

SAMIRA BORGES KAUSS ALARCON

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas da aluna **Samira Borges Kauss Alarcon**.

Campinas, 22 de janeiro de 2002.

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria
Orientadora 

***FATORES MODULADORES DO METABOLISMO DE
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE: ESTUDO EM
INDIVÍDUOS COM HIPERALFALIPOPROTEINEMIA E
CONTROLES***

CAMPINAS

2002

Samira Borges Kauss Alarcon

**FATORES MODULADORES DO METABOLISMO DE
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE: ESTUDO EM
INDIVÍDUOS COM HIPERALFALIPOPROTEINEMIA E
CONTROLES**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências Médicas,
Área de Concentração: Ciências Biomédicas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria
Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP, Brasil – 2002**

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	UNICAMP
	AL12f
V	
16	48774
16	837102
	D 17
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/06/02
Nº CPD	

CM00167124-1

BIB ID 239212

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

AL12f

Alarcon, Samira Borges Kauss

Fatores moduladores do metabolismo de lipoproteínas de alta densidade: Estudo em indivíduos com hiperalfalipoproteinemia e controles / Samira Borges Kauss Alarcon. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Eliana Cotta de Faria

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lipases. 2. Metabolismo. I. Eliana Cotta de Faria. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Banca examinadora da tese de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

Membros:

1. Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

2. Profa. Dra. Helena F. Coutinho

3. Profa. Dra. Lila Nina Harada

**Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de
concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data:

*Aos meus pais,
orgulho e exemplos da minha vida, pelo amor e apoio em
todas as horas;*

*Às minhas filhas Luiza e Gabriela,
razões da minha existência, pelo companheirismo, amor e
amizade;*

*Ao meu Amor Allan,
pela paciência, compreensão, incentivo e carinho;*

*À Deus,
que me amparou nos momentos mais difíceis e sem Ele
nada seria possível.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Eliana, por aceitar-me como aluna e dar-me apoio e incentivo sempre.

Às colegas de laboratório agradeço pela colaboração em meu amadurecimento.

À Águeda, Miriam, Edilma e Lila, agradeço pelo carinho e empenho em me ensinar todas as técnicas.

À Aparecida pela dedicação, disposição e boa vontade sempre.

À Vera pelo trabalho inicial e força nas correções.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que de certa forma colaboraram para o término deste projeto.

*“Quem tem um amigo, mesmo que um só,
Não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão;
poderá morrer de saudade,
Mas não estará só!”
(Amyr Klink)*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1. Metabolismo das Lipoproteínas Plasmáticas	
1.2. Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) e Aterogênese	
1.3.1. Fatores Moduladores Não Genéticos do Metabolismo de HDL	
1.3.2. Fatores Moduladores Genéticos do Metabolismo de HDL	
1.4. Hiperalfalipoproteinemia	
2. OBJETIVOS.....	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1. Protocolo Experimental	
3.2. Análises Laboratoriais	
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS INTRODUÇÃO.....	60
5. RESULTADOS.....	79
5.1. Trabalho Científico	
5.2. Conclusões Gerais	
5.3. Referências Bibliográficas do Trabalho Científico	

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA 1 - Proteína transportadora cassete ligante de ATP - *ATP-Binding*

Cassette Transporter A-1

AG - Ácidos Graxos

AGL - Ácidos Graxos livres

Apo - Apolipoproteínas

AVC - Acidente vascular cerebral

BPI - Proteína bactericida de aumento da permeabilidade - *bactericidal permeability-increasing protein*

CE - Ésteres de colesterol

CL - Colesterol livre

Col - Colesterol

Col-T - Colesterol total

DAC - Doença arterial coronariana

DM - Diabetes mellitus

Gli - Glicemia

HA - Hipertensão arterial

HALP - Hiperalfalipoproteinemia

HDL - Lipoproteínas de alta densidade – *High density lipoprotein*

HDL₂ - Lipoproteínas de alta densidade subfração 2

HDL₃ - Lipoproteínas de alta densidade subfração 3

IDL - Lipoproteínas de densidade intermediária – *intermediate density lipoprotein*

INT - Íntron

LBP - Proteína ligante de lipopolissacárides - *lipopolysaccharide-binding protein*

LCAT - lecitina: colesterol aciltransferase

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade – *Low density lipoprotein*

LDLr - Receptores de LDL

LH - Lipase hepática

Lp - Lipoproteínas

- Lp apo A-I - Lipoproteínas contendo apolipoproteína A-I
- Lp apo A-I:A-II - Lipoproteínas contendo apolipoproteínas A-I e A-II
- Lp(a) - Lipoproteína (a)
- LPL - Lipoproteína lipase
- LRP - Proteína relacionada ao receptor de LDL
- LSR - Receptor estimulado por lipólise
- LTIP - Proteína inibidora da transferência de lípidos - *lipid transfer inhibitor protein*
- MAC - Moléculas de adesão celular
- PL - Fosfolípidos
- PON - Paraoxonase
- PPAR - Receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor*
- PPD - Polianion-detergente detergente poliânion
- QM - Quilomícrons
- RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro
- SR-A - Receptores de varredura classe A , *Scavengers receptor A*
- SR-BI - Receptores de varredura classe B tipo I, *Scavengers receptor B - I*
- TG - Triglicérides
- TRC - Transporte reverso de colesterol
- TRH - Terapia de reposição hormonal
- VLDL - Lipoproteínas de densidade muito baixa – *very low density lipoprotein*

RESUMO

Inúmeros estudos epidemiológicos demonstram uma forte associação inversa entre os níveis plasmáticos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e a doença coronariana aterosclerótica. Portanto o metabolismo de HDL tem sido amplamente estudado.

Avaliamos fatores que modulam o metabolismo plasmático de HDL em indivíduos adultos que apresentam hiperalfalipoproteinemia moderada, definidos pelo seu nível de HDL-colesterol como igual ou acima do valor percentil 90 de uma população local analisada (n=1700), ou seja 68mg/dL. As lipoproteínas plasmáticas e as principais sub-frações de HDL (HDL₂ e HDL₃-col e Tg) e as atividades das proteínas de transferência de lípidos e das enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas foram determinadas.

Quantificou-se as frequências de doença cardiovascular e de fatores de risco para esta - dislipidemia, hipertensão arterial, tabagismo e história familiar positiva para doença arterial coronariana precoce, bem como as frequências de fatores moduladores tais como idade, sexo, raça, consumo de álcool, a obesidade, a atividade física, a presença de menopausa e uso de hormônios na mulher.

Os indivíduos deste estudo apresentaram o seguinte fenótipo sérico: aumento de colesterol total e de colesterol de HDL₂ e HDL₃, aumento de apo A-I e discreto aumento de LDL-colesterol. A atividade da lipoproteína lipase (LPL) foi 35% mais alta (3444 ± 255 , n=43 X 5301 ± 317 , n=43; em controles e HALP, respectivamente) e a da lipase hepática (HL) 40% menor no grupo HALP (2370 ± 231 , n=43 X 1410 ± 103 , n=43; em controles e HALP, respectivamente). As atividades da proteína de

transferência de fosfolípidos (PLTP) e proteína de transferência de colesterol éster (CETP) foram similares em ambos os grupos.

Em relação à presença de doença arterial coronariana e risco para esta, os grupos apresentaram frequências semelhantes. A frequência de atividade física foi mais alta no HALP. A regressão linear múltipla foi usada para avaliar o impacto das proteínas reguladoras sobre a HDL e suas sub-frações e dos fatores moduladores sobre estas proteínas.

No HALP, HDL-col associou-se com o IMC (inverso), LPL e apo A-I ; HDL₂-col foi explicado pela apo A-I e LPL e o HDL₃-col associou-se com apo A-I e idade (inverso). A terapia de reposição hormonal explicou apo A-I e o uso de álcool, obesidade e álcool/obesidade (inverso), explicaram a atividade da LPL. A CETP foi influenciada pela raça (não branco) e a PLTP pela idade (inverso). A atividade física, menopausa e o uso de contraceptivo oral na mulher não explicaram as atividades das proteínas reguladoras.

A modulação parcial das proteínas reguladoras sugere importante componente genético no metabolismo da HDL, em pacientes portadores de hiperalfalipoproteinemia moderada. Sugere-se que o fenótipo descrito não tenha caráter aterogênico.

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas

Devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso, os lípides são transportados no plasma sob a forma de lipoproteínas (Lp). Estas partículas são macroagregados constituídos por lípides apolares, triglicérides (TG) e ésteres de colesterol (CE), circundados por uma monocamada hidrofílica de colesterol livre (CL), fosfolípidos (PL) e apolipoproteínas (apo). Estas últimas, além da função estrutural, são responsáveis pela interação das Lp com os receptores celulares em diferentes sítios de metabolização e pela ativação de enzimas envolvidas no metabolismo das Lp. Temos como exemplo, apo A-I e A-II que são cofatores positivo e negativo, respectivamente, para a lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) (Brewer *et al*, 1988; Brown *et al*, 1986; Mahley *et al*, 1998).

As Lp podem ser classificadas segundo um padrão eletroforético distinto ou segundo a densidade apresentada à ultracentrifugação em: quilomícrons (QM, $d < 0,95$ g/mL), Lp de densidade muito baixa (VLDL, $d < 1,006$ g/mL), Lp de densidade intermediária (IDL, $d = 1,006$ a $1,019$ g/mL), Lp de densidade baixa (LDL, $d = 1,019$ a $1,063$ g/mL) e Lp de alta densidade (HDL, $d = 1,063$ a $1,21$ g/mL) (Havel *et al*, 1975; Ordovas e Carmena, 1999; Quintão, 1995; Mahley *et al*, 1998).

Os quilomícrons (QM) são partículas esféricas com 750 a 6000 Å de diâmetro, constituídas principalmente por TG provenientes da dieta e caracterizados pela presença da apoB-48. Os QM são sintetizados nos enterócitos, secretados para o espaço intersticial e conduzidos pela linfa à circulação sanguínea através do ducto torácico. Ao atingirem os capilares periféricos, sofrem hidrólise pela enzima lipoproteína lipase (LPL). Deste modo, os QM transformam-se em remanescentes e são rapidamente removidos do plasma (meia-vida de minutos) (Mortimer *et al*, 1995) por receptores hepáticos específicos: o receptor de LDL (LDLr) ou B-E, e a proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP). Os receptores de VLDL e o receptor estimulado por lipólise (LSR) também contribuem para esta remoção (Gotto *et al*, 1986; Bihain *et al*, 1995).

A LPL tem a apo C-II como cofator positivo. É sintetizada principalmente nos tecidos adiposo e muscular, atravessa a célula endotelial e se ancora na superfície da membrana plasmática em contato com a luz do vaso. Ao hidrolisar os TG das lipoproteínas, a LPL libera glicerol e ácidos graxos livres, que por sua vez, ligam-se à albumina e são transportados aos diversos tecidos, que os utilizam como substrato energético ou para a ressíntese de TG. Sob ação da LPL, os QM vão progressivamente perdendo massa de TG no interior da partícula, além de componentes de superfície tais como fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas (A-I, A-II, C-II, C-III, E) que se desprendem da partícula como estruturas lamelares dando origem às HDL imaturas.

Os receptores de LDL (LDLr), são proteínas que possuem 839 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 120 kDa. São sintetizados no retículo endoplasmático, e estão expressos nas superfícies de inúmeras células, principalmente nos hepatócitos (Mahley *et al*, 1998).

O receptor de LDL contém cinco domínios. O sítio de ligação com as Lp é constituído por 292 aminoácidos na porção amino-terminal. Esta região é rica em cisteína e contém glutamina e ácido aspártico, mediadores críticos para a ligação das apo B e E (Mahley *et al*, 1999). A função do LDLr é de captar lipoproteínas que contenham apo B e apo E, incluindo LDL, remanescentes de QM, VLDL, remanescentes de VLDL, IDL e HDL que possuem apo E (Mahley *et al*, 1999).

O LRP possui estrutura similar à dos receptores de LDL e atua como um receptor (de varredura) multifuncional, reconhecendo 30 ligações diferentes que representam muitas famílias de proteínas (Lp, proteinases, complexos proteinase-inibidor, toxinas de bactérias e várias proteínas intracelulares). Atua no metabolismo lipídico como ligante de remanescentes de QM e de lipase (Herz *et al*, 2001). O gene humano do LRP está localizado no braço longo do cromossomo 12 e é altamente expresso no fígado e nas células neuronais (Herz *et al*, 1988; Herz *et al*, 2001).

O receptor de VLDL (VLDLr) humano tem sido descrito como um novo membro da superfamília de LDLr, que especificamente se liga a VLDL, via apo E e

LPL. Tanto apo E como LPL estão presentes nos remanescentes de QM, e portanto, são descritos como ligantes fisiológicos do VLDLr (Niemeier *et al*, 1996).

O gene do VLDLr está localizado no braço curto do cromossomo 9, na região 24. Em sua forma madura, possui cerca de 846 aminoácidos, codificados por 19 exons com aproximadamente 40 kilobases. É altamente expresso nos tecidos cardíaco, muscular e adiposo (Oka *et al*, 1994). A organização dos exons-introns é quase idêntica a do gene do receptor de LDL, porém ele tem uma especificidade ligante e distribuição tecidual diferentes das do LDLr (Sakai *et al*, 1994).

O receptor estimulado pela lipólise (LSR) foi inicialmente descrito como um receptor específico para apo E, diferenciando-se do LDLr, que se liga tanto a apo E quanto a apo B (Bihain *et al*, 1995). Não está relacionado à família dos receptores de LDL. Possui características bioquímicas semelhantes a de todos os receptores de remanescentes de QM. O número de LSR expressos no fígado é inversamente proporcional aos níveis de TG pós-alimentares, indicando que atua decisivamente na remoção de lipoproteínas ricas em TG. Este receptor é ativado pelos ácidos graxos livres, produzidos durante a lipólise e inibido pela lactoferrina (Bihain *et al*, 1995; Khallou *et al*, 1995).

