle (“control”)
DAC	doença arterial coronariana (“coronary arterial disease – CAD”)
EIM	espessamento da íntima média (“intima media thickness - IMT”)
HIPER-A	hiperalfalipoproteinemia/nêmicos (“Hyperalphalipoproteinemia/nemic- HYPER-A”)
HDL	“high density lipoprotein” (lipoproteína de alta densidade)
HDL₂	subfração 2 de lipoproteína de alta densidade
HDL₃	subfração 3 de lipoproteína de alta densidade
usCPR	proteína C-reativa ultra-sensível (High sensitive C- Reactive Protein- hsCRP)
ICAM	“intercellular adhesion molecule-1” (Molécula de adesão intercelular)
LDL	“low-density lipoprotein” (lipoproteína de densidade baixa)
LH	lipase hepática (“hepatic lipase” - HL)

LPL	“lipoprotein lipase” (lipoproteína lipase)
MCP-1	“Monocyte Chemotactic Protein 1” (proteína quimiotática para monócitos-1)
LDLox	lipoproteína de baixa densidade oxidada.
PCR	Proteína C-reativa (“C- reactive protein” - CRP)
PL	Phospholipids (fosfolídeos)
PLTP	“phospholipid transfer protein” (proteína de transferência de fosfolípidos)
p	“probability value”
SR-B1	“scavenger receptor class B1” (receptor de varredura de classe B tipo 1)
TG	“triacylglycerols” (triacilgliceróis)
TRC	Transporte reverso do colesterol
TNF-α	“Tumor Necrosis Factor Alpha” (Fator de Necrose Tumoral alfa)
VLDL	“very-low density lipoprotein” (lipoproteína de densidade muito baixa)
VCAM-1	“vascular cell adhesion molecule-1” (Molécula de adesão de célula vascular -1)

RESUMO

Sabe-se que em determinadas condições, apesar de sua bem estabelecida associação inversa com a doença cardiovascular, a HDL pode tornar-se pró-inflamatória. Achados recentes da literatura a partir de drogas desenvolvidas para elevar o colesterol de HDL reforçaram a preocupação com a funcionalidade da HDL a despeito de sua concentração. Neste sentido, este trabalho propôs-se a verificar na hiperalfalipoproteinemia primária (HIPER-A), descrita por concentrações de HDL-C acima do percentil 90 de uma população (1.700 indivíduos) assintomática local (de Faria, comunicação pessoal-dados não publicados), as concentrações de fatores pró-inflamatórios: proteína c-reativa ultra-sensível (usPCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e títulos de anticorpos anti-LDL oxidada (acLDLox) e sua relação com a aterosclerose carotídea precoce. A partir de 223 adultos atendidos nos Ambulatórios do Hospital de Clínicas/Unicamp, 155 com HDL-C ≥ 68 mg/dL, foram definidos como HIPER-A e 68 como controles (HDL-C entre 40 e 68mg/dL), conforme estudo anterior no Laboratório de Lípidos/NMCE. O grupo HIPER-A foi dividido em três subgrupos conforme as concentrações de HDL-C: moderados (68-80mg/dL), alto (81-90mg/dL) e muito alto (91-211mg/dL). Observou-se, em análise estatística, a formação de um agrupamento exclusivo dos indivíduos HIPER-A (n=75), distribuídos no 3º (0,20-0,44mg/L) e 4º (0,45-3,70mg/L) quartis para PCR e no 3º (0,33-0,45densidade óptica) e no 4º (0,46-0,93DO) quartil para acLDLox, ambos mais elevados e de maior risco aterogênico.

A HIPER-A foi explicada pela reduzida atividade da proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) e da lipase hepática (HL) e pelo aumento da atividade da lipoproteína lipase (LPL), mostrando aumento do colesterol das sub-frações HDL₂ e HDL₃ (grupo e subgrupos) e do triacilglicerol (TG) da sub-fração HDL₃, apenas no grupo total.

As concentrações dos fatores pró-inflamatórios foram similares entre os diversos graus de HIPER-A e controles. Foi observada uma correlação inversa entre o TNF- α e a LPL no subgrupo muito alto. Nenhuma diferença na incidência de manifestações da aterosclerose (DAC e AVC) ou de aterosclerose precoce foi encontrada entre os grupos.

Portanto, diferentes concentrações de HDL-C na HIPER-A não conferem um perfil antiinflamatório. Esse fato foi confirmado pela ausência de diferenças entre as repercussões cardiovasculares e o EIM de carótidas entre HIPER-A (grupos e subgrupos) e o controle. A

correlação inversa entre a LPL e o $\text{TNF-}\alpha$ no subgrupo de elevada atividade de LPL e incluído no grupo de elevado HDL_3 -TG sugere uma função protetora desta lipase. Estudos futuros deverão explorar a funcionalidade da HDL na HIPER-A, contribuindo para o entendimento da complexa relação entre a HDL e a aterosclerose.

ABSTRACT

It is known that HDL becomes proinflammatory under certain conditions, although its inverse association with cardiovascular disease is well recognized. Recent findings in the literature from drugs developed to raise HDL-C reinforced the concern about the HDL functionality in spite of its concentration. Thus, we proposed to verify in primary hyperalphalipoproteinemia (hyper-A), described for HDL-C concentrations above 90th percentile values in an asymptomatic local population – a sample of 1700 individuals (de Faria, personal communication) –, the following concentrations of proinflammatory factors: high-sensitive C-reactive protein (hsCRP), tumor necrosis factor α (TNF- α) and autoantibodies against oxidized LDL (ab-oxLDL), and their relation with early carotid atherosclerosis. Among the two hundred and twenty-three outpatients at the Unicamp Teaching Hospital, 155 with HDL-C $\geq$ 68mg/dL were defined as hyper-A and 68 individuals as controls (HDL-C between 40 and 68mg/dL), according to previous study at the Lipid Laboratory – NMCE. The hyper-A group was divided into three other subgroups: moderate (68-80mg/dL), high (81-90mg/dL) and very-high (91-211mg/dL), from HDL concentrations. Statistical analyses defined the hyper-A group as an exclusive cluster (n=75) that had been distributed in the 3rd (0.20-0.44mg/L) and 4th (0.45-3.70mg/L) CRP quartiles and in the 3rd (0.33-0.45 optical density) and 4th (0.46-0.93OD) ab-oxLDL quartiles, both showing high atherogenic risks.

In our sample, hyper-A showed reduced CETP and HL activities and increased LPL activity. The hyper-A subjects showed HDL₂ and HDL₃ subfractions enriched with cholesterol, and TG- enriched HDL₃ subfraction was found only in the hyper-A group.

Concentrations of proinflammatory factors were similar in all grades of hyper-A. A negative and strong correlation between TNF- α and LPL was seen in the very-high group. No differences in atherosclerosis manifestations (stroke and CAD), as well as in early atherosclerosis (IMT), were found among the groups.

Thus, different grades of hyper-A did not confer an antiinflammatory profile to hyper-A individuals. This fact is confirmed by the absence of differences in cardiovascular repercussions. The inverse correlation of lipase lipoprotein (LPL) with TNF- α in the very-high group, in a high HDL₃-TG background, suggests a protective function for this lipase. Further studies exploring the HDL functionality in hyper-A population may add new insights about the complex relation between HDL and atherosclerosis.

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- Aterosclerose: epidemiologia, fatores de risco e fisiopatologia

Elevações rápidas e substanciais da mortalidade por causas cardiovasculares têm sido observadas no Brasil, de forma semelhante ao que ocorre para outros países em desenvolvimento (Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC, 2007). Estima-se que entre 2006 e 2015 as doenças não notificáveis (metade destas representadas por doenças cardiovasculares) terão um aumento de 17%, enquanto as mortes por doenças infecciosas, deficiências nutricionais e condições maternas e perinatal combinadamente devem declinar em 3% ¹ (World Health Organization, 2007). Apesar do declínio da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos nos últimos 30 anos, as principais complicações da aterosclerose, incluindo a cardiopatia isquêmica, infarto do miocárdio e a gangrena das extremidades ainda são responsáveis por mais da metade da mortalidade anual nos Estados Unidos (Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC, 2007; Gotlieb, 2006).

Dentre os fatores de risco para a doença aterosclerótica no Brasil, o tabagismo apresenta prevalência de 24%. No estado de São Paulo (19 cidades, n= 20.000) as taxas de prevalência encontradas foram de 17% (Sociedade Brasileira de Cardiologia-SBC, 2007).

A obesidade e o sobrepeso apresentam respectivamente as prevalências de 8,9% e 41,1% em homens e de 8,9% e 40,0% em mulheres² (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, 2004).

Estimou-se uma taxa de 7,6% de incidência para o diabetes melito em 1988 (Ministério da Saúde, 2001)³. A taxa de prevalência de hipertensão no estado de São Paulo, no período de 2002 a 2003 foi de 29,0%, variando entre 16,9% na cidade de Palmas e 31% na cidade do Rio de Janeiro.⁴

Quanto às dislipidemias, um estudo conduzido em nove capitais revelou concentrações séricas de colesterol maior que 200mg/ dL para 38% dos homens e para 42% das mulheres com idade de 35 ± 10 anos (Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC, 2007).

¹ http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/Full%20text.pdf

² <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/analise.pdf>

³ <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001/index.cfm>

⁴ <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2007/d27c.htm>

Assim, há uma emergente necessidade de que se estabeleçam métodos não-invasivos e de custos aceitáveis para a avaliação da aterosclerose nos estágios em que esta ainda permaneça assintomática na população (Stern, 2008).

O espessamento da íntima-média (EIM) de carótidas tem sido aferido em grandes estudos como um marcador da aterosclerose precoce (estágio inicial) mesmo em indivíduos assintomáticos (Crouse et al., 2007). A medida do EIM é fortemente capaz de prever eventos vasculares futuros, como infarto agudo do miocárdio (Salonen e Salonen, 1991) e a primeira manifestação de acidente vascular cerebral isquêmico após um período de 6 a 9 anos (Chambless et al., 2000). Achados recentes suportam observações que o uso do EIM de carótidas, de forma preventiva, deve somar-se à verificação de fatores de risco tradicionais em indivíduos assintomáticos acima dos 45 anos e que o EIM associa-se à doença arterial coronariana (Heuten et al., 2008).

Segundo a SBC o espessamento da carótida máximo $> 1\text{mm}$ é um fator agravante de risco cardiovascular (Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC, 2007).

A aterosclerose tem sido considerada uma doença inflamatória. As mudanças de conceito se intensificaram com o conhecimento de que a angina instável e o infarto agudo do miocárdio ocorrem, na maioria das vezes, porque a placa de aterosclerose se torna instável, rompe e há trombose. Verificou-se ainda que as lesões mais vulneráveis são aquelas de placas com maior conteúdo de gordura, sendo aquelas com pouca gordura e maior fibrose mais resistentes, responsáveis talvez pela angina estável, mas com menor probabilidade de levar à trombose. Além disso, a placa instável teria mais inflamação do que a estável (Higuchi e Ramires, 2006)⁵.

Não obstante, as controvérsias de opinião com relação às hipóteses sobre a origem da placa aterosclerótica, entender a seqüência de eventos que ocorrem para o desenvolvimento da placa é de fundamental importância.

Primariamente a lesão ocorre na íntima em locais predispostos (seja por disfunção endotelial ou acúmulo subendotelial de células musculares lisas). O acúmulo lipídico nesses locais depende da quebra da integridade da “barreira” endotelial, de uma

⁵ <http://educacao.cardiol.br/pec/aterosclerose/fasciculos/2002a1f2m1/art04.htm>

disfunção das células da musculatura da parede, que pode ser provocada por estresse oxidativo ou até mesmo do tipo de tecido conjuntivo sintetizado pelas células da íntima (Gotlieb, 2006).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) circulantes contêm quantidades pequenas de hidroperóxidos, no entanto, uma vez “presas” na camada subendotelial recebem hidroperóxidos adicionais, atingindo assim um limiar crítico de oxidação de seus fosfolipídios. Esses lipídeos oxidados estimulam, então, as células endoteliais a expressarem a proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) que, por sua vez, atrai os monócitos para a camada subendotelial das artérias. Oxidadas, essas LDLs promovem também a diferenciação dos monócitos em macrófagos. Esses, por sua vez, regulam positivamente a oxidação de LDL no processo de conversão dos mesmos em células espumosas (Barter et al., 2004) ao liberarem enzimas doadoras de hidroperóxidos (15-lipoxigenase) e ROS (mieloperoxidase) que poderão reagir com os resíduos de lisina na apoB ou ocasionar oxidação na porção protéica e lipídica da LDL, respectivamente (Mertens e Holvoet, 2001).

Os macrófagos estimulados liberam ainda citocinas, algumas destas estimulam as células endoteliais a expressar as proteínas de adesão, o que leva à ligação de monócitos do sangue circulante ao endotélio após o seu recrutamento na parede da artéria pelo MCP-1 (Barter et al., 2004). As citocinas produzidas tornam a superfície vascular pró-coagulante. Com a progressão da lesão podem ocorrer trombos que serão ou não incorporados à placa. Além disso, os macrófagos ativados liberam fatores de crescimento que estimulam as células musculares lisas (Gotlieb, 2006).

A diminuição da oferta de nutrientes às células mais profundas da íntima ocasiona necrose, esta condição é reforçada pela liberação de enzimas proteolíticas dos macrófagos e tecido lesado. Assim forma-se a placa lipídica fibroinflamatória para a qual a angiogênese promove a neovascularização (Gotlieb, 2006). A placa pode romper-se em consequência da: 1-) força de cisalhamento hemodinâmico no “ombro” da placa; 2-) atividade inflamatória na interface entre a área de deposição lipídica e o tecido fibroso; e/ou 3-) presença de metaloproteinases que digerem a matriz de tecido conjuntivo (Gotlieb, 2006).

Morfológicamente, o primeiro tipo de lesão que ocorre nesses “locais predispostos” é o espessamento adaptativo da íntima e reflete o estágio inicial da doença (precocidade). No estágio de desenvolvimento ocorrem as lesões de tipo II, caracterizadas pelas estrias gordurosas, as lesões do tipo III, com pequenos “pools” de lipídeos extracelulares e tipo IV, definida por uma delgada separação entre o “core” lipídico e o lúmen arterial. Finalmente, a lesão de tipo V, exibe um espessamento fibroso de sua estrutura conhecido como “capa”. Esta lesão exibe uma complicada arquitetura com a progressão da placa e ruptura (Bonomini et al., 2008).