As VLDL, à semelhança dos quilomícrons, são partículas de grande diâmetro (300 a 700 Å) e ricas em TG. Diferem dos QM por serem sintetizadas no fígado e possuírem como principal constituinte protéico a apo B₁₀₀. No plasma, as VLDL são metabolizadas pela mesma via dos QM, ou seja, nos capilares onde seu conteúdo

em TG é hidrolisado pela enzima LPL, transformando-as progressivamente em remanescentes de VLDL e finalmente em IDL (Goldberg, 1996).

As IDL e os remanescentes de VLDL podem ser diretamente removidos da circulação no fígado pelos receptores B-E, LRP, receptor de VLDL e LSP (Niemeier, 1996; Havel, 1984). As IDL podem ser transformadas em LDL após a hidrólise quase completa dos TG pela lipase hepática (LH). Aproximadamente 50% destas partículas são convertidas em LDL (Havel, 1984).

As LDL são partículas de pequeno diâmetro (150 a 300 Å), pobres em TG, constituídas por uma molécula de apo B₁₀₀, e um núcleo composto essencialmente por CE (Havel, 1984). Possuem meia-vida plasmática de 2 a 5 dias, transportam a maior parte do colesterol plasmático e são preferencialmente captadas pelos receptores B-E expressos por células em processo ativo de divisão ou por tecidos que utilizam o colesterol como matéria-prima na síntese de hormônios (supra-renais e gônadas) ou sais biliares (fígado) (Brown *et al*, 1981; Brown *et al*, 1990; Goldstein *et al*, 1990; Mahley *et al*, 1998).

A homeostase do colesterol no organismo ocorre em função da concentração do colesterol intracelular (Mahley *et al*, 1998), quando esta aumenta ocorre:

- Inibição da transcrição do gene do receptor de LDL;
- Inibição da expressão de HMG-CoA redutase;
- Aumento da esterificação do CL no citoplasma

Pelo seu pequeno tamanho, as LDL, quando em grandes concentrações plasmáticas, atravessam facilmente a barreira endotelial e infiltram-se para o espaço sub-endotelial da parede vascular (Havel, 1984), ligando-se a proteoglicanos e fibras de colágeno. Neste local tornam-se mais susceptíveis a modificações químicas de seus componentes, tais como oxidação e glico-oxidação (Baynes *et al*, 1996).

As LDL modificadas estimulam células endoteliais a liberar fatores quimiotáticos positivos para células linfomonocitárias, que migram para este local transformando-se em macrófagos. Após essas modificações, as LDL passam a ser reconhecidas e fagocitadas pelos receptores de varredura dos macrófagos, SR-AI (*scavenger receptor type AI*) e SR-AII (*scavenger receptor type AII*), que não são regulados pelo aumento de colesterol intracelular. O acúmulo progressivo do colesterol intracelular leva então à transformação dessas células em células espumosas (*foam cells*), dando início à formação da lesão ateromatosa (Ordovas e Carmena, 1999; Mahley *et al*, 1998).

As HDL nascentes são partículas discoidais de pequeno diâmetro (50 a 60 Å), formadas principalmente por apo A-I, colesterol livre e fosfolípidos. Encontradas preferencialmente, na linfa e no interstício da parede dos vasos, migram eletroforeticamente na fração pré-beta (Fielding e Fielding, 1995). A HDL pode ser sub-fracionada em pré-beta 1, pré-beta 2 e pré-beta 3 (Havel *et al*, 1955). Na circulação, 85% das HDL tem migração alfa (da migração eletroforética) e correspondem à HDL₂, HDL_{3a} e HDL_{3b}.

Os principais componentes estruturais das HDL são as apolipoproteínas A-I e A-II, e são formadas no fígado, intestino (Forte *et al*, 1993; Ordovas e Carmena, 1999), além de originarem-se pela ação da LPL sobre os QM e as VLDL (Windler *et al*, 1980). As HDL podem ser separadas de acordo com sua composição apolipoproteica em partículas que contêm apenas apolipoproteína A-I (Lp apo A-I) e partículas que contêm apolipoproteínas A-I e A-II (Lp apo A-I: A-II) (Roheim *et al*, 1995).

1.2. Transporte Reverso de Colesterol:

Entende-se por transporte reverso de colesterol (TRC) a transferência de colesterol dos tecidos periféricos, inclusive da íntima arterial, para o fígado. A partir deste órgão, o colesterol pode ser reutilizado ou excretado na bile.

O TRC é um processo que tem início quando as pré-beta HDL interagem com as membranas celulares. A aquisição de colesterol pela HDL pode ocorrer por: transferência no meio aquoso ou transporte facilitado por proteínas de membrana. Todo o processo de maturação das HDL, desde a estrutura primordial composta essencialmente pela apo A-I, até a formação da partícula esférica de HDL₂, ocorre basicamente às custas desta captação do colesterol celular e de sua esterificação pela enzima lecitina:colesterol aciltransferase (Fielding e Fielding, 1995; Jonas, 1991; Silverman *et al*, 1993; Tall, 1990; Quintão, 1995; Von Eckardstein *et al*, 1998).

O transportador cassete ATP-ligante (ABCA1) foi identificado como o transportador chave para a etapa inicial do TRC (Singaraja *et al*, 2001; Vaisman *et*

et al, 2001). Trata-se de um membro da grande família de proteínas que transportam uma seleta variedade de moléculas, incluindo proteínas, lípides, íons e açúcares através das membranas (Dean *et al*, 2001; Vaisman *et al*, 2001). Possui na estrutura genética cerca de 2261 aminoácidos, codificados por aproximadamente 50 exons. Está expresso em diferentes tecidos, como o fígado, placenta, pulmões, adrenais e macrófagos e a sua regulação é feita pelos esteróides e AMP cíclico (Singaraja *et al*, 2001; Vaisman *et al*, 2001). Recentemente, foi demonstrado que um aumento na expressão de ABCA1 resulta em maior efluxo de colesterol em diversos tecidos, bem como uma elevação nos níveis de HDL associada a aumento nas apo A-I e apo A-II (Singaraja *et al*, 2001).

A enzima lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) é a responsável pela esterificação do colesterol no plasma, está presente principalmente na HDL e tem as apo A-I, C-I e A-IV como cofatores positivos (Fielding e Fielding, 1995; Jonas, 1991; Uboldi *et al*, 1996). À medida que se processa a esterificação de colesterol, as pré-beta HDL vão tornando-se progressivamente mais ricas em CE e fosfolípidos, transformando-se em partículas esféricas com 90 a 120 Å de diâmetro, chamadas de HDL₂ (Fielding e Fielding, 1995; Silverman *et al*, 1993; Tall, 1990). Após o processo de esterificação, as HDL₂ podem sofrer remodelação pela ação da CETP, havendo uma troca de CE principalmente destas, por TG das Lp contendo apo B. Estas Lp enriquecidas em CE podem ser captadas pelos receptores B-E do fígado, e por outro lado, as HDL ricas em TG sofrem ação da LH que hidrolisa os TG e PL destas

liberando apolipoproteínas para as pré-beta HDL e HDL₃. Além disso, pode ocorrer a captação da partícula inteira de HDL pelos hepatócitos.

Em síntese, o colesterol proveniente dos tecidos é transportado na HDL e pode chegar ao fígado de diversas formas :

Via indireta do TRC:

- Como remanescentes de partículas ricas em TG após terem recebido CE por transferência mediada pela CETP, captadas pelos receptores de LDL e LRP (Glomset, 1968; Lagrost, 1994; Quintão, 1995; Tall *et al*, 1995);

Via direta do TRC:

- Captação seletiva de CE de HDL através do receptor de varredura do tipo B 1, SR-BI (Acton *et al*, 1996; Landschultz *et al*, 1996);
- Nas HDL ricas em apo E, HDL₁ captadas pelos receptores de LDL (Mahley *et al*, 1998);
- Através da captação da partícula inteira de HDL (Mahley *et al*, 1998).

Aspectos bioquímicos e funcionais das enzimas, proteínas e apolipoproteínas que participam do transporte reverso de colesterol:

Apolipoproteína A-I (apo A-I):

É a principal apolipoproteína componente da HDL, e seu gene está localizado no braço longo do cromossomo 11, na posição 23. É formada por uma cadeia de

243 aminoácidos e sua síntese é predominantemente hepática e intestinal (Breslow *et al*, 1982).

A apo A-I liga-se ao SR-BI, liberando seletivamente colesterol de HDL para o fígado e tecidos esteroidogênicos. As moléculas de CE são transportadas através da membrana utilizando um canal aberto resultante da interação entre a HDL e o SR-BI (Segrest *et al*, 2000). A apo A-I também estimula o efluxo de colesterol das células periféricas, fornecendo substrato para a ação da LCAT (Novak *et al*, 1996) e suas concentrações são reguladas por fatores genéticos e ambientais (Ordovas e Carmena, 1999).

Alguns estudos epidemiológicos relacionam os baixos níveis de apo A-I e HDL com o risco de DAC aumentado (Novak *et al*, 1996; Ordovas e Carmena, 1999).

Apolipoproteína A-II (apo A-II):

O gene humano da apo A-II foi seqüenciado e mapeado no cromossomo 1, nas posições 21 a 23 (Moore *et al*, 1984; Oakey *et al*, 1992). Sua síntese é quase exclusivamente hepática, sendo que apenas 1% é intestinal.

As funções propostas para a apo A-II de ativação e inibição de LH e LCAT, respectivamente, ainda não foram confirmadas. Sabe-se que a apo A-II pode inibir a fosfolipase A2 (Mahley *et al*, 1984). Comparada com lipoproteínas que contêm apo A-I, as lipoproteínas que contêm apo A-I e A-II ligam-se menos às células e não são tão eficientes em promover o efluxo de colesterol (Kilsdonk *et al*, 1990). A apo A-II é considerada uma apolipoproteína pró-aterogênica.

Lecitina : Colesterol Aciltransferase (LCAT):

É uma enzima intimamente relacionada ao TRC. Seu gene, em humanos, está localizado no braço longo do cromossomo 16, na posição 22. É sintetizada pelo fígado e circula no plasma sob a forma de complexos com componentes da HDL. Atua na esterificação de colesterol livre, transferido das células periféricas para as partículas de HDL. Esta ação ocorre através da transferência de AG insaturados da posição 2 da lecitina para o colesterol livre, gerando ésteres de colesterol e lisolecitina, e requer como cofatores as apo A-I e apo D. A maior parte dos ésteres de colesterol presente no plasma é produzido através desta reação. Após a esterificação do colesterol, este é transferido da superfície para o núcleo das HDL.

Glomset, em 1968, foi o primeiro autor a propor que, gerando um gradiente de concentração de saída de colesterol livre dos tecidos periféricos para a HDL, a LCAT poderia facilitar o processo de TRC modulando consequentemente o desenvolvimento da aterosclerose. Atualmente alguns estudos confirmaram esta hipótese, pois a atividade da LCAT parece significativamente reduzida, 24 a 50% em relação a indivíduos controles, em pacientes com DAC angiograficamente documentada, e também sobreviventes de infarto agudo do miocárdio (Santamarina-Fojo *et al*, 2000). Porém, Wells *et al* (1996) descreveram haver uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos da atividade da LCAT e DAC severa, comprovada através de angiografia.

A LCAT modifica benéficamente o perfil dos lípides plasmáticos através do aumento da HDL e redução da LDL. A LCAT altera não apenas a composição, mas também a habilidade da HDL interagir com outras proteínas que estão envolvidas no seu metabolismo. Além disso, modula o metabolismo das Lp pró-aterogênicas que contêm apoB₁₀₀ através de alterações da fluidez da membrana, afetando o *pool* intracelular de colesterol, e indiretamente, mediando a transcrição do gene do receptor de LDL (Santamarina-Fojo *et al*, 2000).

Lipoproteína Lipase (LPL):

É uma enzima da super-família das lipases, que inclui a lipase hepática, lipase pancreática e lipase endotelial (Goldberg *et al*, 2001). A LPL possui cerca de 475 aminoácidos. Em humanos, o seu gene é codificado no braço curto cromossomo 8, na posição 22, e possui 10 exons (Kirchgessner *et al*, 1987; Wion *et al*, 1987). Os maiores sítios de síntese da LPL são os tecidos muscular, cardíaco, esquelético e adiposo (Goldberg *et al*, 2001).

A LPL controla as concentrações circulantes de todas as classes de Lp, sendo também responsável pela diferença de tamanho e composição das partículas dentro das classes de Lp. A hidrólise de triglicérides dos QM e VLDL é a sua ação mais conhecida, porém a LPL também participa da hidrólise de TG e PL de outras Lp circulantes, como convertendo as LDL ricas em TG em LDL pequenas e densas. Os TG das HDL também são substratos para a ação da LPL (Goldberg *et al*, 2001).

A transferência de lípidos de superfície dos QM para as HDL durante a lipólise, aumenta os lípidos nas HDL e estas, por sua vez, são catabolizadas mais lentamente. Por esta razão a atividade da LPL está positivamente correlacionada a concentração de HDL (Goldberg *et al*, 2001).

O papel da LPL na aterogênese ainda permanece controverso embora Mead Jr *et al* (1999) tenham relatado que a expressão de LPL em células da parede vascular, particularmente nos macrófagos, contribui para a formação de células espumosas e aterosclerose (Mead Jr *et al*, 1999).