A deposição de colesterol na parede arterial e conseqüentemente o desenvolvimento da aterosclerose pode ser favorecido por distorções do transporte reverso do colesterol (TRC). O efluxo do colesterol das células não-hepáticas para o fígado e órgãos esteroideogênicos, locais onde o mesmo será usado para a síntese de lipoproteínas, ácidos biliares, vitamina D e hormônios esteroidais é mediado pela HDL. O TRC descreve, portanto, uma importante função antiaterogênica da HDL bem como seu metabolismo (von Eckardstein et al., 2001) e pode ser dividido em quatro fases (Kapur et al., 2008).

Na “fase 1” a HDL nascente, remove o colesterol livre e os fosfolípidos das células periféricas, através da interação com o ABCA-1, um transportador de membrana amplamente distribuído nos tecidos periféricos. Outro transportador de membrana, de função semelhante, o ABCG1, é expresso em macrófagos (Kapur et al., 2008). A “fase 2” consiste na esterificação do colesterol livre na partícula, pela enzima LCAT (lecitina: colesterol acil - CoA transferase) tornando “madura” a HDL discoidal que assume um formato maior e esférico. Na “fase 3” há o remodelamento da HDL pela ação da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), que promove a “troca” entre o colesterol da HDL e o TG as Lipoproteínas ricas em TG (VLDL e LDL). Na “fase quatro” há o catabolismo das partículas maduras HDL₂ e HDL₃ por meio da ligação ao SRB1 no fígado ou da ação da LH. Além disso, ocorre o catabolismo pela excreção renal de partículas pequenas de HDL mediada por receptores de apoE ou por meio das LDLs e VLDLs remanescentes após terem adquirido o colesterol da HDL (Kapur et al., 2008).

A HDL nascente, também conhecida como HDL pobre em lipídios, ou pré- β HDL, é produzida no intestino e no fígado, mas também pode ser liberada como fragmentos de superfície da lipólise de lipoproteínas ricas em TG ou na interconversão das HDLs 2 e 3. (Kontush e Chapman, 2006).

1.2- Proteína C-reativa (PCR), fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) e lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox): fatores pró-inflamatórios na progressão da aterosclerose

As LDLs circulantes têm valor adicional à verificação do risco global para predição do risco cardiovascular baseado na idade, gênero e no HDL total. Durante a oxidação da LDL, ocorrem reações químicas em lipídeos e na apolipoproteína B100 (apoB100). A LDL oxidada (LDLox) atua na progressão da aterosclerose por promover a infiltração de monócitos, migração e proliferação de células musculares, apoptose de células endoteliais, entre outros. Estas lipoproteínas podem ser oxidadas por íons metálicos como o Fe^{2+} e Cu^{2+} , enzimas como a lipoxigenase e a mieloperoxidase e por espécies reativas de oxigênio (EROS) (Mertens e Holvoet, 2001).

Considerando que durante as fases de oxidação por metais (latência, propagação e decomposição) as modificações na LDL formam diversos epítomos com ação imunogênica para diferentes anticorpos, Tsouli et al. (2006) usaram auto-anticorpos contra vários tipos de LDL minimamente oxidadas enriquecidas tanto com lisofatidilcolina (pela ação da enzima: acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas [PAF-AH]), quanto por fosfolipídios oxidados (quando em ausência da PAF-AH). Os epítomos formados não foram associados à extensão da aterosclerose aferida pelo espessamento de carótida (EIM) em pacientes com dislipidemia primária, não tratados. Corroborando os achados de Salonen et al. (1992), os autores sugerem que os anticorpos anti-malondialdeído (MDA)-lisina são os mais relevantes ao caráter sanguíneo podem prever a progressão da doença, em pacientes com aterosclerose de carótidas (Tsouli et al., 2006).

Adicionalmente às concentrações de oxLDL estão associadas ao aumento das concentrações séricas dos fatores pró-inflamatórias: PCR e TNF- α (Hulthe e Fagerberg, 2002).

Foi demonstrado que a externalização de fosfolípidos oxidados é necessária para que os macrófagos fagocitem as células apoptóticas e que estes epítomos formados são reconhecidos não somente por anticorpos específicos, mas também pela proteína C-reativa (Leitinger, 2003).

A proteína C-reativa é uma proteína de reação de fase aguda, da família das pentraxinas que inclui o amilóide sérico P e a PTX3 (Mantovani et al., 2008). Consiste num polímero de cinco subunidades idênticas de peso molecular de aproximadamente 115KDa (Rifai e Warnick, 2006).

Sua síntese ocorre primariamente no fígado em resposta à interleucina- 6 (IL-6) e é rotineiramente monitorada como um indicador de infecção e doenças autoimunes por meio de métodos de detecção entre 3 e 8mg/L (Rifai e Warnick, 2006).

Achados clínicos e observações experimentais têm levado a uma tendência em considerar a PCR, não mais como um mero marcador, e sim um mediador da doença cardiovascular, assumindo assim, um potencial papel causal em vários estágios da aterogênese (Bisoendial et al., 2007).

De acordo com a SBC, valores de usPCR >3mg/dL, na ausência de etiologia não aterosclerótica, é um fator agravante do risco cardiovascular (Sociedade Brasileira de Cardiologia-SBC, 2007). Tem sido proposto que os pacientes sejam categorizados de acordo com seus níveis de PCR-ultra-sensível em: grupo de baixo risco: (usPCR<1mg/L), risco intermediário: (usPCR entre 1 e 3mg/L) e alto risco: usPCR>3mg/L) (Pearson et al., 2003).

De forma independente do Sistema de Complemento a PCR pode participar de diversos caminhos pró-ateroscleróticos. Neste sentido, vem sendo encontrada ligada às células apoptóticas e a LDL oxidada em virtude da sua alta afinidade (Ca²⁺ dependente) pelos resíduos de fosfatidilcolina, em particular fosfatidilcolina oxidada

(Chang et al., 2002). É capaz, portanto, de melhorar a captação da LDL modificada pelos macrófagos, que se reporta à subsequente formação das células espumosas. Pode, ainda, interagir com células fagocíticas e células vasculares residentes, modulando sua resposta inflamatória (Bisoendial et al., 2007).

Adicionalmente, pode modular em células musculares lisas vasculares, a expressão do fator tecidual, um iniciador primário da cascata de coagulação (Wu et al.)⁶, de promover efeitos pró-oxidativos e inibir a atividade do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), posicionando-se como uma molécula chave na acentuação da disfunção endotelial (Singh et al., 2007).

No entanto, não está claro, até o momento, se estas ações da proteína C-reativa como causa da aterosclerose precoce, medida pelo EIM de carótidas, poderiam ser explicadas pela idade, pelo gênero e por fatores de risco cardiovascular como o foi para a população estudada por Lorenz et al. (2007).

O TNF- α é produzido principalmente por fagócitos mononucleares, mas também por células T antígeno-estimuladas, células NK (“Natural Killer”) e mastócitos. A proteína circulante é um polímero (51kD) constituído de três cadeias polipeptídicas de 17kD (Abbas e Lichtman, 2003). Existem dois tipos de receptores para o TNF- α o receptor tipo I ou p55 (tamanho: 55kD) e o receptor TNF- α tipo II ou p75 (75kD). A afinidade da citocina a estes receptores é dependente de sua concentração e ambos estão presentes em diversos tipos celulares, como por exemplo, nas células endoteliais do fígado, do hipotálamo e do músculo (Abbas e Lichtman, 2003).

Tem como principal ação fisiológica estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos aos locais de infecção e ativar estas células para a erradicação de microrganismos. De forma “dose-dependente” o TNF- α é capaz de estimular a produção de proteínas de fase aguda e à hipoglicemia no “shock” séptico, com concentrações de glicose incompatíveis com a vida por elevado gasto da glicose pelo músculo e falha na reposição desta pelo fígado (Abbas e Lichtman, 2003).

⁶ Wu J et al. *apud* Mackman N and Taubman MB. Does Tissue Factor Expression by Vascular Smooth Muscle Cells Provide a Link Between C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 601-603.

Em indivíduos adultos, saudáveis e normotensos as concentrações de TNF- α associam-se positivamente com as variações diurnas da pressão arterial diastólica (Abramson et al., 2006). As concentrações plasmáticas desta citocina foram associadas também a perturbações metabólicas e celulares importantes no processo vascular relacionadas aos graus de aterosclerose precoce, como por exemplo, as concentrações de VLDL, LDL (positivamente) e o pico do tamanho de LDL em homens assintomáticos de meia-idade (Skoog et al., 2002). Em uma população indiana, o TNF- α associou-se ao EIM de carótidas em indivíduos de normotolerantes ou intolerantes à glicose (Gokulakrishnan et al., 2008). Adicionalmente, em pacientes pós-enfartados a elevação das concentrações plasmáticas de TNF- α persistem naqueles com aumento do risco de recorrência de eventos coronarianos (Ridker et al., 2000) e primeiras 48h (Gonzálvez et al., 2007).

A infusão de TNF- α em hamsteres pode não apenas induzir a resistência à insulina hepática, mas também estimular a superprodução pós-prandial e de jejum do conteúdo de apoB100 em VLDL concomitante ao prejuízo da via de sinalização da insulina (Qin et al., 2008). Sabe-se que o TNF- α é capaz de inibir a função do “peroxisome proliferator-activated receptor gama” (PPAR γ) contribuindo na patogênese da resistência à insulina, aterosclerose, inflamação, câncer e caquexia. Além disso, a inibição desse receptor nuclear pode representar o mecanismo molecular de desordens lipídicas (Ye, 2008).

1.3- Proteínas de transferência de ésteres de colesterol ou fosfolípidos, lipoproteína lípase e lipase hepática

O conhecimento de que a concentração plasmática de HDL-C está positivamente associada à proteção contra a doença arterial coronariana ocasionou um crescente interesse em agentes farmacológicos capazes de elevar sua concentração plasmática. No entanto, a recente associação entre o Torcetrapib (droga inibidora seletiva da CETP que eleva as concentrações de HDL) e o aumento da mortalidade cardiovascular tem causado grande ressalva na comunidade científica quanto à segurança e eficácia de métodos para a elevação desta lipoproteína. Tais observações destacam o papel da

funcionalidade da partícula em detrimento da elevação de suas concentrações (Joy e Hegele, 2008).

É possível que a inibição da CETP mediada pelo Torcetrapib tenha falhado em proteger contra eventos cardiovasculares em consequência de um perfil não protetor ou mesmo pró-inflamatório da HDL (Ansell, 2007). Corroborando esta possibilidade, foi demonstrado recentemente que apesar da inibição da CETP pelo Torcetrapib *per se* reduzir o tamanho da lesão aterosclerótica em camundongos que expressam o gene da apolipoproteína E-Leiden e CETP humana, esta droga não é capaz de aumentar o potencial antiaterogênico da Atrovastatina, quando associadas (de Hann et al., 2008). Adicionalmente, quando comparado à Atrovastatina, o Torcetrapib ocasiona um fenótipo mais pró-inflamatório, que inclui aumento do recrutamento de monócitos e expressão de MCP-1, aumentando o conteúdo de macrófagos e reduzindo do conteúdo de colágeno na lesão (de Hann et al., 2008).

Recentemente, foi proposta uma nova função à CETP. No que tange à resposta inflamatória aguda, esta proteína estaria relacionada à redução da intensidade da resposta inflamatória e à presença de lipopolissacarídeos em camundongos que expressam a CETP humana. Tal fato ocorreria pela redução da disponibilidade destes aos receptores tipo “toll” (toll like receptors) e consequente inibição da produção de TNF- α e IL-6 e foi relacionado à maior resistência desses animais à morte após infecção por lipopolissacarídeos da bactéria *E. coli* (Cazita et al., 2008).

A CETP atua na transferência de ésteres de colesterol das HDLs para as VLDLs, IDLs e lipoproteínas remanescentes e faz o caminho inverso para os triacilgliceróis. Esta proteína, junto à LCAT, atua no metabolismo da HDL (Mahley et al., 2003). Atuam também no metabolismo de lipídios e lipoproteínas as enzimas: Lipoproteína Lípase (LPL) e a Lípase Hepática (LH), a primeira liga-se às células endoteliais e promove a hidrólise de triacilgliceróis das VLDLs circulantes, a segunda é primariamente uma fosfolipase, mas também possui atividade hidrolase para triacilgliceróis, atua de diversas maneiras no metabolismo de lipoproteína, sendo capaz de facilitar a interação entre lipoproteínas remanescentes com o receptor LRP “Low-Density Lipoprotein Receptor- Related Protein” nos hepatócitos. Participa, ainda, da conversão da

HDL₂ para HDL₃ removendo triacilgliceróis e fosfolípidos da HDL. A elevada atividade da LH reduz as concentrações de HDL total (Mahley, 2003). Essas lipases foram associadas tanto a efeitos próaterogênicos quanto antiaterogênicos, em razão do papel central que exercem na atividade lipolítica endotelial (Hasham e Pillarisetti, 2006).

1.4- Capacidade antioxidante e antiinflamatória da HDL

A HDL é um conhecido fator de risco negativo para a doença aterosclerótica (Abbot et al., 1988; Gordon e Rifkind, 1989; Barter e Rye, 1996). Sua ação protetora deve-se à atuação no transporte reverso do colesterol, bem como às suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias (Kontush e Chapman, 2006; Barter et al., 2004), antiinfeciosa e antiapoptóticas, entre outras (Kontush e Chapman, 2006). Esta lipoproteína é capaz de inibir a oxidação de LDL (Mertens e Holvoet, 2001), o que tem sido comumente atribuído ao seu conteúdo em antioxidantes (alfa-tocoferol, licopeno, estrógenos), às propriedades antioxidantes da apoA-I e apoA-II e principalmente à paraoxonase (PON1), uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos carboxílicos aromáticos e compostos organofosforados (Lima e Couto, 2006).