A deficiência da LPL está relacionada a uma redução dos níveis de HDL-col e um perfil mais aterogênico, como descrito por Wittrup *et al* (1999) em uma meta análise de vinte e nove estudos. Esta condição estava associada à presença de mutações do gene da LPL, sendo que a mutação Ser447Terminal, que ocorre no domínio C do gene da LPL, estava relacionada a um pequeno aumento dos níveis da HDL-col e um perfil ateroprotetor.

Lipase Hepática (LH):

É uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 60 kDa, e na sua forma madura possui cerca de 476 aminoácidos (Dugi *et al*, 1997; Santamarina-Fojo *et al*, 1998). Possui dois domínios onde se encontram os sítios de ligação com a heparina: o C-terminal e o N-terminal (Connelly, 1999). Em humanos, a LH é codificada por um gene composto por 9 exons e 8 introns, presente no braço longo do cromossomo 15, nas regiões 21 a 23 (Connelly, 1999).

A LH é secretada pelo fígado e é transferida para os tecidos esteroidogênicos (Thuren, 2000). Participa ativamente do TRC, catalizando a hidrólise de TG e PL das HDL₂, gerando HDL₃ e pré-beta HDL (Ordovas e Carmena, 1999; Thuren *et al*, 2000; Mahley *et al*, 1998).

O papel da LH no processo anti-aterogênico é controverso. Zambon *et al* (1993), descreveram um aumento das subclasses aterogênicas de LDL em indivíduos normolipidêmicos com DAC e elevada atividade de LH. Aviram *et al* (1988) demonstraram a presença de LDL modificadas pela ação da LH, que alteram o domínio de ligação da apo B₁₀₀ ao receptor na superfície celular. Isto induziria um aumento na captação e acúmulo de colesterol nos macrófagos, resultando no aumento de colesterol na parede arterial. Por outro lado, em outros estudos, a LH é classificada como ateroprotetora, devido à presença de DAC prematura em pacientes com deficiência de LH (Dugi *et al*, 1997; Hirano *et al*, 1995; Santamarina-Fojo *et al*, 1998).

Proteína de Transferência de ésteres de colesterol (CETP):

É uma glicoproteína de alto peso molecular, hidrofóbica, termoestável e secretada na sua forma madura com 476 aminoácidos e com 4 sítios de N-glicosilação. Em humanos, é codificada por um gene composto por 16 exons, localizado no cromossomo 16 (região 16q12-21) (Agellon *et al*, 1990). Os órgãos que mais expressam RNAm para esta proteína são: fígado, baço, tecido adiposo, intestino delgado e as supra-renais (Jiang *et al*, 1991; Tall *et al*, 1995).

No plasma, apesar de formar complexos com LDL e VLDL, aproximadamente 75% da CETP encontram-se ligadas às partículas de HDL, notadamente as HDL menores (HDL₃) (Morton *et al*, 1985; Speijer *et al*, 1991; Tall, 1990). A formação do complexo CETP-lipoproteínas proporciona a transferência de lípidos neutros (CE e TG) entre os núcleos das lipoproteínas. À medida que transfere CE e TG entre as lipoproteínas plasmáticas, a CETP participa ativamente no processo de remodelamento destas partículas (Hayek *et al*, 1993; Inazu *et al*, 1994; Ikewaki *et al*, 1995; Teh *et al*, 1998). Os vetores resultantes de sua ação são as transferências de CE das HDL para as Lp contendo apo B e de TG no sentido inverso, numa troca equimolar.

Na deficiência de CETP, principalmente devida a causas genéticas, verifica-se um aumento nas concentrações e no tamanho das partículas de HDL (Hayek *et al*, 1993). Uma questão controversa é se a deficiência de CETP juntamente com altas concentrações de HDL seria ou não uma condição ateroprotetora. Contrariando as expectativas, um aumento de DAC tem sido encontrado em pacientes com mutações no gene de CETP (Zhong *et al*, 1996). Estudos clínicos familiares e populacionais sugerem que a deficiência de CETP quando associada a fatores que levam a uma redução dos níveis de HDL-col, tais como obesidade e sedentarismo, podem ser uma condição aterogênica (Inazu *et al*, 2000).

Proteína Inibidora da Transferência de Lípidos (LTIP) :

É uma glicoproteína ácida isolada no plasma, ligada exclusivamente a LDL, que atua inibindo a transferência de TG e CE para a LDL. Sua atividade plasmática associa-se negativamente à capacidade de transferência de lípidos entre VLDL e LDL e entre LDL e HDL. A adição de LTIP ao plasma provoca redução dose-dependente da participação da LDL nos eventos de transferência. Verificou-se que a LTIP aumenta a transferência de CE das HDL para as VLDL, tornando a HDL um substrato melhor para a ação da LCAT.

Populações com deficiência de LTIP não apresentam uma preferência da CETP pela HDL como doadora de CE, sugerindo que a LTIP seja um fator decisivo para esta condição. Até o momento não existem estudos sobre o seu papel na aterogênese (Morton *et al*, 2001).

Proteína de Transferência de Fosfolípidos (PLTP):

A PLTP pertence à família das proteínas de transferência de lípidos e ligantes de lipopolissacarídeos. A forma madura é composta por 476 aminoácidos e a sua análise seqüencial revelou uma homologia significativa com a CETP, a proteína ligante de lipopolissacarídeos (LBP) e com a proteína de aumento da permeabilidade bactericida (BPI) (Huuskonen *et al*, 2000). Hailman *et al* (1996) demonstraram que a PLTP também estaria envolvida com a ligação e transferência de lipopolissacarídeos entre as Lp, refletindo uma característica estrutural comum com as proteínas de sua família. O gene da PLTP humana está localizado no cromossomo 20 e possui em sua estrutura 16 exons (Albers *et al*, 1995).

Sua função principal é de transferir PL das Lp ricas em TG para as HDL durante a lipólise (Huuskonen *et al*, 2000; Albers *et al*, 1995; Tu *et al*, 1993). Esta transferência de PL é um importante passo no TRC. Hailman *et al* (1996) demonstraram que a PLTP também estaria envolvida com a ligação e transferência de lipopolissacárides entre as Lp, refletindo uma característica estrutural comum com as proteínas de sua família.

A PLTP está duplamente envolvida no TRC através da geração de pré-beta HDL, que são aceptoras iniciais de colesterol celular e α -HDL ricas em CE, as quais transportam colesterol para o fígado (Lagrost *et al*, 1996). Estudos *in vitro* demonstram o envolvimento da PLTP na atividade de transferência de CE pela CETP (Lagrost, 1994). A PLTP tem sido descrita apresentando propriedades antiaterogênicas, dentre as quais destacam-se o estímulo ao efluxo de colesterol (Huuskonen *et al*, 2000; Van Hapern *et al*, 2000; Wolfbauer *et al*, 2000).

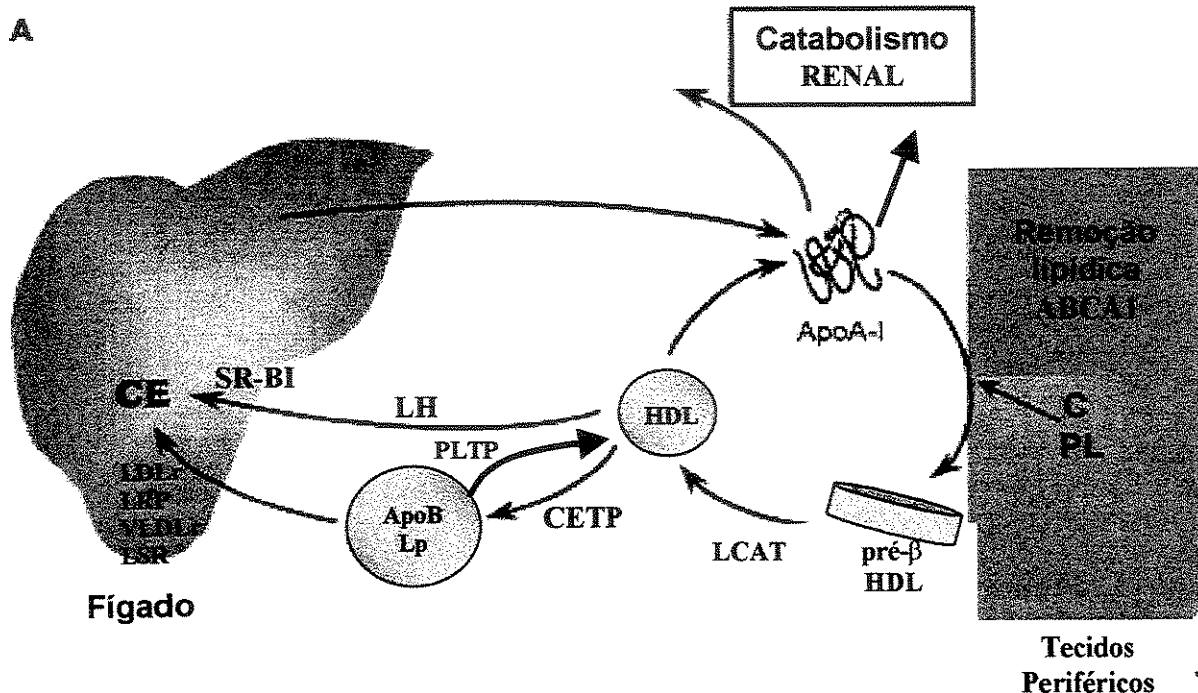
Figura 1 : Figura Esquemática do Transporte Reverso de Colesterol

Figura adaptada de Oram *et al*, J. Lipid Res, 26, 2001

1.3. Lipoproteínas de Alta Densidade e Aterosclerose:

A doença cardiovascular aterosclerótica é a maior causa de morte nos países industrializados, e tanto o aumento de LDL-col quanto a redução de HDL-col são importantes fatores de risco para esta (Fruchart *et al*, 1998). Os estudos populacionais realizados na segunda metade do século XX, como o desenvolvido na cidade norte-americana de Framingham (*Framingham Heart Study* - FHS), estabeleceram a associação positiva entre a colesterolemia e a doença

cardiovascular aterosclerótica (Gordon *et al*, 1989; Kannel *et al*, 1979). Posteriormente, este e outros estudos como o *Lipid Research Clinics Prevalence Mortality Follow-up Study* (LRCF), *Coronary Primary Prevention Trial* (CPPT) e *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (MRFIT) também demonstraram haver correlação positiva entre a aterosclerose e o colesterol contido na fração LDL, e a associação negativa com a concentração de colesterol da HDL (Grundy, 2001; Kannel *et al*, 1983).

Os estudos FHS, CPPT e MRFIT mostraram que um aumento de 1mg/dL nas concentrações de HDL-col levam a uma redução do risco de DAC em 2% nos homens e 3% nas mulheres. No LRCF essa queda foi de 3,7% para os homens e 4,7% para as mulheres (Gordon *et al*, 1989; Grundy, 2001).

Vários estudos prospectivos populacionais apontam as concentrações de HDL como o melhor fator preditivo de risco de DAC (Stampfer, 1991). Estudos de intervenção terapêutica, como o *Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial* (CCAIT) - aumento de 7,3% do HDL-col, *The Multicentre Anti-Ateroma Study* (MAAS) - aumento de 9% do HDL-col, *Regression Growth Statin Study* (REGRESS), *Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in Coronary Arteries* (PLAC I) - ambos com aumento de 7% do HDL-col; também reiteram o efeito protetor da HDL (Grundy, 2001). O Consenso do *National Institute of Health* (NIH) e *Adult Treatment Pannel* (ATP)-*National Cholesterol Education Program III* (NCEPIII), recomendam níveis de

HDL-col acima de 60mg/dL como meta ideal no tratamento de indivíduos com dislipidemias.

O principal mecanismo desta função antiaterogênica da HDL é o seu papel no TRC. Além disso, a HDL exerce ações pleotrópicas no metabolismo lipídico, a saber:

1) *Função antioxidante*: inibe a oxidação de LDL. A paraoxonase (PON), enzima associada à HDL, seria a responsável por esta propriedade (Stein *et al*, 1999). O efeito protetor se faz hidrolisando os fosfolípidos oxidados (Navab *et al*, 2001). A PON tem sido descrita em alguns estudos como um fator de risco de origem genética para a DAC. Em estudos com indivíduos caucasianos portadores de diabetes *mellitus* tipo 2, a alta atividade da PON correlacionou-se com a maior susceptibilidade para a DAC (Garin *et al*, 1997; Mackness, 1998 e 2001), bem como com a presença de polimorfismo da PON no códon 192 (Serrato *et al*, 1995). Recentemente foram descritos polimorfismos da PON contribuindo para o risco de DAC em indianos e asiáticos (Serrato *et al*, 1995), e resultados similares foram obtidos em pacientes japoneses. Nenhuma associação foi encontrada entre o polimorfismo G191A e o risco de DAC em finlandeses, assim como em chineses (Serrato *et al*, 1995).

2) *Ação anti-trombótica*: compõe-se de inibição da adesividade de plaquetas e eritrócitos, regulação da síntese de prostaglandinas e tromboxano, redução da viscosidade sanguínea, da atividade do fator tecidual e da atividade do inibidor do ativador de plasminogênio I (PAI-I). Estes mecanismos explicam em parte o efeito

atero-protetor da HDL (von Eckardstein *et al*, 2000; Stein *et al*, 1999; Cockerill *et al*, 1999; Garner, 1998).

3) *Inibidora da proliferação celular*: a HDL inibe a expressão de moléculas de adesão celular (MAC), de seletinas e a migração de monócitos para a região sub-endotelial da parede vascular (von Eckardstein *et al*, 2000).

1.4. Fatores Moduladores do Metabolismo de HDL:

A concentração plasmática de HDL é influenciada por fatores genéticos, ambientais e por diversas patologias. Estudos genéticos realizados em diferentes populações indicam uma grande contribuição destes fatores na variação dos níveis de HDL: 44% (Heller *et al*, 1993) , 83% (Perussi *et al*, 1997) e 65% (Steinmetz *et al*, 1992).

1.4.1. Fatores ambientais:

Álcool:

Desde que Cabot, em 1904, observou uma baixa incidência de lesões ateroscleróticas nas necrópsias de seus pacientes com história de alcoolismo, tem sido estudada a possibilidade do álcool ser um fator de proteção contra a doença aterosclerótica (Rakic *et al*, 1998). Posteriormente, a relação entre o consumo de álcool e a proteção contra a DAC foi descrita em vários estudos epidemiológicos,

cujo fato pôde ser atribuído a um aumento dos níveis de HDL-col (Bell *et al*, 2000; Leighton *et al*, 1997; Stein *et al*, 1999; Van Tol *et al*, 2001).

Rimm *et al* (1999), em uma meta-análise compreendendo 42 estudos, demonstraram que após o consumo médio de 30g/dia de etanol durante um período entre 1 a 9 semanas, ocasionou um aumento de HDL-col de cerca de 3,99 mg/dL.

Gaziano *et al* (1999) realizaram um estudo demonstrando um aumento de 16% nos níveis de HDL-col em indivíduos que faziam uso diário de álcool, e este não estava relacionado com o tipo de bebida ingerida (vinho - 10,8g de etanol / porção, licor - 15,1g de etanol / porção ou cerveja - 13,2g de etanol / porção) ingerida, e sim com a concentração do etanol nas bebidas alcoólicas. O etanol atua também sobre a fibrinólise, reatividade arterial coronariana e a função plaquetária.

Siler *et al* (1999) demonstraram que o álcool é metabolizado a acetato e apenas uma pequena fração deste é usada na síntese de-novo dos AG. O acetato é liberado na circulação e pode inibir toda a oxidação de lípidos e carboidratos. O mecanismo subjacente à correlação positiva entre o consumo de álcool e a concentração plasmática de HDL ainda é incerto. Alguns estudos apontam como causa uma redução das atividades de LPL e LH (Stein e Stein, 1999), enquanto outros mostram um aumento da atividade da LPL ou redução da atividade ou massa de CETP, levando a um retardo na transferência de CE para as Lp ricas em TG (Rakic *et al*, 1998). Outros mecanismos possíveis são os aumentos das atividades de LCAT e PLTP (van Tol *et al*, 2001).

A relação entre o aumento de HDL plasmático e atividade de CETP em alcoólatras foi relatada em dois estudos que demonstram quedas de 28% e 33% na atividade de CETP, sendo que neste último também foi observado um aumento de 25% na atividade de PLTP (Liinamaa *et al*, 1997; Savolainen *et al*, 1990).

van Tol *et al* (2001) descreveram um aumento do *turnover* de VLDL, o qual contribuiu para a formação de precursores de HDL, resultando na elevação das concentrações plasmáticas de HDL. Välimäki *et al* (1991) demonstraram haver uma elevação das concentrações de Lp apo A-I e Lp apo A-I:A-II em indivíduos que consumiram 60g de álcool/dia. Neste estudo, o aumento de HDL-col foi cerca de 15% , enquanto que no período de abstinência houve uma redução de 16%.

Parker *et al* (1996) realizaram um estudo demonstrando aumento de aproximadamente 16% nos níveis de HDL-col em mulheres que consumiram vinho, enquanto que nos homens não houveram alterações significativas nestes níveis. Entretanto, consumidores de licor e cerveja, mostraram uma associação positiva com o aumento de HDL-col para ambos os sexos (10% e 7% em homens e 16% e 8% nas mulheres para licor e cerveja, respectivamente). Estes resultados foram similares aos obtidos no *Thomson Heart Study*.

Atividade Física:

A atividade física está positivamente relacionada com as concentrações de HDL-col, como tem demonstrado alguns estudos (Gordon *et al*, 1998; Grandjean *et al*, 1996; HasKell *et al*, 1984; Thompson *et al*, 1991), enquanto o sedentarismo é

uma condição associada a baixos níveis de HDL-col (Ordovas e Carmena, 1999). Vários mecanismos estão descritos na literatura para explicar este aumento. Pode ser modulado pela CETP, LPL e LH (Gordon *et al*, 1998; Gupta *et al*, 1993; Seip *et al*, 1993; Zmuda *et al*, 1997).

Os ácidos graxos representam a maior fonte de energia durante a atividade física prolongada e as HDL recebem material de superfície em excesso, produzidos durante a lipólise das Lp ricas em TG. Segundo Carlson *et al* (1986), esta transferência pode retardar o catabolismo protéico, e deste modo, prolonga a meia-vida da HDL no plasma.

Thompson *et al* (1991), demonstraram que os níveis de HDL-col encontram-se aumentados e TG mais baixos em atletas, quando comparados a controles sedentários. Há uma queda do catabolismo de apolipoproteínas A-I e A-II das HDL, com conseqüente aumento no tempo de permanência destas no plasma, o que contribui para níveis mais altos de HDL nos atletas.

Gordon *et al* (1998) observaram um aumento de cerca de 12% nos níveis de HDL após a prática de exercício físico, seja em caminhada ou em bicicleta ergométrica. O possível mecanismo desta variação seria o aumento de cerca de 28% da atividade da LPL e redução de 19% na atividade da LH observado nas primeiras 24 horas após o início do exercício físico.

Zmuda *et al* (1997) demonstraram que após 12 meses de treinamento físico, indivíduos com baixa concentração de HDL-col (<40mg/dL), quando comparados

com indivíduos com HDL-col $\geq 45\text{mg/dL}$, apresentaram uma habilidade limitada em elevar os níveis desta Lp. Os resultados apontam um aumento de 27% nos níveis de HDL dos pacientes com HDL-col $\geq 45\text{mg/dL}$, enquanto que pacientes com HDL-col $< 40\text{mg/dL}$ não apresentaram aumento. No grupo com HDL-col $< 40\text{mg/dL}$, as atividades da LPL e LH estavam reduzidas em cerca de 11% e 8%, respectivamente; já no grupo com HDL-col $\geq 45\text{mg/dL}$, houve aumento de 27% na atividade de LPL e redução de 16% da LH.

Seip *et al* (1993) realizaram um estudo comparando os níveis de CETP entre indivíduos saudáveis e normolipidêmicos de ambos os sexos, submetidos a caminhada em esteira elétrica. O resultado mostrou um aumento significativo nos níveis de HDL-col, o qual foi acompanhado de queda na concentração de CETP para ambos os sexos.

Gupta *et al* (1993) observaram em atletas um aumento das atividades de LCAT e CETP, diminuição dos níveis de LDL-col e apo B₁₀₀ e também um incremento da remoção de colesterol livre em cultura de fibroblastos; porém não encontram diferenças nos níveis de HDL-col e apo A-I em relação aos controles.

Lehmann *et al* (1996) observaram em diabéticos do tipo 2 que a atividade física (caminhada ou bicicleta ergométrica), aumentou os níveis de HDL-col, HDL₂ e HDL₃, bem como atividades da LH, LPL e LCAT em relação ao período sem atividade física. Poirier *et al* (1994) também analisaram o impacto do exercício físico sobre a HDL em pacientes diabéticos do tipo 2, demonstrando o aumento de cerca

de 6% dos níveis de HDL-col, além de uma melhora de todos os parâmetros lipídicos séricos. O mecanismo deste aumento não foi descrito.

Suter *et al* (1997) compararam dois tipos de atividade física, a corrida praticada por 30 minutos e a caminhada praticada durante 60 minutos. Não houve mudanças significativas nos níveis de HDL-col para as duas atividades praticadas.

Crouse *et al* (2000) não observaram associação entre tempo de atividade física e variações nos lípides e apolipoproteínas de homens hipercolesterolemicos. Porém, a intensidade do treinamento pode estar relacionada com os aumentos de cerca de 70% do HDL₂-col nas oito semanas iniciais e 82% após 24 semanas, além da queda de 8 a 13% dos níveis de HDL₃-col nos mesmos períodos. Não foram esclarecidos os mecanismos moduladores neste estudo.

Dieta:

O consumo de dieta rica em ácidos graxos insaturados pode levar a um aumento das concentrações de HDL-col, possivelmente modulado pela redução na atividade da CETP, como demonstram alguns estudos (Lagrost *et al*, 1999; Jansen *et al*, 2000; Groener *et al*, 1991).

Lagrost *et al* (1992, 1999) realizaram estudo determinando a influência de diferentes tipos de AG na dieta, sobre os níveis de HDL-col. A concentração de HDL-col foi maior e a de CETP menor com a dieta rica em ácido láurico, quando comparada com dietas ricas em ácido palmítico ou oleico. Entre as dietas ricas em ácido palmítico e oleico não houve diferenças significativas (Lagrost *et al*, 1999).

A substituição isoenergética de dieta rica em ácidos graxos saturados por dieta rica em ácidos graxos monoinsaturados ou carboidratos, produz uma queda nos níveis de LDL-col e na atividade da CETP, resultando num aumento das concentrações de HDL-col, como demonstrado por Jansen *et al* (2000) e Groener *et al* (1991). Um possível mecanismo deste efeito seria o da regulação da CETP pelas concentrações plasmáticas de colesterol. *In vivo*, o aumento do conteúdo intracelular de colesterol no tecido adiposo humano aumenta a concentração de RNAm da CETP, aumentando sua secreção (Jansen *et al*, 2000).

É possível que a baixa concentração de AG saturados nas dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados possa diminuir o conteúdo intracelular de colesterol com paralela redução da atividade da CETP (Groener *et al*, 1991; Jansen *et al*, 2000)

Lyu *et al* (2000) fizeram uma análise de 440 indivíduos chineses com diferentes hábitos dietéticos, onde os homens apresentavam um maior consumo calórico de carboidratos, proteínas e gordura, além de colesterol e álcool. Este estudo mostrou a influência da dieta sobre as concentrações das Lp apo A-I e Lp apo A-I:A-II em homens e mulheres menopausadas. O sexo e a menopausa foram os principais determinantes da variação destas subclasses de HDL e também da distribuição da adiposidade corporal.

Sarjaz *et al* (2001) descreveram aumentos de 26%, 36% e 47% nos níveis de HDL-col em indivíduos que se submeteram a dietas com baixa concentração de

gordura, de gordura e carboidrato, e somente carboidrato, respectivamente, e sugeriram que tanto a dieta com redução de gordura quanto de carboidrato conferem aumento nos níveis de HDL.

O cafestol e *kahweol*, componentes do café, estão descritos em literatura como redutores dos níveis de HDL-col (van Tol *et al*, 1997). Roos *et al* (2000) analisaram a influência do consumo de 0,9 L por indivíduo de café em 24 semanas sobre as atividades das proteínas reguladoras do metabolismo de HDL, demonstrando um aumento nas atividades de CETP (média de 13%) e PLTP (média de 10%). A atividade da LCAT estava reduzida em cerca de 6% no mesmo período. Neste estudo o aumento da CETP antecedeu o aumento das concentrações de LDL. A redução da atividade da LCAT pode resultar na queda dos níveis de HDL-col, especialmente quando a atividade de CETP encontra-se aumentada.

Adiposidade:

O índice de massa corporal (IMC) está negativamente relacionado com a concentração de HDL-col e esta relação pode, em parte, ser atribuída à modulação da atividade da LH, que encontra-se elevada em indivíduos com IMC aumentado (Cohen, 1999).

Drogas:

Vários fármacos provocam alterações na concentração plasmática de HDL-col. Franceschini *et al* (1995) demonstraram que a fenitoína, um indutor enzimático microsomal, usada como anticonvulsivante ou hipnótico, aumenta o nível de HDL-

col. Esta ação é dose-dependente, pois o uso de doses de 100mg/dia e 300mg/dia produzem aumento nas concentrações plasmáticas de apo A-I em cerca de 7,7% e 10% e em HDL-col de 16% e 41%, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos à redução de 85% da atividade da CETP encontrada nestes pacientes.

O ácido nicotínico, fármaco pertencente ao grupo das vitaminas do complexo B, tem sido responsável por um efeito hipolipemiante independente de sua ação vitamínica, produzindo diminuição da síntese e redução significativa dos níveis de VLDL-col e LDL-col em doses farmacológicas, além de aumento importante dos níveis de HDL-col. Seu mecanismo de ação é explicado pelo efeito anti-adrenérgico no tecido adiposo que suprime a lipólise, restringindo ao fígado os ácidos graxos livres, principal substrato para a síntese de VLDL (Ordovas e Carmena, 1999).

Os fibratos são derivados do ácido clorofenoisobutírico (CPIB), e seu mecanismo de ação é mediado por receptores nucleares ativador e proliferador de peroxissomos (PPAR), alguns dos quais regulam a expressão de genes que interferem no metabolismo lipídico. Os fibratos estimulam o PPAR- α , que inibe a expressão gênica da apo C-III e aumentam a oxidação dos ácidos graxos, diminuindo o substrato para a síntese de TG. Também através do PPAR- α , os fibratos aumentam a atividade da LPL no tecido adiposo e muscular, e ativam a expressão hepática dos genes de apo A-I e apo A-II, estimulando sua síntese. Por outro lado, os alguns fibratos diminuem a atividade da CETP. Como o catabolismo de lipoproteínas ricas em TG encontra-se ativado, os componentes de superfície são

transferidos para a HDL, resultando num aumento da concentração de HDL-col. Alguns autores relatam um aumento de 10 a 20% nos níveis de HDL (Ordovas e Carmena, 1999).