A PON1 catalisa a hidrólise de fosfolípidos oxidados na LDL, os quais estimulam a produção de citocinas e induzem a adesão de monócitos na superfície de células endoteliais. Além disso, diminui o conteúdo de peróxidos lipídicos em artérias coronárias humanas e suas lesões da carótida (Lima e Couto, 2006).

Assume-se geralmente que as concentrações de HDL-colesterol são os maiores determinantes da biodisponibilidade da PON1 no sangue, o que se deve ao fato da maior parte desta enzima circulante ligar-se a partículas de HDL. Sugere-se que tal enzima associe-se somente a determinados tipos de HDL (Roest et al., 2007).

Outras enzimas com ação antioxidante transportadas pela HDL são a acetil-hidrolase ativadora do fator de plaquetas (PAAF-AH) e a lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) (Barter et al., 2004).

A principal proteína da HDL, a apoA-I, é capaz de remover hidroperóxidos lipídicos da LDL *in vitro*, após a injeção em camundongos e após a infusão em humanos, ambos *in vivo* (Navab et al., 2000; a e b). A HDL CE – O (O)H (HDL ligada a hidroperóxidos de éster de colesterol) é rapidamente e seletivamente removida pelo fígado. Então, uma das ações antioxidante/antiinflamatória da HDL é mediada pelo mecanismo de ligação e transporte “para fora” dessas moléculas oxidadas (Barter et al., 2004). A hidrólise de lipídios oxidados é considerada também uma ação indireta da HDL sobre a inflamação, visto que estes possuem potente atividade pró-inflamatória (Theilmeier et al., 2000; Navab, 2004). Adicionalmente, a HDL é capaz de inibir a transmigração de monócitos, por meio da inibição da MCP-1 (Navab et al., 1991).

Quando associadas à apoA-I as HDLs inibem a ativação de monócitos mediadas por contato, pela ligação com células T, inibindo a produção de TNF- α e de interleucina beta. Este pode ser um mecanismo geral de proteção contra a ativação de monócitos em condições inflamatórias quando estimulados por linfócitos T. É também um importante mecanismo de contra-regulação para a ativação de macrófagos pela liberação de proteínas do plasma para o tecido inflamado (Hyka et al., 2001; Burguer e Dayer, 2002). Além disso, a HDL é capaz de atenuar a produção de IL-6 em células endoteliais expostas a estímulos pró-inflamatórios, como por exemplo, o TNF- α e as endotoxinas (Gomaraschi et al., 2005).

Cokerill et al. (1995) afirmaram que a HDL seria capaz de inibir a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina induzidas *in vitro* por TNF- α , IL-1 ou endotoxinas, reduzindo então, a infiltração de monócitos na parede arterial. Posteriormente, foi demonstrado que as HDLs também atuam diretamente no bloqueio da síntese das proteínas de adesão das células endoteliais induzidas por TNF- α por meio da supressão da atividade da esfingosina kinase (“sph kinase”) (Xia et al., 1999).

A produção desses fatores de adesão também podem ser estimulados pela LDL oxidada, proteína C-reativa e também inibido pela HDL (Nofer et al., 2005). No entanto, o bloqueio dos estímulos exercidos pelo TNF- α e pela CPR se faz por mecanismos distintos, nesta última há uma “inibição competitiva” onde a HDL evita a ligação da CRP com célula a ser estimulada, por ligar-se ao sítio de ligação da CPR (Wadham et al., 2004).

Nicolls et al. (2005a, b), observam a diminuição da expressão de moléculas de adesão e da adesão de neutrófilos na parede arterial e na inflamação após a administração de HDL reconstituída (rHDL) em coelhos.

Um ano depois, Nofer et al. (2005) sugerem que a esfingosilfosforilcolina e o lisosulfatídio (ambos lisosfingolípides presentes na HDL) podem contribuir para o efeito inibitório desta lipoproteína na expressão da E-selectina em células endoteliais humanas por mecanismos que envolvem a ligação da HDL com S1P₃ (receptor da família S1P) e na ativação da proteína kinase AKT.

Além desses fatores, importantes para o desenvolvimento da inflamação na lesão aterosclerótica, Sugatani verificou a capacidade da HDL em inibir o fator ativador de plaquetas (“platelet activating factor”) (Sugatani et al., 1996). Ademais, esta lipoproteína aumenta a biodisponibilidade do NO pelo aumento da atividade de eNOS. A redução da disponibilidade do NO é uma característica fundamental na disfunção endotelial. Tal redução aumenta a afinidade das células endoteliais pelos leucócitos, prejudica o tônus vascular e aumenta a liberação de espécies reativas do oxigênio (ROS) (Weissberg, 2000).

1.5- O modelo de hiperalfalipoproteinemia

Inicialmente tida como familiar e associada à hipobetalipoproteinemia, a hiperalfalipoproteinemia (HIPER-A) foi relacionada ao aumento da longevidade, secundário à baixa incidência de doença arterial coronariana (DAC) (Castelli et al., 1986). São escassos na literatura estudos que utilizam o modelo de hiperalfalipoproteinemia na avaliação do processo aterosclerótico.

Tal modelo é definido clinicamente por indivíduos que apresentam concentrações plasmáticas iguais ou acima do percentil 90 para a população (Yamashita et al., 2000). Em estudos anteriores em nosso laboratório estabeleceu-se este percentil como de 68mg/dL para uma população assintomática local (n=1700), a partir do qual os indivíduos são classificados como hiperalfalipoproteinêmicos.

A condição HIPER-A pode ser causada pelas deficiências genéticas de CETP, de LH ou de ambas, assim como pelo aumento da produção de apo- AI. Por outro lado, a HIPER-A pode ser ocasionada por etiologia desconhecida (Yamashita et al., 2000). Estudos em famílias de irmãos gêmeos indicam que 40%-60% da variação de HDL entre os indivíduos é determinada por causas genéticas (Corella et al., 2000). Essa condição envolve modificações nas propriedades físico-químicas, no metabolismo e na função da HDL (Yamashita et al., 2000).

Na HIPER-A, partículas de HDL, ricas em apoE, ao efetuarem o efluxo de colesterol de macrófagos, não se mostraram boas aceptoras de colesterol em oposição ao que ocorre para as HDLs 2 e 3 livres de apoE. Estes dados sugerem que partículas de HDL, na deficiência de CETP, são desprovidas em parte de função antiaterogênica, não tendo a habilidade adequada para remover o colesterol das células repletas de lípidos, favorecendo possivelmente o acúmulo de EC nos macrófagos (Ishigami et al., 1994). A adição de CETP e lipase hepática (HL) ao plasma de pacientes deficientes em CETP originou lipoproteínas de alta densidade, pobres em colesterol e fosfolípidos e efetivas em promover o efluxo de colesterol das células espumosas (Yamashita et al., 1995).

Em pacientes homozigóticos, as concentrações de colesterol total encontram-se moderadamente elevadas, enquanto as de HDL-C estão aumentadas de 3-6 vezes, principalmente à custa da subfração 2 da lipoproteína de alta densidade (HDL₂). As partículas de HDL₂ dos indivíduos controle têm a capacidade de proteger os macrófagos do acúmulo de colesterol, quando incubadas com LDL acetilada e de aumentar o efluxo de colesterol proveniente das células. No entanto, em pacientes deficientes de CETP, as HDL₂, ricas em ésteres de colesterol (EC) e pobres em triacilgliceróis (TG), mostraram esta capacidade reduzida (Yamashita et al., 1995).

Os receptores de LDL possuem maior afinidade por estas partículas modificadas de HDL do que pela LDL normal. As apoA-I, apoC-III e apoE estão marcadamente elevadas, enquanto a apoB está normal, ou discretamente diminuída. As partículas de HDL enriquecidas com apoE poderiam estar relacionadas ao catabolismo mais lento de apoA-I e apoA-II (Rader e Ikewaki, 1996). A presença de partículas HDL grandes,

ricas em apoE, são aparentemente específicas da deficiência de CETP, pois não são detectadas em HIPER-A com atividade de CETP normal (Yamashita et al., 1995).

Van der Steeg et al. (2007) mostraram recentemente que em indivíduos caucasianos de descendência holandesa, a deficiência de CETP não está relacionada à HIPER-A, e que nesses indivíduos houve maior elevação de apoAI e menores níveis de triacilgliceróis quando comparados a uma nova mutação heterozigótica da CETP (CETP-IVS7+1), encontrada em apenas 1 dos 95 indivíduos estudados.

Em recente meta-análise Thompson et al.(2008) avaliaram publicações relevantes do período de 1970 a 2008 (inclui dados de um grupo de HIPER-A de nosso laboratório) e relataram uma fraca associação inversa com o risco de doença coronariana em genótipos de TaqIB, I405V e -629C>A, de deficientes parciais de CETP, com um modesto aumento das concentrações de HDL-C em consequência à moderada inibição da atividade de CETP.

O modelo de HIPER-A no pioneiro estudo de Kontush et al. (2004), demonstra um significativo decréscimo da atividade antioxidante intrínseca de subfrações de HDL quando comparados com o grupo controle normolipidêmico. Apesar de essa condição não ter sido associada à progressão da doença aterosclerótica, esse trabalho sugere a existência de uma relação funcional entre o estresse oxidativo sistêmico e o maior grau de susceptibilidade da LDL à oxidação na presença de subfrações de HDL, onde o aumentado número destas lipoproteínas “compensaria” sua disfunção. Essas HDL de baixa atividade antioxidante intrínseca apresentam aumento no conteúdo de triacilgliceróis em suas cinco subfrações (2a, 2b, 3a, 3b e 3c) quando comparados ao grupo controle (Kontush et al., 2004).

Em estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório, foram observadas reduções nas atividades de CETP e HL e o aumento da atividade da LPL que poderiam explicar por que o grupo HIPER-A apresenta HDL enriquecidas em triacilgliceróis (TG-enriquecidas HDL) coexistindo com níveis não alterados de triacilgliceróis séricos (Alarcon et al., 2002; Kaplan et al., 2006).

Considerando a associação entre a HDL e a mortalidade cardiovascular, o estudo de Hirano et al. (1997) mostra que existe um limiar onde o excesso de HDL pode se tornar potencialmente prejudicial. Tal fato possibilitaria que a relação gráfica entre a HDL *versus* doenças cardíacas fosse representada por uma curva em U, ou seja, indivíduos com concentrações muito altas ou baixas de HDL-C apresentariam maior possibilidade de desenvolver doenças cardíacas que aqueles com um nível intermediário (Hirano et al., 1997; Nagano et al., 2004). Matsuzawa et al. (1984), haviam relatado dois casos de HIPER-A severa que apresentavam opacidade prematura da córnea e angina do peito, sugerindo que esta condição não seria benéfica e poderia representar um mecanismo favorável ao desenvolvimento de aterosclerose.

A despeito da não descrição das causas de HIPER-A em sua pequena amostra (n=12) de indivíduos portadores de hiperalfalipoproteinemia, Pirro et al. (2003), abrem uma importante discussão sobre esta condição. O estudo sugere, pela primeira vez, que a concentração da fração HDL poderia regular a produção da PCR e que indivíduos HIPER-A poderiam exibir um perfil antiinflamatório considerando a diminuição da concentração de usPCR nestes quando comparados a controles.

Em síntese, as elevadas concentrações primárias de HDL-C observadas na HIPER-A refletem a quantidade dessas lipoproteínas, mas não necessariamente o aumento de sua funcionalidade. Em estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, foi observada a redução da atividade antioxidante intrínseca da HDL (Kontush et al., 2004).

Apesar do importante papel antiinflamatório da HDL, apenas um estudo na literatura investigou o efeito de elevadas concentrações dessa lipoproteína sobre a medida de PCR sérico; o presente estudo propôs-se, dentro desta mesma linha de pensamento, a determinar se a HIPER-A seria protetora, ocasionando reduções das concentrações de fatores pró-inflamatórios, como ocorreu para a PCR no trabalho de Pirro et al. (2003) e adicionalmente determinar as repercussões cardiovasculares da HIPER-A.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Caracterizar bioquimicamente o estado de hiperalfalipoproteinemia por intermédio das medidas das proteínas reguladoras do metabolismo da HDL: lípase hepática, lipoproteína lípase, proteínas de transferência de éster de colesterol ou de fosfolípidos e da concentração da ApoAI;

2.2- Objetivos específicos

Determinar os efeitos da hiperalfalipoproteinemia e de seus diversos graus sobre:

- a-) as concentrações séricas de fatores pró-inflamatórios, a proteína C-reativa, o fator de necrose tumoral-alfa e os anticorpos anti-LDL oxidada;
- b-) a medida da aterosclerose precoce de carótidas e as frequências de manifestações clínicas de doença coronariana e acidente vascular cerebral.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Protocolo experimental

O presente trabalho provém da análise estatística de um banco de dados do Laboratório de Lípidos/FCM cujos procedimentos de seleção, coleta e análise laboratorial dos materiais foram realizados no período de 2004 a 2006, de acordo com o protocolo experimental descrito a seguir.

A amostra de 223 voluntários (selecionados dentre 1.200 indivíduos) de ambos os sexos, provenientes dos diversos ambulatorios do HC-UNICAMP, foi definida pelas concentrações de HDL-C. O valor de corte da fração HDL- C (68mg/dl) foi obtido em estudo prévio para 1.700 indivíduos (dados não publicados), conforme o percentil 90 para a população local. Sendo assim, foram denominados indivíduos controle (CTL) aqueles com concentrações séricas desta fração menor que 68mg/dL e indivíduos hiperalfalipoproteinêmicos (HIPER-A), aqueles cujas concentrações de HDL-C foram iguais ou superiores a 68mg/dL. O grupo HIPER-A foi dividido em três subgrupos, de acordo com diferentes concentrações de HDL-C: 1-) moderado com concentrações de HDL-C ≥ 68 ou ≤ 80 mg/dL; 2-) alto em que: HDL-C ≥ 81 ou ≤ 90 mg/dL e 3-) muito alto, em que: HDL-C ≥ 91 ou ≤ 111 mg/dL, com médias de HDL-C estatisticamente diferentes ($p < 0,001$).