As estatinas constituem um grupo de drogas hipolipemiantes que atuam no fígado, inibindo em uma etapa muito precoce e limitante da via metabólica a transformação da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) em mevalonato, catalisada pela enzima HMG-CoA redutase. Esta inibição deve-se ao fato das estatinas possuírem uma estrutura análoga a do HMG-CoA, competindo assim com este substrato. Esta competição ocorre de forma reversível, parcial, potente e dose-dependente (Ordovas e Carmena, 1999).

As estatinas reduzem o conteúdo hepático de colesterol, situação que ativa a síntese de receptores de LDL e aumenta sua depuração, trazendo como resultado a redução das concentrações plasmáticas de LDL (Ordovas e Carmena, 1999). O efeito da terapia com inibidores da HMG-CoA redutase no metabolismo lipídico pós-alimentar mostrou que o uso desta droga não altera os níveis de HDL-col de jejum, porém reduz a atividade da CETP em cerca de 13% (Contacos *et al*, 1998).

Hormônios:

Os estrógenos através da ação sobre LH, apo A-I e CETP aumentam a concentração de HDL-col, diminuindo seu catabolismo e aumentando sua produção (Brinton, 1996; Lewis *et al*, 2000). Também provocam uma redução dos níveis de LDL-col e VLDL-col em consequência à elevação do número de receptores a estas

lipoproteínas. Simultaneamente, inibem a oxidação das LDL na parede arterial e a vasoconstricção endotélio-dependente na área ateromatosa (Herrington *et al*, 2000; Reed *et al*, 2000).

Os estrógenos reduzem a atividade de LH em humanos, e flutuações no estrógeno endógeno decorrentes do ciclo menstrual normal foram associadas com mudanças na atividade da LH, sugerindo um papel regulatório deste hormônio. Este efeito redutor da atividade da LH pode gerar um aumento do HDL-col (Tikkanen *et al*, 1998).

A menopausa está associada ao aumento do risco de DAC. Sua atuação sobre os níveis de HDL-col não está bem definida, uma vez que existem estudos que relacionam esta condição a uma queda no HDL-col (Li *et al*, 1996; Chemnitius *et al*, 1998; Berg *et al*, 2001; Lekarsky, 2001), enquanto outros não mostram uma atuação significativa sob estes níveis (Peters *et al*, 1999; Torng *et al*, 2000; Gardner *et al*, 2000; Maynar *et al*, 2001). Aumentos da atividade de LH (Berg *et al*, 2001) e LPL (Urabe *et al*, 1996) foram descritos como supostos mecanismos envolvidos na menopausa.

A terapia de reposição hormonal (TRH), com combinação hormonal de razão estrógeno / progesterona alta eleva os níveis de HDL-col, ao contrário das combinações de baixa razão, que a reduzem (Lewis *et al*, 2000). Urabe *et al* (1996) mostraram que a terapia de reposição estrogênica leva à supressão da LH, sem afetar a LPL e aumenta o número de receptores hepáticos de LDL, com

conseqüente melhora do perfil lipídico. No estudo de Walsh *et al* (1999) com mulheres menopausadas em uso de TRH oral, foi descrito um aumento proporcional de 8% e 16% do HDL-col e apo A-I nas mulheres que a usaram 1mg/dia e 2 mg/dia de estradiol, respectivamente. As enzimas e proteínas que atuam no metabolismo da HDL não foram medidas.

Brinton (1996), descreveu um aumento de 36% dos níveis de HDL-col, 27% de apolipoproteína A-I e 17% da apolipoproteína A-II em mulheres pós-menopausadas que fizeram uso de 0,05mg/dia de estradiol durante um período de cinco semanas, sugerindo que a supressão da LH exerce um papel regulador do catabolismo da HDL. Por outro lado, a administração de andrógenos aumenta a atividade de LH (Tikkanen *et al*, 1998)

Com relação ao hormônio tireoidiano, a presença de hipotireoidismo é acompanhada de altos níveis de LDL-col e portanto, maior risco de doença aterosclerótica. Em contrapartida, no hipertireoidismo observamos uma queda nos níveis de LDL-col (Tan *et al*, 1998). O hormônio tireoidiano estimula a atividade do receptor de LDL. Modifica o transporte de HDL (Ritter *et al*, 1996) e também a atividade da LCAT (Tan *et al*, 1998).

No estudo de Tan *et al* (1998) foi demonstrado que o hormônio tireoidiano também atua na atividade da CETP, a qual encontra-se aumentada no hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo, porém Ritter *et al* (1996) não

demonstraram diferenças entre hiper e hipotireoidismo com relação à atividade de CETP.

Ness *et al* (1998), realizaram um estudo em ratos, demonstrando que tanto a terapia com hormônio tireoidiano, quanto à terapia com o tiromimético L-9490, levam a um aumento de HDL-col.

O uso constante de corticóides também pode levar a um aumento do HDL-col (Yamashita *et al*, 2000). Stein *et al* (1998) demonstraram aumento de 70% dos níveis de HDL-col em indivíduos com uso diário de dexametasona, modulado pela redução da atividade da CETP.

A presença de diabetes melitus está fortemente relacionada ao desenvolvimento de DAC prematura. Quando comparados a indivíduos controles os diabéticos apresentam uma incidência quatro vezes maior de DAC (Quintão *et al*, 2000). Tem-se descrito que o diabetes do tipo 2 está associado à redução dos níveis de HDL-col e aumento dos níveis de TG (Ordovas e Carmena, 1999), enquanto o uso de insulina leva a um aumento dos níveis de HDL-col e está relacionado à condição HALP (Yamashita *et al*, 2000).

1.4.2. Fatores genéticos:

Sexo e Idade:

Antes da puberdade, ambos os sexos têm níveis plasmáticos de HDL-col similares. Na segunda década de vida, os homens apresentam redução em cerca de 20% dos níveis (em relação à fase anterior) em função do aumento da secreção

de andrógenos, o qual está relacionado com o aumento da atividade da LH e queda dos níveis de HDL-col. Estes níveis permanecem constantes até a idade de 55 anos, (faixa de 45mg/dL), e um pequeno aumento pode ser observado após esta idade (faixa de 50 mg/dL). A mulher apresenta aumento dos níveis de HDL-col a partir da idade de 20 anos até os 65 anos, variando de uma média de 53 mg/dL para uma média de 65 mg/dL, após o qual há um leve decréscimo, caindo para cerca de 60mg/dL e mantendo-se estável até a 9ª e 10ª década de vida (Mahley *et al*, 1998; Neaton, 1992). A mulher geralmente apresenta valores cerca de 20% maior do que o homem em todas as faixas etárias, com exceção na infância (Mahley *et al*, 1998; Legatto, 2000).

Raça:

Os níveis de HDL-col parecem ser diferentes entre as raças. Sabe-se que a raça negra tem níveis de HDL-col mais elevados quando comparados à caucasiana. No entanto, parte desta diferença pode ser atribuída a alterações genéticas que modificam as estruturas das enzimas e/ou proteínas que modulam o metabolismo do HDL (Zoratti, 1998; Vega *et al*, 1998).

Apo A-I :

O componente genético das variações nos níveis de apo A-I é provavelmente poligênico. Um dos genes poderia ser o próprio gene estrutural da apo A-I (Ordovas e Carmena, 1999). A maioria dos estudos descreve que as concentrações de apo A-I são determinadas pelo seu catabolismo mais do que pela sua síntese, portanto, os

genes envolvidos no processo de metabolismo da partícula irão desempenhar um papel mais ativo na concentrações plasmáticas de HDL na população em geral. Foram descritas 2 mutações mais freqüentes no gene da apo A-I que levam à diminuição nos níveis de HDL e apo A-I. A mutação apo AI-Milano, descrita em uma família italiana, está associada à redução nos níveis de HDL e níveis elevados de TG. Os indivíduos afetados não apresentam sinais clínicos de DAC, assim como não há história familiar de aterosclerose (Ordovas e Carmena, 1999).

A deleção dos genes das apos A-I, C-III e A-IV que leva à hipertrigliceridemia, diminuição de HDL-col e diminuição da apo A-I (co-fator da LCAT), foi descrita em uma mulher de meia idade falecida durante cirurgia de revascularização do miocárdio (Ordovas e Carmena, 1999).

LCAT:

Foram descritas diferentes variantes genéticas associadas ao estado de deficiência de LCAT, cujas principais mutações são: T147A, M129I, A228L, I123T e P10L. Estas mutações parecem não estar relacionadas a um aumento no risco de aterosclerose, e os níveis de HDL-col e apo A-I estão reduzidos. Em geral a repercussão fenotípica é a deficiência da atividade da enzima, ou mesmo sua inativação total, levando a achado freqüente de opacificação corneana (Ordovas e Carmena, 1999).

LPL:

A atividade de LPL é diretamente proporcional à concentração plasmática de HDL-col. Cerca de 80 mutações foram descritas nos humanos, a maioria das quais são do tipo *missense* localizada nos exons 5 e 6. Algumas mutações acarretam uma deficiência da LPL com conseqüente aumento de TG, diminuição dos níveis de HDL-col e presença de DAC prematura (Goldberg *et al*, 2001).

As freqüências das mutações são diferentes nas populações. A mutação heterozigótica que leva a deficiência de LPL apresenta uma frequência de cerca de 3 a 7 %, dentre as quais a mais comum em algumas populações caucasianas é a Asn291Ser. Em população franco-canadense a ocorrência de mutação é cerca de 17%, sendo Pro207Leu, Gly188Glu e Asp250Asn as mais encontradas (Goldberg *et al*, 2001).

A mutação Ser447Stop leva a um aumento de cerca de 4% na atividade da LPL e aumento de 1,5 mg/dL de HDL-col . Em um estudo de meta-análise, Wittrup *et al* (1999) descreveram que a mutação Ser447Stop está relacionado a um perfil ateroprotetor.

LH:

A atividade plasmática de LH é inversamente proporcional a concentração plasmática de HDL-col (Hegele *et al*, 1993; Kuusi *et al*, 1989; Perussi *et al*, 1997), particularmente HDL₂-col (Santamarina-Fojo *et al*, 1998).

As variações na atividade de LH parecem ter caráter hereditário, e este fato sugere que as diferenças genéticas na atividade de LH aparecem como um

resultado de polimorfismos comuns na população. Foram identificados polimorfismos no gene da LH, sendo os principais: C514T, G250A, T710C, A763G e C480T (Santamarina-Fojo *et al*, 1998). Os polimorfismos de LH estão associados a uma redução na atividade de LH e conseqüente aumento de TG nas LDL e IDL, bem como aumento dos níveis de HDL e apolipoproteína A-I.(Santamarina-Fojo *et al*, 1998; Perussi *et al*, 1997; Niel *et al*, 1998).

A maior parte das mutações, além de afetarem a atividade da LH, prejudicam a síntese e secreção desta enzima. As principais mutações são do tipo *missense*, como a R186H no códon 186 do exon 5, com substituição da arginina pela histidina na proteína madura; a L334F no exon 5 e 7; a T383M e a S267F (Santamarina-Fojo *et al*, 1998).

O aumento na secreção ou atividade de LH está associado a uma redução dos níveis de HDL-col, como demonstram Zambon *et al* (1993), e esta condição também se relaciona a uma maior incidência de DAC.

CETP:

A deficiência genética da CETP foi caracterizada no fim da década de 80, em japoneses que apresentavam ausência da atividade plasmática de CETP acompanhada de aumento importante dos níveis de HDL. Brown *et al* (1989) foram os primeiros a identificar as bases desta deficiência. Os estudos sobre mutações do gene da CETP mostram que mesmo as poucas mutações prevalentes seriam

capazes de afetar os níveis de HDL em termos populacionais (Hirano *et al*, 1997; Inazu *et al*, 1990)

Hirano *et al* (1993) descreveram uma mutação no intron 14 em 171 hiperalfalipoproteinêmicos japoneses (3,5% homozigóticos e 28,1% heterozigóticos), com frequência alélica relativa de 0,049. Inazu *et al* (1990) também identificaram em 46 hiperalfalipoproteinêmicos, 10% homozigóticos e 20% heterozigóticos para esta mutação que foi inicialmente associada a maior longevidade, ausência de aterosclerose prematura em indivíduos com níveis de HDL 3 a 4 vezes o normal, ausência de CETP e LDL diminuída.

Sakai *et al* (1995) descreveram um estudo populacional avaliando outro tipo de mutação, desta vez localizada no exon 15, a D442G, utilizando como marcador Asp442Gly para o exon 16. Foram estudados 117 HALP japoneses, dos quais 2,5% eram homozigóticos e 29,1 % heterozigóticos, expressando uma frequência alélica relativa de 0,17. Como repercussão fenotípica desta mutação, foi evidenciado que os níveis de CETP estavam 37 a 62% menores que o normal em homozigóticos e a presença de um caso heterozigótico com aterosclerose.

A mutação no exon 6, a G181X descrita por Arai *et al* (1996) foi identificada a partir de 294 casos de HALP japoneses, onde 0,34 % expressos em homozigóticos e 1,36% heterozigóticos, sendo metade desses com mutação também no intron 14. Esses indivíduos apresentavam níveis de HDL₂ aumentados e CETP variando de

zero até 62% do valor controle. Neste estudo houve um caso homozigótico com AVC aos 67 anos.

As mutações no gene de CETP são mais freqüentes na população japonesa, porém foram encontrados em outras populações. Bruce *et al* (1998) descreveram uma mutação *missense* localizada no exon 14, a Ile405Val, com freqüência alélica de 0,3% em 491 germânicos e 0,4% em 573 sardezianos. Teh *et al* (1998) relataram a ocorrência de uma mutação no exon 9 (Arg268Stop) em um indivíduo homozigótico norte-americano que se encontrava assintomático e com níveis de TG aumentado, elevação de 3 vezes de HDL plasmático em relação ao valor recomendado e redução de 26% na concentração de CETP.