Após a seleção laboratorial dos casos, os voluntários foram encaminhados ao Ambulatório de Dislipidemias do HC/Unicamp para exame clínico e coleta para nova análise laboratorial.

Foram excluídas as seguintes causas de HIPER-A secundárias: hepatopatias, nefropatias, pneumopatias e endocrinopatias como o *diabetes mellitus* (cl clinicamente manifesto ou definido como 2 glicemias de jejum ≥ 126 mg/dL). Também foram excluídos os casos de obesidade, definida pelo índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m².

Além destes, constituíram critérios de exclusão a ingestão crônica de bebida alcoólica e uso de alguns medicamentos (corticosteróides, insulina, fibratos, ácido nicotínico, estatinas, fenitoína, hidrocarbonetos clorados e inibidores de proteases),

conhecidamente capazes de alterar o perfil lipídico. Permaneceram neste estudo três casos de mulheres em uso de terapia de reposição hormonal entre os 223 voluntários.

Foram excluídos, também os indivíduos incluídos no critério de “doença cardiovascular presente” que abrangeu: infarto agudo do miocárdio (IAM) prévio (detectado em serviço médico-hospitalar), IAM silencioso baseado no eletrocardiograma (ECG) e/ou *angina pectoris*. O IAM é definido pela presença de pelo menos dois dos três critérios: dor torácica típica, ECG com alterações QRS e ST-T e elevação característica de enzimas cardíacas séricas. Para os pacientes que não foram submetidos à angiografia a *angina pectoris* foi diagnosticada clinicamente por episódios de desconforto torácico breves (maiores ou iguais a 15 minutos) que pioram com exercício e/ou emoção, aliviados com repouso ou uso de nitroglicerina (ou outra medicação específica) (Hirano et al., 1995). Além disso, foi considerada parte desse critério a intervenção cirúrgica prévia para revascularização miocárdica.

Foram avaliados clinicamente, ou por testes clínicos laboratoriais: 1-) tabagismo; 2-) sedentarismo; 3-) uso de álcool ; 4-) hábitos alimentares; 5-) atividade física 6-) a tolerância à glicose diminuída (definida como glicose de jejum entre >100 a $<126\text{mg/dL}$ (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007); 7-) as dislipidemias primárias, com ou sem causa aparente, classificadas fenotipicamente como : Hipercolesterolemia isolada, quando $\text{LDL-C} \geq 160\text{mg/dL}$, Hipertrigliceridemia isolada, quando $\text{TG} \geq 150\text{mg/dL}$ ou Hiperlipidemia mista, se $\text{LDL-C} \geq 160\text{mg/dL}$ e $\text{TG} \geq 150\text{mg/dL}$ (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

Também foram avaliadas manifestações prévias de doença cardiovascular (doença arterial coronariana (DAC) e acidente vascular cerebral (AVC), por meio de questionário clínico individual.

No questionário e exame físico aplicado aos voluntários constaram: 1-) a identificação do paciente: nome, número do registro hospitalar, idade, sexo, cor, raça, estado civil, número de filhos, endereço e telefone; 2-) dados clínicos: pressão arterial, sopros periféricos, xantomas, xantelasmas, arco senil, *acanthosis nigricans*, exame do aparelho cardiovascular e dos outros sistemas; 3-) hábitos de vida presentes: etilismo ou

não, tabagismo ou não, padrão alimentar e o hábito de atividade física; 4-) histórico individual: medicamentos em uso, doenças atuais e anteriores – enfatizando episódios cardiovasculares; além de dados de possibilidade, mediante a comprovação ou não da doença, informações sobre o climatério (em mulheres) e histórico familiar (doenças cardiovasculares e outras, ou mesmo o relato de longevidade e 5-) dados antropométricos: índice de massa corporal – IMC e circunferência de cintura (CC). Os valores de corte foram: ≥ 94 cm em homens e ≥ 80 cm em mulheres para CC e para PA: PA sistólica ≥ 85 mmHg e/ou diastólica ≥ 130 mmHg e/ou estar em tratamento para Hipertensão arterial Sistêmica – HAS (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa /FCM/Unicamp e aprovado sob o parecer nº 790/2006. Todos os voluntários foram informados adequadamente sobre o projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A obtenção do soro e/ou plasma dos voluntários em jejum de 12 horas ocorreu em duas etapas de coleta que foram realizadas no Setor de Coleta do Laboratório de Patologia Clínica, HC/ Unicamp, por um profissional técnico credenciado e acompanhado pela médica responsável pela avaliação clínica. Na primeira etapa, mediante punção venosa, foram coletados 10-15 mL de sangue. Em uma segunda etapa, após a administração de heparina (Liquemine[®], Roche, São Paulo) na concentração de 100UI/kg foram coletados 4 mL de sangue para determinação da atividade das lipases (Ehnholm e Kuusi, 1986).

Parte do material foi imediatamente analisada e parte foi armazenada à -20°C para análises nas Seções de Bioquímica e de Imunologia da Divisão de Patologia Clínica /HC e posteriormente no Laboratório de Lípidos de Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp e no Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da USP. Ambos os laboratórios funcionam de acordo com regulamento orientado pela Resolução nº 347 do Conselho Nacional de Saúde, para o armazenamento e utilização de material biológico humano em questão.

O atendimento clínico, conforme citado anteriormente, foi realizado no Ambulatório de Dislipidemias da Faculdade de Ciências Médicas, Hospital de Clínicas / Unicamp.

3.2- Análises bioquímicas gerais

Para a triagem laboratorial (dados não apresentados) determinaram-se: as concentrações de ácido úrico, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase, uréia, glicose, colesterol total e triacilgliceróis foram aferidas por meio de métodos enzimáticos-colorimétricos em analisador automático no aparelho BM Hitachi 917-Roche (Mainheinn, Alemanha). Os hormônios tireo-estimulantes (TSH) e tiroxina livre (T4 livre) mensurados por reagentes comerciais (Roche, Mainheinn, Alemanha) por meio de eletroquimioluminescência no aparelho Elecsys 2010/Roche (Basiléia, Suíça).

3.3- Lípides, lipoproteínas e apolipoproteínas

O colesterol total e os triacilgliceróis (TG) foram quantificados por métodos enzimático-colorimétricos, assim como os fosfolípides (Waco). A fração VLDL-colesterol foi estimada como triacilgliceróis/5 (Friedwald et al., 1972).

As apolipoproteínas B100 e AI foram determinadas por nefelometria. A fração de HDL-C total foi medida por método indireto (Sugiuchi et al., 1995), usando o kit comercial Roche, após a precipitação das lipoproteínas contendo apoB100 com sulfato de dextrana. As subfrações: HDL₂ e HDL₃ foram obtidas por microultracentrifugação sequencial do sobrenadante (HDLtotal) em microultracentrífuga da marca Beckman e modelo “Airfuge”/ 75B (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA) (Eyre et al., 1980).

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

3.4- Atividades das proteínas de transferência de ésteres de colesterol ou fosfolípides (CETP ou PLTP), da lipoproteína lipase (LPL) e da lipase hepática (LH)

As atividades (nmol AGL/mL/h) da LPL e da LH foram determinadas em plasma pós-heparina tendo como base a liberação de ácidos graxos livres e usando emulsão de trioleína radioativa como substrato, conforme descrito por Ehnholm e Kuusi (1986).

A atividade de CETP (% de CE transferido) foi medida por um ensaio exógeno que quantifica a transferência de ésteres de colesterol (CE) radioativo e usa o plasma como fonte de CETP (Lagrost, 1998).

A atividade de PLTP (% de fosfolipídeos (PL) foi quantificada utilizando uma emulsão como substrato exógeno radioativo, onde lipossomas contendo [^{14}C] fosfatidilcolina foram incubadas com plasma e HDL (Damen et al., 1982).

3.5- Determinação da concentração da proteína C-reativa

No ensaio ultra-sensível para a detecção da proteína C reativa foi utilizado o reagente Tina-quant CRP (Latex) HS-Roche. O ensaio utiliza anticorpos anti-CPR acoplados a partículas de látex, para intensificar a aglutinação, medida em sistema analítico automatizado Modular Hitachi–Roche por imunoturbidimetria. O intervalo de medição do método é de 0,1 a 20mg/L, com um limite inferior de detecção de 0.03mg/L. Foi usado o controle “Control N” da Roche de valor 3.3 a 4.5mg/L (Eda et al., 1998; Price et al., 1987).

3.6- Determinação da concentração do fator de necrose tumoral alfa

A concentração plasmática do TNF- α foi mensurada por ELISA que utiliza anticorpos monoclonais específicos para o TNF- α e o conjugado acetilcolinesterase Fab’Conjugado (AChE:Fab’) num ensaio sanduíche. A intensidade de cor foi medida espectrofotometricamente. O kit comercial utilizado (Cayman Chemical) proporciona um limite de detecção de 0- 200 pg/mL com uma detecção limite de 1pg/mL e um coeficiente de variação > 5% para a grande maioria das concentrações. Foram utilizadas diluições do padrão de concentração 5.000pg/mL para a montagem da curva padrão (Grassi et al., 1991).

3.7- Determinação dos anticorpos anti-LDL oxidada

Os anticorpos anti-LDL oxidada foram determinados pelo método ELISA “in house”, utilizando LDL com diversos graus de oxidação por Cu^{2+} como antígeno (Gidlund et al., 1996).

Para a determinação dos títulos de auto-anticorpos no soro, placas de 96 poços (Costar®, cód. 3690) foram sensibilizadas com 50µL/poço do antígeno (1mg/mL) diluído em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,4. Após a incubação a 4°C “overnight”, foram lavadas quatro vezes com 100µL PBS e bloqueadas com 100µL de gelatina (Difco) (1%) diluída em PBS, por duas horas a temperatura ambiente. Após segunda lavagem, amostras de soro (50µL) diluídas em 1:200, foram adicionadas aos poços e as placas mantidas por duas horas a temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas quatro lavagens com 100µL de PBS/Tween 20. O segundo anticorpo, conjugado com peroxidase anti-IgG de camundongo (50µL; 1:1500) foi adicionado. A lavagem foi repetida após uma hora de incubação a temperatura ambiente. O substrato para enzima (75µL/poço; 250mg de tetrametilbenzidina diluído em 50mL de DMSO, 10mL de H₂O₂, 12mL de tampão citrato, pH 5,5) foi adicionado e incubado por 5 minutos, a temperatura ambiente e a reação foi bloqueada com 25µL de 2,0M de ácido sulfúrico e lida a 450nm. Como um controle interno foi utilizado um padrão de IgG total com concentração conhecida (100mg/ml – Santa Cruz Biotechnology) e um controle branco (usando PBS no lugar da amostra) em cada placa. Desta maneira os resultados foram expressos por meio da absorbância relativa calculada pela seguinte fórmula: $Abs\ relativa = \{(Abs\ anticorpo) - (Abs\ branco)\} / (Abs\ controle\ interno)$.

3.8- Ultra-sonografia *Doppler* de artérias carótidas

Após a coleta de material para exames bioquímicos os voluntários foram encaminhados à Clínica Imagem Diagnóstica, Campinas – SP, para a medida da camada íntimo-média das artérias carótidas. Os indivíduos foram examinados em decúbito dorsal, com a cabeça elevada em cerca de 20 graus e rotação de cerca de 45 graus. O exame foi realizado nos aparelhos ATL HDI 1500 e 3500 Ultrasound System (Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA), e Logic 400 Electric Healthcare, Milwaukee, EUA), com transdutores lineares de 4-12 MHz. O protocolo foi realizado pelo mesmo médico ultra-sonografista. Foram realizadas medidas longitudinais de segmentos da artéria carótida comum tanto no lado direito quanto no esquerdo do pescoço, de acordo com o preconizado na literatura (Salonen e Salonen, 1991; Simons et al., 1999). Os resultados

foram expressos como média aritmética das espessuras (em milímetros) das carótidas direita e esquerda, que foram aferidas por cinco vezes cada uma.

3.9- Análises estatísticas

Foi utilizado o programa: SAS for Windows (Statistical Analysis System) versão 9.1.3.(SAS Institute Inc,2002-2003,NC,USA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ou seja, $p \leq 0.05$ e limítrofe ou “borderline” para $0,05 < p < 0,1$.

O perfil da amostra foi descrito por frequência para as variáveis categóricas e como valores de média e desvio padrão para as variáveis contínuas. Para a comparação das variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-Quadrado ou, quando necessário, o teste Exato de Fisher (presença de valores esperados menores que 5). Para comparar as variáveis numéricas entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney, em virtude da ausência de distribuição normal, e entre três ou mais grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Para comparar as variáveis entre os grupos, ajustando para sexo, idade e uso de álcool foi utilizada a análise de covariância (ANCOVA), com as variáveis contínuas transformadas em postos (“ranks”), em razão da ausência de distribuição normal. Foi utilizada a correção de Bonferroni para a confecção das tabelas (apresentadas em resultados): na Tabela 1 os valores de p obtidos após o ANCOVA foram multiplicados pelas 18 variáveis de interesse (16 presentes na tabela somadas à concentração da glicose em jejum e o uso de álcool), na 2 multiplicaram-se os valores de “p” pelas quatro variáveis descritas na mesma, assim como para a Tabela 3 multiplicaram-se os valores de “p” pelas seis variáveis descritas.

A fim de analisar a relação entre variáveis numéricas ou contínuas, foi usado o coeficiente de correlação de Spearman.

Utilizou-se a análise de conglomerados a fim de verificar a forma de agregação, ou seja, quais os parâmetros que melhor contribuiriam para a formação desses conglomerados na amostra total da população estudada.

4- RESULTADOS

**C-REACTIVE PROTEIN (hsCRP), TUMOR NECROSIS FACTOR- α (TNF- α) AND
AUTOANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL DO NOT CHANGE IN
SUBJECTS WITH DIFFERENT GRADES OF
HYPERALPHALIPOPROTEINEMIA**

Núñez CEC¹, Mazon SB¹, R.T. Nakamura², M. Gidlund³, L; Kaplan DB¹, de Faria, EC¹

¹Faculty of Medical Sciences, ¹Department of Clinical Pathology and ¹Center for Medicine and Experimental Surgery (NMCE), University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil; ²Diagnostic Image Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil; ³³Institute for Biological Sciences, Laboratory of Immunophysiopathology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil (submetido)

Running title:

Hyperalphalipoproteinemia does not change proinflammatory factors

Keywords: C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , autoantibodies against epitopes of oxidized LDL, HDL-cholesterol, hyperalphalipoproteinemia.