Zhong *et al* (1996) destacam a presença de mutações em população nipo-americana de Honolulu, sugerindo que a deficiência de CETP seria um risco independente para DAC em homens heterozigóticos com mutação D442G, podendo estar associada à mutação no intron 14A. Entretanto, em mulheres homozigóticas para a mutação no exon 14 (Ile405Val) que apresentam altos níveis de HDL-col (em torno de 170mg/mL) e ausência de reposição estrogênica, Angerholm-Larsen *et al* (2000) descreveram que há um aumento em 2 vezes que o risco para DAC.

1.5. Hiperalfalipoproteinemia:

A hiperalfalipoproteinemia é uma situação clínica caracterizada pelo aumento plasmático nos níveis de HDL-col, que pode ser definida arbitrariamente por valores de HDL-col iguais ou maiores que o percentil 90 para sexo e idade, obtido a partir de

uma determinada população adulta assim como por valores acima de 100mg/ dL (Sich *et al*, 1998A; Sich *et al*, 1998B; Hirano *et al*, 1995).

A HALP familiar foi inicialmente descrita por Glueck *et al* (1975), quando este determinou a presença desta condição em membros de uma família. A HALP neste caso, não foi secundária a qualquer patologia, uso de drogas, ou exposição a qualquer elemento industrial conhecido por elevar os níveis de HDL-col. Foi demonstrada sua transmissão vertical através de três gerações e os indivíduos afetados eram saudáveis, não apresentavam xantomias, ou quaisquer problemas físicos ou neurológicos tendo sido associada à síndrome da longevidade. Alguns indivíduos destas famílias apresentavam um aumento nas concentrações de colesterol, triglicérides, fosfolípidos da sub-fração HDL₂, enquanto a concentração de HDL₃ encontrava-se dentro dos valores de referência.

A HALP pode ser de origem primária ou secundária. Uma das causas mais importantes para a HALP primária é a deficiência da CETP, porém também encontram-se casos de deficiência da LH e casos de superprodução de apolipoproteína A-I (Yamashita *et al*, 2000).

Von Eckardstein *et al* (1991) descreveram um caso de HALP familiar com mutação heterozigótica de apo C-III (Lys58Gln), onde se observou a presença de partículas de HDL ricas em apo E, porém o mecanismo do aumento do HDL-col não foi esclarecido. Na hiperalfalipoproteinemia descrita por Hirano *et al* (1995),

observou-se uma associação de deficiência de CETP e LH levando ao aumento das concentrações de HDL-col.

A HALP secundária pode ser explicada por fatores moduladores dos níveis de HDL-col, tais como:

1. *Ambientais*: ingestão crônica de bebida alcoólica, prática constante de atividade física;
2. *Presença de doenças*:- cirrose biliar primária e/ou enfisema;
3. *Uso de drogas específicas*:- corticosteróides, insulinas, estrogênio, fibratos, estatinas e fenitoína (Yamashita *et al*, 2000).

Na hiperalfalipoproteinemia, a elevação do HDL-col atribuída à presença de cirrose biliar está restrita ao aumento da subfração HDL₂-col, e a massa e atividade da LH encontram-se diminuídas, enquanto a atividade e massa de CETP aumentadas nestes pacientes (Yamashita *et al*, 2000).

A aterogenicidade da HALP é uma questão controversa, pois pode depender da etiologia, da presença ou ausência de outros fatores de risco e também da eficiência do TRC (Yamashita *et al* , 2000). Porém, concentrações elevadas de HDL-col não estariam necessariamente associados à proteção cardiovascular, como descrito no estudo de Omagari realizado por Hirano *et al* (1997). Dentro deste contexto, HALP pode ser explicada como um distúrbio do TRC, com geração de partículas de HDL não funcionantes.

Sich *et al* (1998 A, 1998B) caracterizaram o perfil ateroprotetor indivíduos HALP com deficiência da atividade da LH associada ao aumento da razão HDL₂/HDL₃-col, e Lp apo A-I. Os indivíduos avaliados apresentaram um perfil ateroprotetor diagnosticado através de exame ultrasonográfico das artérias carótidas.

Neste estudo utilizamos o modelo de HALP para caracterizar a regulação do metabolismo plasmático das lipoproteínas de alta densidade.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GERAL

❖ Caracterizar em pacientes com hiperalfalipoproteinemia moderada os fenótipos séricos e determinar a presença de manifestações clínicas de aterosclerose e os fatores que modulam o metabolismo das lipoproteínas de alta densidade (HDL) comparando-os à controles.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a concentração de colesterol e triglicérides das duas principais subfrações da lipoproteína de alta densidade HDL₂ e HDL₃.
2. Determinar as atividades séricas da lipoproteína lipase, lipase hepática, proteína de transferência de éster de colesterol, proteína de transferência de fosfolípidos e apolipoproteína A-I
3. Determinar os efeitos destas proteínas e enzimas sobre as concentrações plasmáticas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e suas sub-frações (colesterol e triglicéride de HDL₂ e HDL₃).
4. Determinar o efeito dos fatores moduladores, tais como, idade, sexo, raça, índice de massa corporal, álcool, atividade física, menopausa e o uso de hormônios sobre as atividades das proteínas e enzimas reguladoras das concentrações das lipoproteínas de alta densidade (HDL).
5. Determinar a prevalência de doença aterosclerótica e de fatores de risco para esta nos dois grupos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Protocolo Experimental

Foram convocados 95 pacientes cadastrados no Hospital de Clínicas da Unicamp selecionados a partir de seus resultados laboratoriais obtidos pelo Serviço de Bioquímica Clínica. Compreendiam dois grupos: o grupo com hiperalfalipoproteinemia moderada (HALP) definidos por valores iguais ou acima do percentil 90 de uma população adulta de 1700 indivíduos previamente analisada, e um grupo controle com valores abaixo do percentil 90.

Os HALP (n=48) foram definidos como apresentando HDL-colesterol entre 68 e 100 mg/dL. Neste grupo 38 eram do sexo feminino e 10 do sexo masculino com idades entre 23 e 69 anos e 38 e 77 anos respectivamente e apresentavam distribuição étnica de 68% de indivíduos caucasianos e 32% de indivíduos não caucasianos; os 47 controles apresentaram HDL-col entre 34 e 66 mg/dL sendo 37 do sexo feminino e 10 do sexo masculino com idades entre 29 e 68 anos e 21 e 79 anos respectivamente e distribuídos em 59% de caucasianos e 41% de não caucasianos. Todos os participantes apresentavam padrão alimentar semelhante.

Os pacientes foram informados quanto ao objetivo e riscos dos procedimentos e deram seu livre consentimento para serem incluídos no estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp em março de 2000.

Inicialmente os pacientes foram submetidos a coletas de sangue para alguns exames de triagem que constaram de exames bioquímicos, como as dosagens de glicose, ácido úrico, uréia, alanina aminotransferase e hormônio estimulante da tireóide.

Os pacientes selecionados, em uma nova visita, foram submetidos a um exame clínico e medida do índice de massa corporal (kg/m^2), cintura (cm) e

eletrocardiograma, quando clinicamente indicado e responderam a um questionário contendo três partes:

1. Informações sobre a presença de doenças coronariana, cérebro-vascular, e vascular periférica, e/ou história de revascularização arterial.
2. Informações sobre a presença de alguns fatores de risco para doença arterial coronariana (DAC): hipertensão arterial, tabagismo e antecedentes familiares positivos para DAC em parentes de primeiro grau (homens abaixo de 55 anos e mulheres abaixo de 65 anos)
3. Informações sobre a presença de fatores ambientais para a hiperalfalipoproteinemia: como o consumo de bebidas alcoólicas, prática de atividade física regular, uso de terapia de reposição hormonal, uso de contraceptivos orais, uso de outras drogas tais como as estatinas, fibratos e fenitoínas

Foram excluídos os casos com índice de massa corporal maior ou igual a 40 Kg/m² (obesidade grau III), outras endocrinopatias, doenças gastrointestinais, nefropatias, hepatopatias, pneumopatias e doenças tumorais.

A dislipidemia foi definida utilizando-se os critérios do *National Cholesterol Education Program III* (NCEPIII) (JAMA, 2001), isto é, valores para triglicérides iguais ou acima de 150mg/dL e/ou LDL-col iguais ou acima de 100mg/dL. A menopausa foi definida como mulheres com idade iguais ou acima de 51 anos (Menopause, 7(2), 2000)

As coletas foram realizadas no Setor de Coleta do Laboratório de Patologia Clínica do HC-Unicamp em duas etapas. A primeira punção venosa foi realizada após 12 horas de jejum e a segunda 15 minutos após a injeção de heparina (100 UI / Kg de peso, Liquepine[®], Roche) para a determinação das atividades das lipases hepática (LH) e lipoproteína lipase (LPL) (Ehnholm *et al*, 1986).

As análises laboratoriais foram feitas no Laboratório de Lípidos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), no Serviço de Bioquímica do HC-Unicamp e no Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo .

3.2. Análises Bioquímicas Séricas:

A glicemia de jejum (Gli) (Banauch *et al*, 1975) foi determinada através de método enzimático colorimétrico em equipamento automatizado Mega-Bayer.

O hormônio estimulante da tireoide (TSH) (Sapin *et al*, 1997) foi obtido através de método de eletroquimioluminescência em equipamento Elecsys (Roche).

As dosagens de ácido úrico (Barhan *et al*, 1972), uréia (Schubert *et al*, 1965), alanina aminotransferase (ALT) (Maire, 1990) e δ glutamiltransferase foram realizadas através de ensaios enzimáticos em equipamento automatizado Mega-Bayer.

Lípides, Lipoproteínas e Apolipoproteínas:

Colesterol total (Col-T) (Allain *et al*, 1974), triglicérides (TG) (Fossati *et al*, 1982) foram determinados através de métodos enzimático colorimétricos em equipamento automatizado Mega-Bayer.

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) foram determinadas através de método homogêneo polianion-detergente (PPD) em aparelho Mega-Bayer (Bachorik *et al*, 1986).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram estimadas utilizando-se a equação de Friedewald (Friedewald *et al*, 1972)

As subfrações de HDL (HDL₂ e HDL₃) foram obtidas por microultracentrifugação sequencial do sobrenadante obtido do plasma após precipitação das lipoproteínas contendo apolipoproteína B₁₀₀ em microultracentrifuga Beckman (Bronzert *et al*, 1977)

As apolipoproteínas A-I e B₁₀₀ (Sternberg, 1977) foram analisadas por nefelometria, em sistema de semi-automação Beckman Array-360.

A apolipoproteína A-II (Siedel *et al*, 1988) foi analisada por nefelometria, em sistema de semi-automação em sistema Dade Boehringer.

Os ácidos graxos livres e fosfolípidos foram obtidos através de métodos enzimático colorimétricos (Wako) (Takayama, 1960; Howorth *et al*, 1964).

A lipoproteína (a) -Lp(a) (Bergmeyer *et al*, 1972), foi determinada através de nefelometria em sistema de semi-automação Beckman Array-360.

Lipase Hepática e Lipoproteína Lipase :

Determinou-se as atividades destas enzimas através da medida da liberação dos ácidos graxos livres resultantes da hidrólise de uma emulsão artificial contendo trioleína. Esta foi preparada a partir de uma mistura contendo trioleína marcada com [³H] [(9,10 ³H (N)- trioleína, atividade específica de 26,8 Ci/mmol, NEN NET], trioleína fria (T-7502, Sigma, St Louis, MO, EUA) estabilizada com solução de goma arábica à 5% (G-9752, Sigma, St Louis, MO, EUA). Para inibir-se a atividade da LPL foi usada uma solução de 1 M NaCl.

A mistura foi incubada por 60 minutos, à 37° C. Em seguida acrescentou-se 715 µL da solução de clorofórmio:heptano: etanol (1,41; 1,25; 1: v/v/v) e 165 µL da solução 0,14 M K₂CO₃/H₃BO₃ (pH=10,5). Os ácidos graxos livres extraídos no sobrenadante, e a radioatividade mensurada em um equipamento cintilador beta Beckman, modelo LS-5000. O ensaio foi realizado em triplicata.

As atividades das enzimas foram expressas em nmol AGL/mL/h. Amostras de brancos e controles positivos foram analisadas simultaneamente às amostras dos participantes (Ehnholm *et al*, 1986)

O cálculo foi realizado através da equação: [Leitura das amostras X 100 X 2,52] / fator, para de 4,4 microlitros de emulsão preparada.

Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol :

Sua atividade foi determinada através de ensaio exógeno radiométrico (Lagrost *et al*, 1982).

As frações de VLDL, LDL e HDL foram obtidas a partir de um *pool* de plasma de humanos normolipidêmicos após jejum de 12 horas. As frações VLDL+LDL de densidade $\leq 1.063 \text{ g/mL}$ foram separadas do plasma, por ultra-centrifugação sequencial em ultracentrífuga Beckman, modelo L5-75B, rotor 50T, a 40000rpm, a 4° C, por 20 horas. O infranadante contendo HDL ($d > 1.063 \text{ g/mL}$) foi dialisado em tampão fosfato (PBS) contendo EDTA, pH 7,35 - 7,45 e marcado isotopicamente com 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ de [colesteryl-4- ^{14}C] oleato/ mL de infranadante por 24 horas à 37° C em banho-*shaker*.

A HDL radioativa foi isolada por nova ultracentrifugação sequencial, densidade $= 1.21 \text{ g/mL}$, a 40000rpm, 4° C, 40 horas. Em seguida, a fração $^{14}\text{C} + \text{HDL}$ foi purificada por ultracentrifugação em gradiente de densidade, utilizando soluções salinas nas densidades de 1,006, 1,063 e 1,21 g/mL, através de ultracentrifugação por 24 horas à 40000 rpm, à 4° C, e dialisada em tampão PBS contendo EDTA por 48 horas.

No ensaio da CETP, o *pool* de HDL radioativa atuou como doador de ésteres de colesterol (CE) e o *pool* de VLDL+LDL, como acceptor destes. À essa mistura foi adicionado o plasma do paciente como fonte de CETP. O ensaio foi processado em banho-maria à 37° C por 4 horas, em triplicata.

A atividade da CETP foi medida após a precipitação das lipoproteínas contendo apo B₁₀₀ com uma solução de sulfato de dextrana e cloreto de magnésio, e a radioatividade do sobrenadante mensurada em contador beta (Beckman, modelo LS-5000).

A atividade foi expressa em porcentagem de transferência de CE por unidade de tempo. Amostras de branco e controle positivo foram analisadas simultaneamente às amostras dos indivíduos. O cálculo foi realizado através da equação: $1 - [\text{leitura da amostra} / \text{leitura do branco}] \times 100$ (Lagrost *et al*, 1982).

Proteína de Transferência de Fosfolípidos:

A atividade de PLTP foi medida através de ensaio exógeno radiométrico.

Lipossomas contendo [^{14}C] fosfatidilcolina foram incubadas com plasma e HDL, durante 60 minutos à 37°C.

A fração de HDL foi obtida através de ultracentrifugação sequencial a partir de um *pool* de plasma humano normolipidêmico.

Após a incubação, a HDL foi separada por precipitação dos lipossomas com heparina e MnCl_2 . O precipitado foi removido através de centrifugação por 10 minutos a 12000rpm. A contagem da radioatividade do sobrenadante feita através de cintilografia beta (Beckman, modelo LS-5000).

O ensaio foi realizado em triplicata. A atividade foi expressa como porcentagem de PL transferido dos lipossomas para a HDL / hora

Amostras de branco e controles positivo normolipidêmicos e dislipidêmicos foram analisadas simultaneamente às amostras dos participantes (Damen *et al*, 1982)

O cálculo foi realizado através da equação: $1 - [(\text{leitura da amostra} - \text{leitura do branco}) / \text{leitura da radioatividade total contida nos lipossomas}] \times 100$

3.3 Análises Estatísticas:

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS. Foram utilizados os seguintes testes para medir diferenças entre os grupos : *Mann-Whitney*, *Chi-Quadrado* e teste exato de *Fisher*.

Quando necessário houve transformação logaritmica das variáveis.

O teste de *Spearman* foi utilizado para as correlações univariadas em cada grupo. A análise de regressão linear múltipla foi utilizada para verificar a influência de diversos fatores (variáveis independentes) sobre o HDL-col e TG (e suas sub-frações). Todos os testes foram considerados significantes ao nível de $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos como coeficiente de determinação, R^2 , que representa a contribuição das variáveis independentes na explicação das variáveis dependentes. As variáveis independentes foram: sexo (feminino/masculino), idade

(todas as idades), IMC (todos os IMC), raça (brancos/não brancos), LH (log), LPL (log), CETP, PLTP e Apo A-I. As variáveis dependentes foram: HDL-col, HDL₂-col e TG, HDL₃-col e TG. As variáveis testadas para explicar as variações das proteínas de e enzimas reguladoras do metabolismo do HDL foram: sexo, idade, raça, IMC, uso de álcool, prática de atividade física, menopausa e o uso de TRH ou contraceptivo oral.

- ❖ Acton S; Rigotti A; Landschulz KT; XU S; et al: Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-20, 1996.
- ❖ Agellon, L.B.; Quinet, E.M.; Gillette, T.G.; Drayna, D.T.; Brown, M.L.; Tall, A.R. Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry*, 29:1372-1376, 1990.
- ❖ Albers JJ, Wolfbauer G, Cheung MC, Day JR, Ching AF, Lok S, Tu AY. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies. *Biochim Biophys Acta* 24:1258(1):27-34, 1995.
- ❖ Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20(4):470-5, 1974.
- ❖ Angerholm-Larsen B, Nordestgaard B G, Steffensen R, et al : Elevated HDL cholesterol is a risk factor for ischemic heart disease in white women when caused by a common mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene. *Circulation*, 1001: 1907-1912, 2000.
- ❖ Arai T, Yamashita S, Sakai N, Hirano K, Okada S, Ishigami M, Maruyama T, Yamane M, Kobayashi H, Nozaki S, Funahashi T, Kameda-Takemura K, Nakajima N, Matsuzawa Y. A novel nonsense mutation (G181X) in the human cholesteryl ester transfer protein gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects. *J Lipid Res* 37(10):2145-54, 1996.
- ❖ Aviram M: Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today* 5(9):381-6, 1999.
- ❖ Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol.* 129:78-100, 1986.
- ❖ Banauch D, Brummer W, Ebeling W, Metz H, Rindfrey H, Lang H, Leybold K, Rick W, Staudinger HJ. A glucose dehydrogenase for the determination of glucose concentrations in body fluids *Z Klin Chem Klin Biochem* 13(3):101-7, 1975.
- ❖ Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97: 142-5, 1972.
- ❖ Baynes, J.W.; Thorpe, S.R.; The role of oxidative stress in diabetic complications. *Curr. Opin. Endocrinol.* 3:277-84, 1996.
- ❖ Bell RA, Mayer-Davis EJ, Martin MA, D'Agostino RB Jr, Haffner SM. Associations between alcohol consumption and insulin sensitivity and cardiovascular disease

- risk factors: the Insulin Resistance and Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 23(11):1630-6, 2000.
- ❖ Berg GA, Siseles N, Gonzalez AI, Ortiz OC, Tempone A, Wikinski RW: Higher values of hepatic lipase activity in postmenopause: relationship with atherogenic intermediate density and low density lipoproteins. *Menopause* 8(1):51-7, 2001.
 - ❖ Bergmeyer HU. Standardization of enzyme assays. *Clin Chem* 18(11):1305-11, 1972.
 - ❖ Bihain BE, Delplanque B, Khallou J, Chevreuil O, Troussard AA, Michel L, Mann CJ, Yen FT. Lipolysis-stimulated receptor: a newcomer on the lipoprotein research scene. *Diabete Metab*; 21(2):121-126, 1995.
 - ❖ Breslow, J. L.; Ross, D.; McPherson, J.; Williams, H.; Kumit, D.; Nussbaum, A. L.; Karathanasis, S. K.; Zannis, V. I. : Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79: 6861-6865, 1982
 - ❖ Brewer, H.B. JR.; Gregg, R.E.; Hoeg, J.M.; Fojo, S.S. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview. *Clin. Chem.*34B:B4-B5, 1988
 - ❖ Brinton EA. Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;16(3):431-40, 1996.
 - ❖ Bronzert TJ, Brewer HB Jr. New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fractions. *Clin Chem* 23(11):2089-98, 1977.
 - ❖ Brown, M.S.; Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathways for cholesterol homeostasis. *Science* .232:34-47, 1986.
 - ❖ Brown, M.S.; Goldstein, J.L. Lipoprotein receptors: therapeutic implications. *J. Hypertens.* 232:Supl 33-S35, 1990.
 - ❖ Brown, M.S.; Kovanen, P.T.; Goldstein, J.L.; Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, 212:628-35, 1981.
 - ❖ Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR: Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 18:297-330, 1998.
 - ❖ Carlson LA, Holmquist L, Nilsson- Ehle P: Deficiency of hepatic lipase activity in post heparin plasma in familial hyper-alpha-trygliceridemia. *Acta. Med Scand* 219(5): 435-447, 1986.
 - ❖ Chemnitius JM, Winkel H, Meyer I, Schirmacher K, Armstrong VW, Kreuzer H, Zech R: Age related decrease of high density lipoproteins (HDL) in women after

- menopause. Quantification of HDL with genetically determined HDL arylesterase in women with healthy coronary vessels and in women with angiographically verified coronary heart disease. *Med Klin* 15;93(3):137-45, 1998.
- ❖ Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, et al: High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(4):910-7, 1999.
 - ❖ Cohen JC, Vega GL, Grundy SM: Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr Opin Lipidol* 10(3):259-67, 1999.
 - ❖ Committee of enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology: Recommended method for the determination of δ -glutamyl transferase in blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*,36; 119-125, 1976.
 - ❖ Connelly PW. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* 286(1-2):243-55, 1999.
 - ❖ Consensus opinion of The North American Menopause Society: Menopause, 7(2):27, 2000.
 - ❖ Contacos C, Barter PJ, Vrga L, Sullivan DR. Cholesteryl ester transfer in hypercholesterolaemia: fasting and postprandial studies with and without pravastatin. *Atherosclerosis*;141(1):87-98, 1998.
 - ❖ Crouse SF, O'Brien BC, Grandjean PW, Lowe RC, Rohack JJ, Green JS, Tolson H. Training intensity, blood lipids, and apolipoproteins in men with high cholesterol. *Am J Clin Nutr*; 72(1):36-41, 2000.
 - ❖ Damen J, Regts J, Scherphof G Transfer of [14 C]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* 14;712(3):444-52, 1982.
 - ❖ De Roos B, Van Tol A, Urgert R, Scheek LM, Van Gent T, Buytenhek R, Princen HM, Katan MB. Consumption of French-press coffee raises cholesteryl ester transfer protein activity levels before LDL cholesterol in normolipidaemic subjects. *J Intern Med* 2000 Sep;248(3):211-6
 - ❖ De Roos B, Van Tol A, Urgert R, Scheek LM, Van Gent T, Buytenhek R, Princen HM, Katan MB. Consumption of French-press coffee raises cholesteryl ester transfer protein activity levels before LDL cholesterol in normolipidaemic subjects. *J Intern Med*; 248(3):211-6, 2000.

- ❖ Dean M, Hamon Y, Chimini G: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. of Lipid Research* 42: 1007-1017, 2001.
- ❖ Dugi KA, Feuerstein IM, Hill S, Shih J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr, Hoeg JM. Lipoprotein lipase correlates positively and hepatic lipase inversely with calcific atherosclerosis in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(2):354-64, 1997.
- ❖ Ehnholm C, et al. Preparation, characterization, and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol.* 129:716-38, 1986.
- ❖ Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III. *JAMA* 2001 May 16;285(19):2486-97
- ❖ Fielding, C.J.; Fielding, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36:211-228, 1995.
- ❖ Forte, T.M.; Goth-Goldstein, R.; Nordhausen, R.W.; McCall, M.R. Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles. *J. Lipid Res.* 34:317-24, 1993.
- ❖ Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 28(10):2077-80, 1982.
- ❖ Franceschini G, Werba JP, D'Acquarica AL, Gianfranceschi G, Michelagnoli S, Sirtori CR. Microsomal enzyme inducers raise plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in healthy control subjects but not in patients with primary hypoalphalipoproteinemia. *Clin Pharmacol Ther* 57(4):434-40, 1995.
- ❖ Friedewald, WT, Levy RI, Fredrickson, DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502, 1972.
- ❖ Fruchart JC, Duriez P. High density lipoproteins and coronary heart disease. Future prospects in gene therapy. *Biochimie* 80(2):167-72, 1998.
- ❖ Gardner CD, Tribble DL, Young DR, Ahn D, Fortmann SP: Population frequency distributions of HDL, HDL(2), and HDL(3) cholesterol and apolipoproteins A-I and B in healthy men and women and associations with age, gender, hormonal status, and sex hormone use: the Stanford Five City Project. *Prev Med* 31(4):335-45, 2000.

- ❖ Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* Jan 1;99(1):62, 1997.
- ❖ Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker R: Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem* 3;273(11):6088-95, 1998.
- ❖ Gaziano JM, Hennekens CH, Godfried SL, Sesso HD, Glynn RJ, Breslow JL, Buring JE. Type of alcoholic beverage and risk of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1;83(1):52-7, 1999.
- ❖ Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968 Mar;9(2):155-67
- ❖ Glomset, J.A. The plasma lecithin – cholesterol acyl transferase reaction. *J. Lipid Res.* 9:155-67, 1968.
- ❖ Glueck CJ, Fallat RW, Millett F, Steiner PM. Familial hyperalphalipoproteinemia. *Arch Intern Med* 135(8):1025-8, 1975.
- ❖ Goldberg IJ, Merkel M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci* 1;6:D388-405, 2001.
- ❖ Goldberg, I.J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central role in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.*, 37:693-707, 1996.
- ❖ Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al: High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79(1):8-15, 1989.
- ❖ Gordon PM, Fowler S, Warty V, Danduran M, Visich P, Keteyian S. Effects of acute exercise on high density lipoprotein cholesterol and high density lipoprotein subfractions in moderately trained females. *Br J Sports Med*; 32(1):63-7, 1998.
- ❖ Gotto, J.R.; Pownall, H.J.; Havel, R.J. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.*, 128:3-41, 1986.
- ❖ Grandjean PW, Oden GL, Crouse SF, Brown JA, Green JS: Lipid and lipoprotein changes in women following 6 months of exercise training in a worksite fitness program. *J Sports Med Phys Fitness* 36(1):54-9, 1996.