Corresponding author:

Eliana Cotta de Faria, MD, PhD

Address: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Departamento de Patologia Clínica, FCM - Unicamp, Barão Geraldo - Campinas, São Paulo, Brasil. CEP:13084-971

Phone: 00 55 19 35217387 / Fax: 00 55 19 35219434

E-mail: cotta@fcm.unicamp.br

Abstract

The aim of this study was to measure inflammatory factors and their relationships with different concentrations of HDL-cholesterol.

Methods

One hundred and fifty-five asymptomatic hyperlipoproteinemic individuals were grouped into moderate (M, n=77), high (H, n=52) and very-high (VH, n= 26) hyper-A subgroups, according to their different HDL-cholesterol (HDL-C) concentrations ($p<0.001$). Sixty-eight normolipidemic controls were picked.

Blood samples were collected during the fasting period for hsCRP, TNF- α and ab-oxLDL measurements. Lipids, lipoproteins and subfractions, apolipoproteins, lipase's activities (HL and LPL), cholesteryl ester and phospholipid transfer protein's (CETP and PLTP) activities were measured to characterize the hyper-A condition. Common carotid intima-media thickness (IMT) was determined in all groups as a marker of early atherosclerosis, as well as previous stroke and coronary heart disease (CAD) episodes.

Results

Hyper-A showed reduced CETP and HL activities and increased LPL activity; no changes were observed regarding PLTP. Hyper-A subjects showed HDL subfractions 2 and 3 enriched with cholesterol and with TG of HDL₃ subfraction.

High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and auto- antibodies against oxidized LDL (anti-oxi-LDL) were similar in all grades of HYPER-A. A negative correlation between TNF-alpha and LPL was seen in the very-high subgroup

No differences in atherosclerosis manifestations (stroke and CAD), as well as in early (IMT) were found.

Discussion

No differences were found among the groups regarding concentrations of proinflammatory factors, suggesting that hyper-A is not a protective condition, confirmed by equal vascular repercussions that include carotid IMT, stroke and DAC. An antiatherogenic correlation between TNF- α and LPL activities was found. Conversely, it is not possible to affirm that this is a proatherogenic condition. In animal models, an antiinflammatory role was suggested for LPL. This lipase may release PPAR- γ ligands and reduce expression of adhesion protein molecules mediated by TNF- α .²⁵

Conclusions

Different grades of hyper-A did not confer an antiinflammatory profile to hyper-A individuals. This fact is confirmed by absence of vascular repercussions and proatherogenic correlations. The inverse correlation of LPL with TNF- α , which, in a high HDL₃-TG background, suggests a protective function for this lipase, in accordance with findings in animal models. Future studies that explore HDL functionality in hyper-A population may add new insights about the complexity relation between HDL and atherosclerosis.

Introduction

Inflammatory and noninvasive vascular markers have been proposed for accessing cardiovascular risk, as well as traditional risk factors.¹

HDL is associated with cardiovascular protection as extensively demonstrated in epidemiological studies.^{2,3,4,5}

In addition to the effort to increase the HDL-cholesterol concentration, it is required an special attention to the need to maintain the functionality of this lipoprotein.⁶ HDL presents beneficial effects during reverse cholesterol transport and possesses antiapoptotic, antithrombotic, antiinfectious and antiinflammatory properties.^{7,8}

Despite the well-established point of HDL being the “good” cholesterol HDL, it may show “two faces”: a protection against inflammation and oxidation but under certain conditions. Similarly, in systemic inflammation stimulus, surgeries, infections, as well as

atherosclerosis, HDL may perform a proatherogenic role. Recent findings confirm the difficulty to raise HDL concentrations and keep its functionality. It is possible that CETP inhibition mediated by torcetrapid has failed in protecting against cardiovascular events, in consequence of a non-protective or still proinflammatory profile of increased HDL.⁹

Only one study in the literature determined plasma C-reactive protein (CRP) in hyper-A individuals defined as possessing HDL concentration above 95^o percentile of the local population. They observed reduced CRP (30%, n=12) concentration in this group, when compared with control and hyper-A individuals.

There were no research groups before ours that have considered the measurement of other proinflammatory markers, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and antibody against ox LDL.

C-reactive protein is a well-established risk factor for cardiovascular disease.^{10,11,12,1} C-reactive protein acts on innumerable proatherosclerotic pathways both dependently or independently of the complement system. This protein also confers a possible risk factor for atherosclerosis.¹³

TNF- α is a cytokine that enhances the production of acute phase proteins and hypoglycemia in septic shock.¹⁴ Plasma TNF- α concentrations correlate with metabolic and cellular changes in vascular processes and are associated with early atherosclerosis, as well as very low density lipoprotein triglyceride, low density lipoprotein cholesterol concentrations and particle size.¹⁵

Both C-reactive protein and TNF- α correlated positively with carotid intima-media thickness in subjects with different grades of glucose intolerance, as well as negatively with normal glucose tolerance.¹⁶

HDL is known to act in the inhibition of TNF- α 's pathway expression of adhesion molecules,^{17,18} and apoAI inhibits the cytokine production by direct contact with T lymphocytes.¹⁹ Furthermore, HDL binds to acute phase proteins, such as serum amyloid A, complement,²⁰ C-reactive protein²¹ and pentraxin 3.²²

In addition to traditional risk factors, such as gender, age and total HDL, oxidized LDL had a significant value in predicting cardiovascular risk.²³ Different degrees of oxidation generate various epitopes in this lipoprotein, which are recognized by immune cells, and extensively oxidative modifications are more important for immunogenic character.²⁴

The main objective of this study was to determine the concentrations of hsCRP, TNF- α , ab-oxLDL and their relationships with HDL in individuals with different degrees of hyper-A, HDL subfractions, transfer protein and lipases. We also verified the relations of these factors with common carotid intima-media thickness, an early atherosclerosis marker.

Methods

Experimental protocol

Two hundred and thirty-three asymptomatic subjects of both sexes were recruited from the University of Campinas Teaching Hospital, at the city of Campinas, after a clinical and laboratorial selection (1st visit).

The cutoff value of ≥ 68 mg/dL for defining hyperalphalipoproteinemia was obtained in a previous study from our group, with 1700 subjects of a local healthy population, corresponding to the 90th percentile value (unpublished data). We estimated that the primary hyper-A prevalence is 10% in Campinas and region. Therefore, the selection of individuals for this study was very hard.

The exclusion criteria for secondary cause of hyper-A were liver diseases, nephropathies, pneumopathies, endocrinopathies (such as diabetes), chronic alcohol and tobacco use, and sports practice drills. Additionally were excluded the use of statins, fibrates, corticosteroids and niacin and hormone replacement therapy.

The participants were defined according to their HDL-cholesterol (CHOL) concentration into three groups (statistically different HDL-C): moderate (M) hyperalphalipoproteinemic (hyper-A), (HDL-C ≥ 68 and ≤ 80 mg/dL, n= 77), high hyper-A (H) (HDL-C ≥ 81 or ≤ 90 mg/dL, n=52) and very-high (VH) hyper-A (HDL-C ≥ 91 or ≤ 211 mg/dL, n=26).

After selected for the study, the participants attended a 2nd visit for measurement of carotid intima-media thickness (Radiological Department) and underwent intravenous post heparin (Liquemine[®], Roche, São Paulo) blood collection.

All procedures were approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas (FCM-Unicamp) in São Paulo.

Analytical methods

The initial selection comprised the measurements of uric acid, alanina aminotransferase, aspartate aminotransferase, and fasting glucose, using automatic enzymatic-colorimetric methods (BM Hitachi 917Roche (Mainnheinn, Germany) (not shown).

Cholesterol (CHOL), triacylglycerols (TG), LDL-cholesterol²⁶ and phospholipids (Waco) were assessed by enzymatic-colorimetric methods as well. VLDL-cholesterol was estimated by the Friedewald's formula: triacylglycerols/5.²⁷ Apolipoproteins B100 and AI were measured by nephelometric methods. The total HDL-C was analyzed by a direct method.²⁸ In order to measure HDL subfractions, lipoproteins that contain ApoB were precipitated by dextran sulfate, and the supernatant substance was submitted to sequential microultracentrifugation in Airfuge/ 75B (Beckman Instruments, Palo Alto, USA).²⁹

Cholesteryl-ester transfer protein (CETP), phospholipid transfer protein (PLTP), lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL) activities (nmol FFAc/mL/h) were determined by radiometric methods: lipases as described by Ehnholm and Kuusi (1986)³⁰, CETP and PLTP (% transfer) using exogenous assays by Lagrost et al. (1998)³¹ and Damen et al. (1982), respectively.³²

A commercial kit for immunoturbidimetric assay, the Tina-quant CRP (latex) HS-Roche, was used to measure hsCRP^{33, 34} in the Hitachi-Roche system, and a commercial ELISA kit for TNF- α , manufactured by Cayman Chemical.³⁵

The antibodies against oxidized LDL were evaluated in all participants by ELISA incubation of samples with copper-oxidized LDL, as described by Gidlund in 1996.³⁶ The results are presented as percentage of the optical density readings relative (arbitrary units) to the ranking values in the groups..

The carotid ultrasonic procedures were performed by the same radiologist, using ultrasound equipment by Advanced Technology Ultrasound (Bothell, USA), model HDI 1500, with a 7-12 MHz color Doppler probe; the right and left common carotid arteries were measured.

The carotid IMT was calculated as the mean of five measurements in a longitudinal segment, from the left and right common carotid arteries, according to a standardized method previously described.^{37,38} The individual results were expressed as the right, left and average carotid intima-media thickness in millimeters.

Statistical methods

The statistical analyses were performed at the Statistical Section – Research Commission ((FCM-Unicamp), using the SAS System for Windows 9.1.3 (Statistical Analysis System / SAS Institute Inc, 2002-2003, NC, USA).

Cluster analysis was used for grouping individuals. Four variables (CRP, TNF- α , anti-oxi-LDL and HDL) were selected in order to verify this contribution to cluster formation.

Average differences were determined by the Mann-Whitney test, Chi-Square with Fisher's tests, and Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc tests. ANCOVA was used for adjusting variables (sex, age and alcohol use). The tests were considered significant at the probability value (p) of 0.05 or less and borderline for (p) between 0.06 and 0.10. Additionally, the Bonferroni's correction was used. The variables were correlated with the Spearman's test and a figure illustrates the *p* value corrected by Bonferroni for 12 comparisons.

Results

The variables that have highest contribution for cluster formation are HDL ($r^2 = 0.53$) and CRP ($r^2 = 0.36$). Hyper-A formed a unique population cluster of 72 individuals. The frequency of hyper-A in interquartile values for inflammatory factors was: 24 % (n=13) and 24 % (n=13), in the 2nd(3.2-6.4 pg/mL) and 3rd (6.5-16.6pg/mL) quartiles, respectively; for TNF-alpha, 36% (n=26) and 41% (n=29) in the 3rd (0.46-0.93 OD) and 4th (0.33-0.45 OD) quartiles for anti-oxi-LDL and 36%(n=14) in the 3rd (0.20-0.4 4mg/L) and 41% (n=16) in the 4th (0.45-3.7mg/dL) for hsCRP.

TABLE 1- ANTHROPOMETRIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF INDIVIDUALS WITH DIFFERENT GRADES OF HYPERALPHALIPOPROTEINEMIA – ALL (HYPER-A) AND CONTROLS

Groups Parameters	HYPER-A				CTL
	Moderate (40-77)	High (26-52)	Very-High (8-26)	All (74-155)	(52-68)
Age (years)	53 ± 12 ^a	54 ± 13 ^b	50 ± 12 ^c	52 ± 13 ^d	37 ± 14 ^{a, b, c, d}
Sex (F/M)	68 / 9 ^e	41 / 11 ^f	20 / 6 ^g	129 / 26 ^h	36 / 32 ^{e, f, g, h}
BMI (kg/m ²)	26 ± 5	25 ± 5	25 ± 5	25 ± 5	24 ± 5
WC(cm)	81 ± 12	82 ± 14	80 ± 15	81 ± 13	77 ± 9
SBP (mmHg)	124 ± 14	129 ± 17	132 ± 20	127 ± 16	120 ± 13
DBP (mmHg)	80 ± 10	82 ± 12	86 ± 11	82 ± 11	78 ± 9
C (mg/dL)	225 ± 38 ⁱ	231 ± 40 ^j	238 ± 51 ^k	229 ± 41 ^l	169 ± 44 ^{i, j, k, l}
TG (mg/dL)	99 ± 39	88 ± 40	80 ± 40	92 ± 40	78 ± 37
HDL-C (mg/dL)	° 74 ± 4	° 85 ± 3	° 105 ± 24	*83 ± 15	*51 ± 6
HDL ₂ -C (mg/dL)	18 ± 5 ^{n, r, s}	20 ± 4.4 ^{o, r}	23 ± 7 ^{p, s}	19 ± 5 ^q	11 ± 3 ^{n, o, p, q}
HDL ₃ -C (mg/dL)	55 ± 8 ^{t, u, v}	64 ± 7 ^{t, u, v}	74 ± 23 ^{t, u, v}	61 ± 13 ^w	35 ± 6 ^{t, u, v, w}
HDL ₂ -TG (mg/dL)	9 ± 5	9 ± 5	10 ± 5	9 ± 5	7 ± 5
HDL ₃ -TG (mg/dL)	23 ± 9	24 ± 10	24 ± 8	23 ± 9 ^{a'}	17 ± 9 ^{a'}
LDL-C (mg/dL)	130 ± 35	129 ± 36	116 ± 37	128 ± 36	105 ± 36
ApoAI (mg/dL)	181 ± 25 ^{b', f'}	192 ± 30 ^{c', g'}	222 ± 41 ^{d', f' g'}	192 ± 33 ^{e'}	140 ± 27 ^{b', c', d', e'}
ApoB100 (mg/dL)	104 ± 25	104 ± 27	91 ± 28	102 ± 27	82 ± 30

Data as average ± sd (n); All hyper-A (All); moderate hyper-A (M)=HDL-C ≥ 68 and ≤ 80mg/dL; high hyper-A (H) = HDL-C ≥ 81 and ≤ 90mg/dL;very-high hyper-A (VH) =HDL-C ≥91 and ≤ 211mg/dL and controls (CTL) = HDL-C >30 and <68mg/dL; Mann-Whitney after ANCOVA adjusted for sex, age and alcohol use; Kruskal-Wallis and Dunn post-hoc tests; Chi-square test and Bonferroni's correction. p≤0.05 =significant differences and 0.05<p>0.10= borderline differences .M≠CTL: (a), (e), (i), (n) and (b') p<0.0018 ; H≠CTL: (b), (f), (j), (o) and (c') p<0.0018; VH≠CTL: (c), (g), (k) , (p) and (d') p<0.0018; All≠CTL: (d), (h), (l), (q),(w) and (e')p<0.0018, (a') p<0.0018]; M≠H: (r) p<0.0018; H≠VH: (g') p<0.0018; M≠VH: (s) and (f') p<0.0018; significant differences among all groups: (t), (u), (v) p<0.0018.

Table 1 shows anthropometric, biochemical and clinical characteristics of all samples after adjustment for age and sex. No differences were found among the three phenotypes for body mass indexes (BMI), waist circumference and blood pressure (BP). The sample composition had mainly females in hyper-A (83%) and males in controls (47%). Hyper-A were older than controls. All participants were normoglycemic.

All hyper-A groups showed higher total cholesterol concentrations than controls, as well as cholesterol content in HDL subfractions 2 and 3; very-high showed more TG in HDL₃ subfraction.

Apo AI was higher in hyper-A groups and no differences were found for ApoB and TG concentrations among all groups.

TABLE 2 – LIPASE AND TRANSFER PROTEIN ACTIVITIES OF INDIVIDUALS WITH DIFFERENT GRADES OF HYPERALPHALIPOPROTEINEMIA – ALL (HYPER-A) AND CONTROLS

GROUPS	HYPER- A				CTL
Parameters	Moderate (30-77)	High (28-52)	Very-High (11-26)	All (70-155)	(30-68)
HL (nmol/FFA/mL/h)	1539 ± 973	1554 ± 1080 ^a	1398 ± 832 ^b	1519 ± 982^c	2640 ± 1379 ^{a,b,c}
LPL (nmol/FFA/mL/h)	2498 ± 1691 ^d	2749 ± 1405	3552 ± 1853 ^{e,d}	2770 ± 1666	2294 ± 973^e
CETP (%)	10 ± 7	11 ± 8	10 ± 6	10 ± 7 ⁱ	16 ± 8ⁱ
PLTP (%)	19 ± 11	18 ± 10	17 ± 12	19 ± 11	14 ± 10

Data as average ± sd (n); All hyper-A (All); moderate hyper-A (M)=HDL-C ≥ 68 and ≤ 80mg/dL; high hyper-A (H) = HDL-C ≥ 81 and ≤ 90mg/dL;very-high hyper-A (VH) =HDL-C ≥91 and ≤ 211mg/dL and controls (CTL) = HDL-C >30 and <68mg/dL; Mann-Whitney after *ANCOVA* adjusted for sex, age and alcohol use. p≤0.05=significant differences and 0.05<p>0.10= borderline differences; after Bonferroni's correction. CTL≠H: (a) p=0.064, CTL≠VH: (b) p≤0.064; CTL≠All: (c) p≤0.008; M#VH: (d) p=0.008; VH#CTL: (e) p≤0.020; ALL#CTL: (i) p≤0.024.

According to table 2, CETP and HL activities were reduced in all hyper-A, and LPL was higher in very-high than both controls and moderated groups. Only all hyper-A presented lower HL activity than controls. High and very-high groups tended (borderline values) to have a lower HL activity when compared with the control group.

The CETP activity was lowering in all hyper-A, and no differences were found for PLTP activity.

The LPL activity (nmol/FFA/mL/h) was reduced in moderate when compared with very-high, and was high in very-high when compared with controls. All hyper-A also had lower LPL activity than controls.

TABLE 3– PROINFLAMMATORY FACTORS AND ATHEROSCLEROSIS MANIFESTATIONS IN INDIVIDUALS WITH DIFFERENT GRADES OF HYPERALPHALIPOPROTEINEMIA – ALL (HYPER-A) AND CONTROLS

GROUPS	HYPER- A				CTL
Parameters	Moderate (30-77)	High (28-52)	Very-High (11-26)	All (70-155)	(30-68)
hsCRP (mg/L)	0.44 ± 0.55	0.32 ± 0.39	0.41 ± 0.68	0.39 ± 0.52	0.34±0.59
TNF-α (pg/mL)	11 ± 12	11± 12	14 ± 14	11 ± 12	10 ± 10
Ab ox LDL (OD)	0.34± 0.16	0.42 ± 0.16	0.40 ± 0.23	0.38 ± 0.18	0.31± 0.17
Mean cIMT (mm)	0.88 ± 0.24	0.86 ± 0.22	0.72 ± 0.14	0.86 ± 0.23	0.63 ± 0.13
CAD % (n)	6.85(73)	7.69(52)	3.85(26)	6.62(151)	8.57(35)
Stroke% (n)	2.74(73)	3.85(52)	0.00(26)	2.65(151)	0.00(62)

Data as average $\pm$ sd (n); All hyper-A (All); moderate hyper-A (M)=HDL-C $\geq$ 68 and $\leq$ 80mg/dL; high hyper-A (H) = HDL-C $\geq$ 81 and $\leq$ 90mg/dL;very-high hyper-A (VH) =HDL-C $\geq$ 91 and $\leq$ 211mg/dL and controls (CTL) = HDL-C $>$ 30 and $<$ 68mg/dL; Mann-Whitney after ANCOVA adjusted for sex, age and alcohol use; Kruskal-Wallis and Dunn post-hoc tests; Chi-square test. No differences were found after Bonferroni's correction.

All this findings lead to equal carotid IMT, frequencies of coronary heart disease (CAD) and stroke in hyper-A and controls (see table 3). Surprisingly, no differences were found in inflammatory factors, but a significant inverse correlation between TNF- α and LPL activities, suggesting a protective antiinflammatory action of the lipase (see figure below).

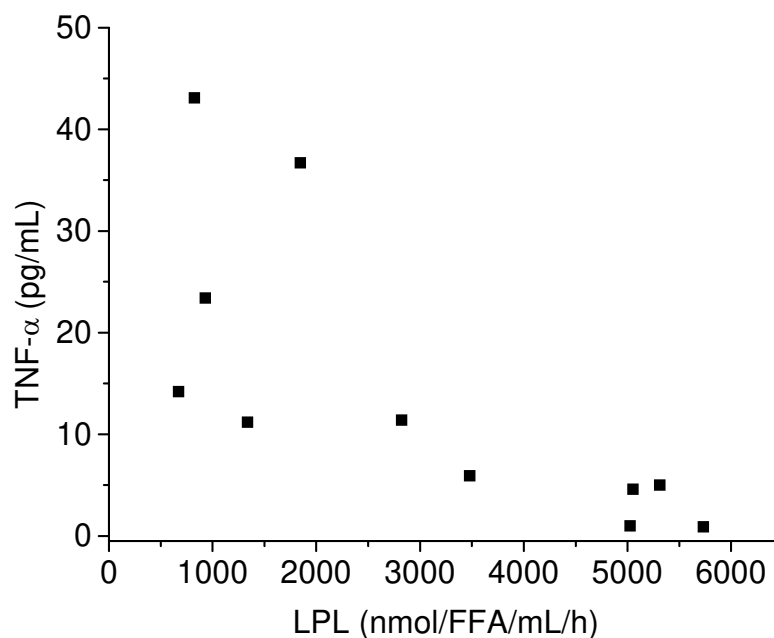


Figure 1 – **SPEARMAN'S CORRELATION FOR LPL VS TNF- α IN VERY- HIGH HYPER-A.** LPL activity inversely correlates with TNF- α concentration in very-high hyper-A. **n= 11, r = - 0.92, p= 0.0156**

Discussion

The HDL- C elevation is a hard target for cardiovascular disease prevention and control; however, the HDL functionality is another very important aspect to be searched for.

Pirro et al., despite their small population sample, attempted for the first time to the possible association of primary high levels of HDL-C and a well-known marker of coronary risk, the C-reactive protein. They found in hyper-A lower levels of CRP hiper-A subjects, defined by 95th percentile cutoffs of HDL-C (>80 mg/dL men and >90 mg/dL women); no HDL subfractions were measured.³⁹

In this study, we did not find differences in proinflammatory factors (CPR, TNF- α , and ab-oxLDL) in individuals with different grades of hyper-A and controls. In addition, our total sample (n=223) CPR did not correlate with different grades of HDL, TNF- α or ab-oxLDL. Both TNF- α and CRP, among other proatherogenic pathways at cellular levels, could increase the RNAm expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) with central action on uptake of oxidized LDL and endothelial dysfunction.⁴⁰ It is known that HDL can block proinflammatory mechanisms, such as the adhesion molecule expression induced *in vitro* by TNF- α .¹⁷ This action has been associated with the interruption of the sphingosine kinase signaling pathway .¹⁸

Furthermore, HDL is capable of binding to CRP, which is considered an “antiinflammatory action” of this lipoprotein. In our study, the higher HDL-C concentration did not coexist with reduced circulating CRP levels. We hypothesized that this lipoprotein would not be capable of binding to CPR because of its different chemical composition. Another possibility would be that this “antiinflammatory” action cited before could be limited to high oxidative stress conditions, since the HDL phospholipids are responsible for the binding and would need to suffer oxidative modification for CRP bind to HDL.²¹

We found an inverse correlation between TNF- α and LPL activities in very-high hyper-A. This finding corroborates a recent publication that attributes an antiinflammatory function for LPL. Another study showed that in mice LPL was capable to

reduce the release of VCAM-1 by TNF- α and TG in endothelial cells; this fact may be related to free fat acids released by this lipase. It is interesting to observe that only the very-high group had high levels of HDL₃TG, coexisting with right LPL activity.

Hirano et al. (1997) published an important epidemiological study, in which a U curve for protection offered by HDL was used in Japanese subjects presenting with CETP deficiency; when the HDL-C concentrations were equal or above 70mg/dL cardiovascular risk raised.⁴¹ Conversely, subjects of our sample who had highest HDL-C concentration (very-high group) did not present higher incidence of CAD, stroke or early atherosclerosis than controls or other grades of HDL. This contrast may be in part explained by the fact that in our sample, in opposite to Hirano, hyper-A did not show a marked CETP reduction.

We previously found in a pioneer Brazilian study in hyper-A that the intrinsic antioxidant activity was lower in hyper-A. These individuals, similarly to the high and very-high groups, exhibited a lower HL activity when compared with controls, and this may be in part justified by the hyper-A condition, with mean 79mg/dL of plasma HDL-C.⁴² Despite the condition not being associated with increased atherosclerosis, the previous study suggested a functional relationship between systemic oxidative stress and lower grade of susceptibility of LDL to oxidation in the presence of HDL subfractions. This fraction had reduced intrinsic antioxidant activity and exhibited higher TG content in five subfractions (2a, 2b, 3a, 3b and 3c) when compared with controls.⁴²

We concluded that hyper-A, analyzed in different degrees of HDL concentration, is not capable of reducing circulating proinflammatory factors. However, a higher LPL activity in very-high ((HDL-C $\geq$ 91 to $\leq$ 211mg/dL), with higher TG content in HDL₃ subfraction may be protective against atherosclerosis, because it is inversely correlated with TNF- α concentration.

Further investigations on HDL composition and functionality may add new targets for the development of therapies to increase HDL cholesterol and or prevent atherosclerosis.

Acknowledgements

This work, originated from a Master's thesis by CECN, was supported in part by grants from the State of São Paulo Research Foundation (Fapesp), Teaching and Research Support Foundation (Faep), and Coordination for Higher Level Graduates Improvement (Capes), Brazil. The excellent technical and clinical assistance provided by Mirian Danelon and Aparecida de Sousa is recognized, as well as the support from Dr Edna Nakandakare and the Laboratory of Lipids – Medical School of the University of São Paulo, and Helymar Machado, for his statistical analyses.

References

1. Ikonomidis I, Stamatelopoulos K, Lekakis J, Vamvakou GD, Th Kremastinos D. Inflammatory and non-invasive vascular markers: The multimarker approach for risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2008. Article In Press.
2. Abbot RD, Wilson PWF, Kannel WB, Castelli WP. High Density Lipoprotein Cholesterol, Total Cholesterol Screening, and Myocardial Infarction. The Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1988; 8: 207-211.
3. Gordon DJ, Rifkind BM. High density lipoprotein: The clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*.1989; 321: 1311-1316,1989.
4. Barter PJ, Rye KA: High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis*.1996;121: 1-12.
5. Wilson PW, Abbott RD and Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study.*Arterioscler Thromb Vasc.Biol*. 1988; 8: 737-741.
6. Sviridov D, Mukhamedova N, Remaley AT, Chin-Dusting J, Nestel P. Antiatherogenic Functionality of High Density Lipoprotein: How Much versus How Good. *Jounal of Atherosclerosis and Thrombosis*.2008; 15(2): 52-62.
7. Kontush A ; Chapman M J ; Functionaly Defective Hight-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation,and Atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 342-374.
8. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman A M. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95 (8):764-772.
9. Ansell VJ. The two faces of the ‘good’ cholesterol.*Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2007; 74 (10): 697-705.

10. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M. Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003; 107: 499-511.
11. Dehnavi RA, de Roos A, Rabelink TJ, van Pelt J, Wensink MJ, Romijn JA, Tamsma JT. Elevated CRP levels are associated with increased carotid atherosclerosis independent of visceral obesity. *Atherosclerosis*. 2008. In Press.
12. Ridker PM. Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection. *Circulation*. 2003; 107: 363-369.
13. Bischoff RJ, Kastelein JJP, Stroes ESG. C-reactive protein and atherogenesis: From fatty streak to clinical event. *Atherosclerosis*. 2007. In Press.
14. Abbas AK, Lichtman AH. Effector Mechanisms of Immune Responses in Abbas AK, Lichtman AH. 5th edition. Philadelphia: Saunders; 2003. p.241-274
15. Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor- α and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *European Heart Journal*. 2002; 23: 376-383.
16. Gokulakrishnan K, Deepa R, Mohan V. Association of high sensitivity C-Reactive Protein [hsCRP] and Tumour Necrosis Factor- α [TNF- α] with carotid Intimal Medial Thickness in subjects with different grades of glucose intolerance—The Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-31). *Clinical Biochemistry*. 2008; 41: 480-485.
17. Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, Miller NE, Oral B, Nithyanathan S, Taylor G, Haskard DO. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 910–917.

18. Xia P, Vadas MA, Rye KA, Barter PJ, Gamble JR. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem*. 1999; 274: 33143–33147.
19. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards C K, Roux-Lombard P, Burger D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood*. 2001; 15; 97(8): 2381-9.
20. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*. 2007; 117: 746–756.
21. Wadham C, Albanese N, Roberts J, Wang L, Bagley CJ, Gamble JR, et al. High-Density Lipoproteins Neutralize C-Reactive Protein Proinflammatory Activity. *Circulation*. 2004;109: 2116-2122.
22. Norata GD, Marchesi P, Pirillo A, Uboldi P, Chiesa G, Maina V. Long Pentraxin 3, a Key Component of Innate Immunity, Is Modulated by High-Density Lipoproteins in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 925-931.
23. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB Journal* 2001; 15: 2073-2084.
24. Tsouli SG, Kiortsis DN, Xydis V, Argyropoulou MI, Elisaf M, Tselepis AD. Antibodies Against Various Forms of Mildly Oxidized Low-Density Lipoprotein Are Not Associated With Carotid Intima-Media Thickness in Patients With Primary Hyperlipidemia. *Angiology* 2006; 57(5):615-22.
25. Ziouzenkova O, Perrey S, Asatryan L, Huang J, MacNaul KL, Moller DE, et al. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: Evidence for an anti-inflammatory role for lipoprotein lipase. *PNAS*. 2003; 100(5): 2730-2735.

26. Rifai N, Warnick GR, Mc Namara JR, Belcher JD, Grinstead GF, Frantz Jr ID. Measurement of low-density lipoprotein cholesterol in serum : a status report Clin Chem.1992;38:150-60
27. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. Clinical Chemistry. 1972 ; 18(6):499-502.
28. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T et al. Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum with Polyethylene Glycol-Modified Enzymes and Sulfated α -Cyclo-dextrin. Clin Chem. 1995;41:717–723.
29. Eyre J, Hammett F, Miller NE. A micro-method for the rapid ultracentrifugal separation of human plasma high density lipoprotein subfractions, HDL₂ and HDL₃. Clinica Chimica Acta. 1980; 114: 225-231.
30. Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. Methods Enzymol. 1986;129:716-738.
31. 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.
32. Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer of [¹⁴C] phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. Biochim Biophys Acta. 1982; 712: 444 –52.
33. Eda S, Kaufmann J, Roos W, Pohl S. Development of a New Microparticle-Enhanced Turbidimetric Assay for C-Reactive Protein With Superior Features in Analytical Sensitivity and Dynamic Range. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 1998; 12: 137-144.
34. Price CP, Trull AK, Berry D, Gorman EG. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C- reactive protein. Journal of Immunological Methods. 1987; 99: 205-211.

35. Grassi J, Roberge CJ, Frobert Y. Determination of IL1 α , IL1 β and IL2 in Biological media using specific enzyme immunometric assays. *Immunol Rev.* 1991; 119: 125-142.
36. Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with vários degrees of oxidative modifications .*Braz J Med Res.* 1996; 29:1625-28.
37. Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(5):1245-9.
38. Simons PCG, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common Carotid Intima-Media Thickness and Arterial Stiffness:Indicators of Cardiovascular Risk in High-Risk Patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation.* 1999; 100:951-7.
39. Pirro M, Siepi D, Lupattelli G, Roscini AR, Schillaci G, Gemelli F. Plasma C-Reactive Protein in Subjects With Hypo/Hyperalphalipoproteinemias. *Metabolism.* 2003; 52(4):432-436
40. Li L, Roumeliotis N, Sawamura T, Renier G. C- Reactive Protein Enhances LOX-1 Expression in Human Aortic Endothelial Cells. Relevance of LOX-1 to C-Reactive Protein-Induced Endothelial Dysfunction. *Circ Res.* 2004; 95: 01-07.
41. Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, et al. Genetic Cholesteryl Ester Transfer Protein Deficiency Is Extremely Frequent in the Omagari Area of Japan . Marked Hyperalphalipoproteinemia Caused by CETP Gene Mutation Is Not Associated With Longevity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1997;17:1053-1059.
42. Kontush A., de Faria E. C., Chantepie S. AND Chapman J. Antioxidative Activity of HDL Particle Subspecies Is Impaired in Hyperalphalipoproteinemia: Relevance of Enzymatic and Physicochemical Properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 526-533.

5- DISCUSSÃO GERAL

Na literatura recente, diversos autores alertam para a necessidade de se observar a funcionalidade da HDL (Kontush e Chapman, 2006; Ansell, 2007; Sviridov et al., 2008).

Achados prévios de estudos conduzidos em nosso laboratório em colaboração ao “Pavillon Benjamin Delessert, Hôpital de la Pitié” Paris, França, sobre a HIPER-A brasileira, relatam a redução da atividade antioxidante intrínseca de sub-frações da HDL, concomitante ao maior conteúdo de TG em cinco subclasses da HDL (2a, 2b, 3a, 3b e 3c) (Kontush et al., 2004).

No entanto, ao que temos conhecimento, apenas um estudo usou o modelo HIPER-A para verificar a influência de elevadas concentrações de HDL em um marcador inflamatório.

Considerando o modelo HIPER-A promissor, em virtude da vigorosa “corrida” em busca do aumento do HDL-colesterol iniciada na última década, no presente trabalho foram avaliados três fatores pró-inflamatórios na HIPER-A (PCR, TNF- α e acLDLox).

A despeito de seu pequeno número amostral, Pirro et al. (2003), pela primeira vez na literatura, atentam para a possível ação da HDL sobre a inflamação em indivíduos portadores de hiperalfalipoproteinemia (HIPER-A). Nesse estudo em que os indivíduos foram caracterizados por concentrações de HDL-colesterol iguais ou maiores que 80 mg/dL (homens) ou maior do que 90 mg/dL (mulheres), ambos acima do percentil 95º da população, foram encontradas menores concentrações de usPCR quando comparados aos controles de HDL-colesterol médio igual a 48mg/dL (Pirro et al., 2003).

A amostra populacional de indivíduos HIPER-A neste estudo, de maneira diversa à população estudada por Pirro, mostrou ausência de proteção contra a inflamação, sem diferenças nas concentrações da usPCR entre estes e o controle. Além disso, também as concentrações de TNF- α e os títulos de acLDLox foram iguais entre os grupos.

Ao avaliar-se estatisticamente a “distância” entre os indivíduos da amostra, observou-se a formação de um agrupamento exclusivamente constituído de indivíduos HIPER-A; esses indivíduos encontram-se nos dois quartis mais elevados para usPCR e acLDLox e num quartil intermediário para o TNF- α , indicando, mais uma vez, a ausência

de proteção contra a inflamação. Tem sido sugerido que as concentrações de TNF- α podem correlacionar-se positivamente com a idade, o sexo feminino, a pressão sanguínea, o colesterol sérico, o percentual de gordura, o uso de tabaco e negativamente com a atividade física (Sites et al., 2002; Skoog et al., 2002; Ho et al., 2005). No presente estudo, tanto a maior idade quanto o sexo feminino podem ter influenciado a presença destes indivíduos nos quartis mais elevados para o TNF- α .

Portanto, para esta amostra, os diferentes graus de hiperalfalipoproteinemia (diferentes concentrações de HDL) não influenciaram as concentrações dos fatores pró-inflamatórios circulantes analisados. Por outro lado, tanto o TNF- α quanto a PCR podem agir localmente através de vários caminhos pró-aterogênicos, como por exemplo, aumentando a expressão do receptor de LDLox “lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1” (LOX-1) com uma ação central no aumento da captação de LDLox e da disfunção endotelial (Li et al., 2004).

Wadham et al. (2004) sugeriram que a HDL possui a capacidade de se ligar à PCR, fato esse que, segundo o autor, consiste em uma ação antiinflamatória. No presente estudo, o provável maior número de partículas de HDL, característico da HIPER-A, não ocasiona a redução das concentrações da PCR na circulação. Podemos supor que a diferente composição desta partícula resultaria na incapacidade da HDL de se ligar à PCR. Por outro lado, esta “função antiinflamatória” poderia estar restrita a condições de elevado estresse oxidativo, uma vez que para tal ligação os fosfolípides da HDL devem estar oxidados (Wadham et al., 2004).

Adicionalmente a HDL pode “bloquear” mecanismos próinflamatórios como, por exemplo, a expressão de moléculas de adesão induzidas pelo TNF- α *in vitro* (Cokerill et al., 1995). Essa ação da HDL parece estar relacionada com a interrupção do caminho de sinalização da esfingosina kinase “sph kinase” (Xia et al., 1999).

Contudo, a PCR, o TNF- α e os acLDLox, não se correlacionaram ao EIM de carótidas neste estudo. Considerando esse fato, foi demonstrado em estudo anterior que diferentes regiões da carótida (ex: carótida comum ou interna) podem apresentar diferentes correlações com fatores inflamatórios (Thakore et al., 2007).

Surpreendentemente, observamos no presente estudo uma forte correlação negativa ($r = -0.92$, $p = 0.0156$, $n = 11$), apesar do pequeno número de indivíduos, entre o TNF- α e a atividade da LPL no grupo muito alto.

É sabido que o TNF- α é capaz de estimular a superprodução hepática de apoB100 em camundongos (Quin et al., 2008) e de bloquear o PPAR γ , fortemente envolvido no metabolismo de lípidos (Ye, 2008). De forma contrária, a LPL foi recentemente implicada na proteção contra a inflamação. Sua atuação antiinflamatória, nesse estudo, consistiu em reduzir a liberação de VCAM-1 induzida por TNF- α e TG em células endoteliais de camundongos. O autor sugere que essa ação deve estar relacionada à liberação de ácidos graxos livres a partir de lipoproteínas ricas em TG, gerando assim, ligantes de PPAR (Ziouzenkova et al. 2003). É interessante notar que no presente estudo somente o subgrupo muito alto apresentou elevada atividade da LPL e se inclui no grupo HIPER-A total com aumentado HDL₃-TG.

Investigações adicionais sobre a HDL, sua composição, tamanho, funcionalidade e seus mecanismos de ação na saúde e na doença, em especial na aterosclerose, poderão levar a um maior conhecimento da regulação de seu potencial antiinflamatório, portanto antiaterogênico, e a novos alvos para o desenvolvimento de terapias que tenham como objetivo elevar o colesterol de HDL. Este trabalho reitera que a ação biológica da HDL é tão importante quanto sua concentração, o que torna mais complexa sua relação com a proteção cardiovascular.

6- CONCLUSÃO GERAL

- 1- O estado de HIPER-A foi caracterizado bioquimicamente pela redução da atividade sérica da LH e da CETP e o aumento da atividade da LPL e da concentração de ApoAI, com maior conteúdo de colesterol nas subfrações 2 e 3 da HDL;
- 2- A HIPER-A, em diferentes graus, não determinou proteção antiinflamatória (medidas de proteína C-reativa, TNF- α e anticorpos anti-LDL oxidada séricos) ou menor espessamento da camada íntima média de carótidas. Ao contrário, o conglomerado de HIPER-A indicou uma distribuição em faixas pró-inflamatórias para os três fatores estudados.
- 3- Uma interessante correlação de caráter antiinflamatório entre a LPL e o TNF- α foi detectada apenas no subgrupo HIPER-A muito alto, com elevada atividade de LPL, sugerindo maior hidrólise da HDL₃ rica em TG.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. Effector Mechanisms of Immune Responses in Abbas AK, Lichtman AH. 5th edition. Philadelphia: Saunders; 2003.p.241-274.

Abbot RD, Wilson PWF, Kannel WB, Castelli WP. High Density Lipoprotein Cholesterol, Total Cholesterol Screening, and Myocardial Infarction. The Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1988; 8: 207-211.

Abramson JL, Lewis C, Murrah NV, Anderson GT, Vaccarino V. Relation of C-Reactive Protein and Tumor Necrosis Factor-Alpha to Ambulatory Blood Pressure Variability In Healthy Adults. *Am J Cardiol* 2006; 98 (5): 649-652.

Alarcon SBK. Fatores moduladores do metabolismo de lipoproteínas de alta densidade: estudo em indivíduos com hiperalfalipoproteinemia e controles. [Dissertação – mestrado] Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2002.

Ansell VJ. The two faces of the “good” cholesterol. 2007.*Cleveland Clinic Journal of Medicine*;74(10): 697-705.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95(8):764-772.

Barter PJ, Rye KA: High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996;121: 1-12.

Bisoendial RJ, Kastelein JJP, Stroes ESG. C-reactive protein and atherogenesis: From fatty streak to clinical event. *Atherosclerosis* 2007. In Press.

Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Biachi R and Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and Histopathology* 2008; 23: 381-390.

Burger D, Dayer JM. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev* 2002; 1:111–117.

Castelli W P, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA* 1986; 256: 2835-38.

Cazita P, Barbeiro DF, Moretti AIS, Quintão ECR, Soriano FG. Human Cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: A novel role of CETP. *Shock* 2008. In Press.

Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX, Sharret AR, Shahar E, Nieto FJ, et al. Carotid Wall Thickness is Predictive of Incident Clinical Stroke. The atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 2000;151:478-87.

Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(20):13043-8.

Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, Miller NE, Oral B, Nithyanathan S, Taylor G, Haskard DO. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;19:910-917

Corella D, Guillen M, Portoles O, Sabater A, Cortina S, Folch J, Saiz C. Apolipoprotein E gene polymorphism and risk of hypercholesterolemia: a case control study in a working population of Valencia. *Med Clin (Barc)* 2000; 115(5):170-5.

Crouse JR, Raichlen JS, Riley WA. Effect of Rosuvastatin on Progression of Carotid Intima-Media Thickness in Low-Risk Individuals With Subclinical Atherosclerosis: The METEOR Trial. *Jama* 2007;297(12):1344-53.

Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer of [¹⁴C] phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta* 1982; 712: 444 -52.

de Hann W, Vries-van der Weij J, van der Hoorn JWA, Gautier T, van der Hoogt CC, Westerterp M. Torcetrapib Does Not Reduce Atherosclerosis Beyond Atorvastatin and Induces More Proinflammatory Lesions Than Atorvastatin. *Circulation* 2008;117: 2515-2522.

Eda S, Kaufmann J, Roos W, Pohl S. Development of a New Microparticle-Enhanced Turbidimetric Assay for C-Reactive Protein With Superior Features in Analytical Sensitivity and Dynamic Range. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1998;12:137-144.

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

Eyre J, Hammett F, Miller NE. A micro-method for the rapid ultracentrifugal separation of human plasma high density lipoprotein subfractions, HDL2 and HDL3. *Clinica Chimica Acta* 1980; 114: 225-231.

Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; 18(6):499-502.

Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Res* 1996; 29:1625-28.

Gokulakrishnan K, Deepa R, MohanV. Association of high sensitivity C-Reactive Protein [hsCRP] and TumourNecrosis Factor- α [TNF- α] with carotid Intimal Medial Thickness in subjects with different grades of glucose intolerance_The Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-31). *Clinical Biochemistry* 2008; 41: 480-485.

Gomaschi M, Basilico N, Sisto F, Taramelli D, Eligini S, Colli S, Sirtori CR, Franceschini G, and Calabresi L. High-density lipoproteins attenuate interleukin- 6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli. *Biochim Biophys Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 2005; 1736:136–143.

González M, Ruiz-Ros JA, Pérez-Paredes M, Lozano ML, García-Almagro FJ, González JJ, Ureña I, Vicente V. Valor pronóstico del factor de necrosis tumoral alfa en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60(12):1233-41.

Gordon DJ, Rifkind BM. High density lipoprotein: The clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989; 321: 1311-1316,1989.

Gotlieb AI. Vasos sangüíneos. In: Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Schwarting R, Strayer D. Rubin Patologia. Bases clinicopatológicas da Medicina; 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.495-502.

Grassi J, Roberge CJ, Frobert Y. Determination of IL1 α , IL1 β and IL2 in Biological media using specific enzyme immunometric assays. *Immunol Rev* 1991; 119: 125-142.

Hasham SN, Pillarisetti S. Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. *Clínica Chimica Acta* 2006; 372:179-183.

Heuten H, Goovaerts I, Ennekens G, Vrints C. Carotid artery intima-media thickness is associated with coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2008; 63 (3): 309-313.

Higuchi, ML, Ramires JA. Infecção e aterosclerose. Disponível em: <http://educacao.cardiol.br/pec/aterosclerose/fasciculos/2002a1f2m1/art04.htm>. Acessado em: 12 de outubro de 2006.

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):1849-56.

Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, et al. Genetic Cholesteryl Ester Transfer Protein Deficiency Is Extremely Frequent in the Omagari Area of Japan . Marked Hyperalphalipoproteinemia Caused by CETP Gene Mutation Is Not Associated With Longevity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997;17:1053-1059.

Ho GYF, Xuea X, Burkb RD, Kaplana RC, Cornelle E, Cushman M. Variability of serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6, and soluble interleukin 6 receptor over 2 years in young women. *Cytokine* 2005; 30: 1- 6.

Hulthe J, Fagerberg B. Circulating Oxidized LDL Is Associated With Subclinical Atherosclerosis Development and Inflammatory Cytokines(AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1162-67.

Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards C K, Roux-Lombard P, Burger D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood*.2001;15;97(8):2381-9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Análise da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos e do Estado Nutricional no Brasil 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/analisis.pdf> . Acesso em: 22 de setembro de 2008.

Ishigami M, Yamashita S, Sakai N, Arai T, Hirano K, Hiraoka H, Kameda-Takemura K, Matsuzawa Y. Large and cholesteryl ester-rich high-density lipoproteins in cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency can not protect macrophages from cholesterol accumulation induced by acetylated low-density lipoproteins. *J Biochem* 1994; 116 (2):257-62.

Joy , Hegele RA. Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nature* 2008; 7: 143-155.

Kaplan DB, Schreiber R, Oliveira HCF, Harada LM, Nakamura RT, Pineiro HP, Tentor J, Cruz MLY, de Faria EC. Cholesteryl ester transfer protein gene mutations in Brazilian Hyperalphalipoproteinemia. *Clin Genet* 2006; 69: 4555-457.

Kapur NK, Ashen D, Blumenthal RS. High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease. *Vascular Health and Risk Management* 2008; 4(1): 39-57.

Kent JW Jr, Comuzzie AG, Mahaney MC, Almasy L, Rainwater DL, VandeBerg JL, MacCluer JW, and Blangero J. Intercellular adhesion molecule-1 concentration is genetically correlated with insulin resistance, obesity, and HDL concentration in Mexican Americans. *Diabetes* 2004; 53:2691–95.

Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman J. Antioxidative Activity of HDL Particle Subspecies Is Impaired in Hyperalphalipoproteinemia: Relevance of Enzymatic and Physicochemical Properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 526-33.

Kontush A, Chapman MJ. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 342-74

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.

Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2003; 14:421-430.

Li L, Roumeliotis N, Sawamura T, Renier G. C- Reactive Protein Enhances LOX-1 Expression in Human Aortic Endothelial Cells. Relevance of LOX-1 to C-Reactive Protein-Induced Endothelial Dysfunction. *Circ Res* 2004; 95: 000-000.

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

Lorenz MW, Karbstein P, Markus HS, Sitzer M. High-Sensitivity C-Reactive Protein Is Not Associated With Carotid Intima-Media Progression: The Carotid Atherosclerosis Progression Study. *Stroke* 2007; 38:1774-79.

Mackman N and Taubman MB. Does Tissue Factor Expression by Vascular Smooth Muscle Cells Provide a Link Between C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:601-603.

Mahley RW, Weisgraber KH, Farese Jr. RV. Disorders of Lipid Metabolism In: Willians RH. *Willians Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders 2003; 10 edition. 1642-1691.

Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in Innate Immunity: From C-Reactive Protein to the Long Pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 2008; 28: 1-13.

Matsuzawa Y, Yamashita S, Kameda K, Kubo M, Tarui S, Hara I. Marked Hyper- HDL₂ – Colesterolemia Associated with Premature Corneal Opacity . A Case report. *Atherosclerosis* 1984; 53: 207-212.

Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB Journal* 2001; 15: 2073-2084.

Ministério da Saúde. Anuário Estatístico de Saúde 2001. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001/index.cfm> Acessado em: 22 de setembro de 2008.

Ministério da Saúde. Indicadores e Dados Básicos Brasil 2007 – IDB2007,Brasil. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2007/d27c.htm>. Acesso em: 22 de setembro de 2008.

Nagano M, Shizuya Yamashita, Ken-ichi Hirano, Mayumi Takano, Takao Maruyama, Mitsuaki Ishihara, Yukiko Sagehashi, Takeshi Kujiraoka, Kazuya Tanaka, Hiroaki Hattori, Naohiko Sakai, Norimichi Nakajima, Tohru Egashira and Yuji Matsuzawa. Molecular Mechanisms of Cholesteryl Ester Transfer Protein Deficiency in Japanese. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2004;11(3): 110-121.

Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004; 45:993–1007.

Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000a; 41: 1481– 494.

Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized LDL: Steps 2 & 3. *J Lipid Res* 2000b; 41:1495–508.

Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW , Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC , Laks H. Monocyte Transmigration Induced by Modification of Low Density Lipoprotein in Cocultures of Human Aortic Wall Cells Is due to Induction of Monocyte Chemotactic Protein 1 Synthesis and Is Abolished by High Density Lipoprotein. *J Clin Invest* 1991; 88: 2039-46.

Nicholls SJ, Cutri B, Worthley SG, Kee P, Rye K-A, Bao S, and Barter PJ. Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005a; 25: 2416-421.

Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, Rye KA, and Barter PJ. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* 2005b; 111:1543-550.

Nofer J-R, Assman G. Atheroprotective Effects of High-Density Lipoprotein-Associated Lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 265-271.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M. Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.

Pirro M, Siepi D, Lupattelli G, Roscini AR, Schillaci G, Gemelli F, et al. Plasma C-Reactive Protein in Subjects With Hypo/Hyperalphalipoproteinemias. *Metabolism* 2003; 52 (4):432-436.

Price CP, Trull AK, Berry D, Gorman EG. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C- reactive protein. *Journal of Immunological Methods* 1987; 99: 205-211.

Qin B, Anderson RA, Adeli K. Tumor necrosis factor- α directly stimulates the overproduction of hepatic apolipoprotein B100-containing VLDL via impairment of hepatic insulin signaling *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:1120-1129.

Rader DJ, Ikewaki K. Unravelling high density lipoprotein-apolipoprotein metabolism in human mutants and animal models 1996;7(3):117-23.

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of Tumor Necrosis Factor- α and Increased Risk of Recurrent Coronary Events After Myocardial Infarction for the Cholesterol And Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 2000;101:2149-2153.

Rifai N, Warnick GR . Lipids, Lipoproteins, and other Cardiovascular Risk Factors In: Tietz, NW. *Tietz textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. St Louis: Saunders; 2006.p.903-981.

Rifai N, Warnick GR, Mc Namara JR, Belcher JD, Grinstead GF, Frantz Jr ID. Measurement of low-density lipoprotein cholesterol in serum: a status report.*Clin Chem* 1992;38: 150-60.

Roest M, Van Himbergen TM, Barendrecht AB, Peeters PHM, Van der Schouw YT, Voorbij HAM. Genetic and environmental determinants of the PON-1 phenotype. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37 (3) :187-196.

Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991;11(5):1245-9.

Sich D, Sa'idi 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*, v.147,n. 8 :965-973,1998.

Singh U, Devaraj S, Vasquez-Vivar J, Jialal I. C- reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. C- reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *J Mol Cell Cardiol* 2007; In Press.

Simons PCG, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common Carotid Intima-Media Thickness and Arterial Stiffness: Indicators of Cardiovascular Risk in High-Risk Patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). Circulation 1999; 100:951-7.

Sites CK, Toth MJ, Cushman M, L'Hommedieu GD, Tchernof A, Tracy RP et al. Menopause-related differences in inflammation markers and their relationship to body fat distribution and insulin-stimulated glucose disposal. Fertility and Sterility 2002; 77, (1): 128-35.

Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund- Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor- α and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. European Heart Journal 2002; 23:376-383.

Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 2007; 88 (I): 2 – 19.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus. Diretrizes SBD 2007: 11- 14.

Stern S. Are We Getting Nearer to Screening for Atherosclerosis? Circulation 2008; 117: 122-126.

Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. J Lipid Mediators Cell Signalling 1996; 13 : 73-88

Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T et al. Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum with Polyethylene Glycol-Modified Enzymes and Sulfated β - Cyclo-dextrin. Clin Chem 1995;41:717–723.

Sviridov D, Mukhamedova N, Remaley AT, Chin-Dusting J, Nestel P. Antiatherogenic Functionality of High Density Lipoprotein: How Much *versus* How Good. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 2008;15 (2): 52-62.

Thakore AH, Guo CY, Larson MG, Corey D, Wang TJ, Vasan RS, D'Agostino RB, Lipinska I, Keaney Jr. JF, Benjamin EJ, O'Donnell CJ. Association of Multiple Inflammatory Markers with Carotid Intimal Medial Thickness and Stenosis (from the Framingham Heart Study) *Am J Cardiol* 2007; 99:1598-1602.

Theilmeier G, De Geest B, Van Veldhoven PP, Stengel D, Michiels C, Lox M, Landeloos M, Chapman MJ, Ninio E, Collen D, et al. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE_{-/-} mice. *FASEB J* 2000; 14: 2032–2039.

Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, et al. Association of Cholesteryl Ester Transfer Protein Genotypes With CETP Mass and Activity, Lipid Levels, and Coronary Risk. *JAMA* 2008; 299(23): 2777-2788.

Tsouli SG, Kiortsis DN, Xydis V, Argyropoulou MI, Elisaf M, Tselepis AD. Antibodies Against Various Forms of Mildly Oxidized Low-Density Lipoprotein Are Not Associated With Carotid Intima-Media Thickness in Patients With Primary Hyperlipidemia. *Angiology* 2006; 57(5):615-22.

van der Steeg WA, Hovingh GK, Klerkx AHM, Hutten BA, Nootenboom IC, Levels JHM. Cholesteryl ester transfer protein and hyperalphalipoproteinemia in Caucasians. *Journal of Lipid Research*. 2007; 48: 674–682.

von Eckardstein A, Nofer JR, Assman, G. High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis: Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2001; 21:13-27,

Wadham C, Albanese N, Roberts J, Wang L, Bagley CJ, Gamble JR, et al. High-Density Lipoproteins Neutralize C-Reactive Protein Proinflammatory Activity. *Circulation* 2004;109:2116-2122

Wang J, Qiang H, Chen D, Zhang C, Zhuang Y. CETP gene mutation (D442G) increases low-density lipoprotein particle size in patients with coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 2002; 322 (1-2): 85-90.

Weissberg, PL. Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart* 2000; 83: 247–252.

World Health Organization. Prevention of Cardiovascular Disease Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk 2007. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/Full%20text.pdf . Acesso em: 22 de setembro de 2008.

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,

Yamashita S, Kuga Y, Hirano K, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, et al. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl Ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 1995; 115 (11):1849-56.

Ye J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 374: 405-408.

Xia P, Vadas MA, Rye KA, Barter PJ, Gamble JR. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem* 1999;274: 33143–33147.

Ziouzenkova O, Perrey S, Asatryan L, Huang J, MacNaul KL, Moller DE, et al. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: Evidence for an anti-inflammatory role for lipoprotein lipase. *PNAS* 2003; 100(5): 2730-2735.