- ❖ Groener JE, van Ramshorst EM, Katan MB, Mensink RP, van Tol A. Diet-induced alteration in the activity of plasma lipid transfer protein in normolipidemic human subjects. *Atherosclerosis*; 87(2-3):221-6, 1991.
- ❖ Grundy SM: United states cholesterol guidelines 2001: expanded scope of intensive low-density lipoprotein-lowering therapy. *Am J Cardiol* 11;88 (7 Suppl 2):23-7, 2001.
- ❖ Gupta AK, Ross EA, Myers JN, Kashyap ML. Increased reverse cholesterol transport in athletes. *Metabolism* 42(6):684-90, 1993.
- ❖ Haskell WL. Exercise-induced changes in plasma lipids and lipoproteins. *Prev Med* 1984 Jan;13(1):23-36
- ❖ Havel RJ. Lipoproteins and lipid transport. *Adv Exp Med Biol*; 63:37-59, 1975.
- ❖ Havel, R.J. The formation of LDL: mechanism and regulation. *J. Lipid Res.*, 25:1570-1576, 1984.
- ❖ Havel, R.J.; Eder, H. A.; Gragdon, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, 34:1345-53, 1955.
- ❖ Hayek, T.; Azrolan, N.; Verdery, R.B.; Walsh, A.; Shaul, T.C.; Agellon, L.B.; Tall, A.R.; Breslow, J.L. Hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein interact to dramatically alter high density lipoprotein levels, particles sizes and metabolism. *J. Clin. Invest.*, 92:1143-1152, 1993.
- ❖ Hegele RA, Little JA, Vezina C, Maguire GF, Tu L, Wolever TS, Jenkins DJ, Connelly PW: Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. *Arterioscler Thromb* 13(5):720-8, 1993.
- ❖ Heller DA, de Faire U, Pedersen NL, Dahlen G, McClearn GE: Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *N Engl J Med* 328(16):1150-6, 1993.
- ❖ Herrington DM, Pusser BE, Riley WA, Thuren TY, Brosnihan KB, Brinton EA, MacLean DB. Cardiovascular effects of droloxifene, a new selective estrogen receptor modulator, in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ; 20(6):1606-12, 2000.
- ❖ Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely

- related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*, 20;7(13):4119-27, 1988.
- ❖ Herz J, Strickland DK LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest*;108(6):779-84, 2001.
 - ❖ Hirano K, Yamashita S, Funahashi T, Sakai N, Menju M, Ishigami M, Hiraoka H, Kameda-Takemura K, Tokunaga K, Hoshino T, *et al.* Frequency of intron 14 splicing defect of cholesteryl ester transfer protein gene in the Japanese general population - relation between the mutation and hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 100(1):85-90, 1993.
 - ❖ Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, Arai T, Yanagi K, Takami S, Menju M. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15(11):1849-56, 1995.
 - ❖ Hirano, K.; Yamashita, S.; Nakajima, N.; Arai, T.; Maruyama, T.; Yoshida, Y.; Ishigami, M.; Sakai, N.; Takemura, K.K.; Matsuzawa, Y. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17:1053-1059, 1997.
 - ❖ Howarth PJ, Gibbard S, Marks V. Evaluation of a colorimetric method (Duncombe) of determination of plasma non-esterified fatty acids. *Clin Chim Acta* ;14(1):69-73, 1966.
 - ❖ Huuskonen J, Ehnholm C. Phospholipid transfer protein in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol Jun*;11(3):285-9, 2000.
 - ❖ Ikewaki, K.; Nishiwaki, M.; Sakamoto, T.; Ishikawa, T.; Fairwell, T.; Zech, L.A.; Nagano, M.; Nakamura, H.; Brewer, H.B.; Rader, D. Increased catabolic rate of low density lipoproteins in humans, with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J. Clin. Invest.*, 96:1573-1581, 1995.
 - ❖ Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*;11(4):389-96, 2000.
 - ❖ Inazu, A.; Brown, M.L.; Hesler, C.B.; Agellon, L.B.; Koizumi, J.; Takata, K.; Maruhama, Y.; Mabuchi, H.; Tall, A.R. Increased high density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.*, 323:1234-1238, 1990.

- ❖ Inazu, A.; Jiang, X.C.; Haraki, T.; Yagi, K.; Kamon, N.; Koizumi, J.; Mabuchi, H.; Takeda, R.; Takata, K.; Moriyama, Y.; Doi, M.; Tall, A. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. *J. Clin. Invest.*, 94:1872-1882, 1994.
- ❖ Jansen S, Lopez-Miranda J, Castro P, Lopez-Segura F, Marin C, Ordovas JM, Paz E, Jimenez-Perez J, Fuentes F, Perez-Jimenez F.. Low-fat and high-monounsaturated fatty acid diets decrease plasma cholesterol ester transfer protein concentrations in young, healthy, normolipemic men. *Am J Clin Nutr*; 72(1):36-41, 2000.
- ❖ Jiang, X.C.; Moulin, P.; Quinet, E.; Goldberg, I.J.; Yacoub, L.K.; Agellon, L.B.; Compton, D.; Polokoff, R.S.; Tall, A.R. Mammalian, adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J. Biol. Chem.*, 266:4631-4639, 1991.
- ❖ Jonas, A. Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1084:205-20, 1991.
- ❖ Kannel WB: High-density lipoproteins: epidemiologic profile and risks of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 22;52(4):9B-12B, 1983.
- ❖ Kannel, W.B.; Castelli, W.P.; Gordon, T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspective based on Framingham study. *Ann. Intern. Med.*, 90:85, 1979.
- ❖ Khallou J, Troussard AA, Masson M, Delplanque B, Mann CJ, Andre P, Yen FT, Bihain BE. Liver mechanisms for the elimination of lipoproteins of intestinal origin. *C R Seances Soc Biol Fil*;189(5):899-904, 1995.
- ❖ Kilsdonk EP, Van Gent T, Van Tol A. Characterization of human high-density lipoprotein subclasses LP A-I and LP A-I/A-II and binding to HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 6;1045(3):205-12, 1990.
- ❖ Kirchgessner TG, Svenson KL, Lusis AJ, Schotz MC. The sequence of cDNA encoding lipoprotein lipase. A member of a lipase gene family. *J Biol Chem* Jun 25;262(18):8463-6, 1987.
- ❖ Kuller LH. Hormone replacement therapy and coronary heart disease. A new debate. *Med Clin North Am* 2000 Jan;84(1):181-195

- ❖ Kuusi T, Ehnholm C, Viikari J, Harkonen R, Vartiainen E, Puska P, Taskinen MR: Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipase are determinants of hypo- and hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 30(8):1117-26, 1989.
- ❖ Lagrost L, Athias A, Herbeth B, et al. Oposite effect of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein on the size distribution of plasma HDL. *J of Biol. Chem*, 271: 19058-19065, 1996.
- ❖ Lagrost L, Barter PJ. Cholesteryl ester transfer protein promotes the association of HDL apolipoproteins A-I and A-II with LDL: potentiation by oleic acid. *Biochim Biophys Acta* 19;1127(3):255-62, 1992.
- ❖ Lagrost L, Mensink RP, Guyard-Dangremont V, Temme EH, Desrumaux C, Athias A, Homstra G, Gamber P. Variations in serum cholesteryl ester transfer and phospholipid transfer activities in healthy women and men consuming diets enriched in lauric, palmitic or oleic acids. *Atherosclerosis*;142(2):395-402, 1999.
- ❖ Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* 110:231-41, 1998.
- ❖ Lagrost, L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1215:209-36, 1994.
- ❖ Landschulz KT; Pathak RK; Rigotti A; Krieger M; Hobbs HH: Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 98: 984-995, 1996.
- ❖ Lehmann R, Engler H, Honegger R, Riesen W, Spinass GA Role of body fat loss in the exercise-induced improvement of the plasma lipid profile in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*; 45(11):1383-7, 1996.
- ❖ Leighton F, Castro C, Barriga C, Urquiaga EI. Wine and health. Epidemiological studies and possible mechanisms of the protective effects.] *Rev Med Chil*;125(4):483-91, 1997.
- ❖ Li Z, McNamara JR, Fruchart JC, Luc G, Bard JM, Ordovas JM, Wilson PW, Schaefer EJ.: Effects of gender and menopausal status on plasma lipoprotein subspecies and particle sizes. *J Lipid Res* 37(9):1886-96, 1996.
- ❖ Liinamaa MJ, Hannuksela ML, Kesaniemi YA, Savolainen MJ. Altered transfer of cholesteryl esters and phospholipids in plasma from alcohol abusers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;17(11):2940, 1997.

- ❖ Lyu LC, Yeh CY, Lichtenstein AH, Li Z, Ordovas JM, Schaefer EJ. Association of sex, adiposity, and diet with HDL subclasses in middle-aged Chinese. *Am J Clin Nutr* 2001 Jul;74(1):64-71
- ❖ Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;21(9):1451-7, 2001.
- ❖ Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, et al: Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 9(4):319-24, 1998.
- ❖ Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1;25(12):1277-94, 1984.
- ❖ Mahley, R. W. et al. Disorders of lipid metabolism. *Williams Textbook of Endocrinology*. Ed W. B. Saunders, 9a. ed, cap. 23, 1099-1152, 1998."
- ❖ Maire I. Determination of the activity of alanine aminotransferase. 1: *Rev Fr Transfus Hemobiol* 1990 Mar;33(2):101-9
- ❖ Maynar M, Mahedero G, Maynar I, Maynar JI, Tuya IR, Caballero MJ Menopause-induced changes in lipid fractions and total fatty acids in plasma. *Endocr Res* ; 27(3):357-65, 2001.
- ❖ Mead JR, Cryer A, Ramji DP. Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Lett* , 26;462(1-2):1-6, 1999.
- ❖ Moore MN, Kao FT, Tsao YK, Chan L. Human apolipoprotein A-II: nucleotide sequence of a cloned cDNA, and localization of its structural gene on human chromosome 1. *Biochem Biophys Res Commun* 30;123(1):1-7, 1984.
- ❖ Mortimer, B-C.; Beveridge, D.J.; Martins, I.J.; Redgrave, T.G. Intracellular localization and metabolism of chylomicron remnants in the livers of low density lipoprotein receptor-deficient mice and apoE-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 270:28767-76, 1995.
- ❖ Morton RE, Nunes V, Izem L, Quintao E. Markedly elevated lipid transfer inhibitor protein in hypercholesterolemic subjects is mitigated by plasma triglyceride levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;21(10):1642-9, 2001.
- ❖ Morton, R.E. Binding of plasma-derived lipid transfer protein to lipoprotein substrates. The role of binding in the lipid transfer process. *J. Biol. Chem.*, 260:12593-99, 1985.

- ❖ Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson AD, Van Lenten BJ, Vora D, Fogelman AM. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 May;21(5):880
- ❖ Neaton, J.D.; Wentworth, D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple risk factor intervention trial research group. *Arch. Intern. Med.*, 152:56-64, 1992.
- ❖ Ness GC, Lopez D, Chambers CM, Newsome WP, Cornelius P, Long CA, Harwood HJ JR. Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression. *Biochem Pharmacol* 1;56(1):121-9, 1998.
- ❖ Nie L, Niu S, Vega GL, Clark LT, Tang A, Grundy SM, Cohen JC: Three polymorphisms associated with low hepatic lipase activity are common in African Americans. *J Lipid Res* 39(9):1900-3, 1998.
- ❖ Niemeier A, Gafvels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B; Beisiegel U: VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro *Journal of Lipid Research*, 37:1733-1742, 1996.
- ❖ Novok EM, Bydlowski SP. Molecular biology of hyperlipidemias. Genetic variation of apolipoproteins. *Arq Bras Cardiol* 1996 Dec;67(6):411-7
- ❖ Ohta, T.; Nakamura, R.; Takata, K.; Saito, Y.; Yamashita, S.; Horiuchi, S.; Matsuda, I. Structural and functional differences of subspecies of apoA-1-containing lipoprotein in patients with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J. Lipid Res.*, 36:696-704, 1995.
- ❖ Oka, K.; Tzung, K.-W.; Sullivan, M.; Lindsay, E.; Baldini, A.; Chan, L. : Human very-low-density lipoprotein receptor complementary DNA and deduced amino acid sequence and localization of its gene (VLDLR) to chromosome band 9q24 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 20: 298-300, 1994.
- ❖ Oram JF, Vaughan AM, Stocker R: ATP-binding Cassette Transporter A1 Mediates Cellular Secretion of alpha -Tocopherol. *J Biol Chem* 26;276(43):39898-902, 2001.
- ❖ Ordovas J M, Carmena R, Hiperlipidemias , Clínica e Tratamento, Barcelona, Doyma, 1999.

- ❖ Parker DR, McPhillips JB, Derby CA, Gans KM, Lasater TM, Carleton RA. High-density-lipoprotein cholesterol and types of alcoholic beverages consumed among men and women. *Am J Public Health* 86(7):1022-7, 1996.
- ❖ Perusse L, Rice T, Despres JP, Bergeron J, Province MA, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C: Familial resemblance of plasma lipids, lipoproteins and postheparin lipoprotein and hepatic lipases in the HERITAGE Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11):3263-9, 1997.
- ❖ Peters HW, Westendorp IC, Hak AE, Grobbee DE, Stehouwer CD, Hofman A, Witteman JC: Menopausal status and risk factors for cardiovascular disease. *J Intern Med* 246(6):521-8, 1999.
- ❖ Poirier P, Catellier C, Tremblay A, Nadeau A. Role of body fat loss in the exercise-induced improvement of the plasma lipid profile in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Epidemiol*; 4(5):375-81, 1994.
- ❖ Quintao EC, Medina WL, Passarelli M. Reverse cholesterol transport in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2000 Jul-Aug;16(4):237-50
- ❖ Quintão, E.C.R. Is reverse cholesterol transport a misnomer for suggesting its role in the prevention of atheroma formation. *Atherosclerosis*, 116:1-14, 1995.
- ❖ Rakic V, Puddey IB, Dimmitt SB, Burke V, Beilin LJ. A controlled trial of the effects of pattern of alcohol intake on serum lipid levels in regular drinkers. *Atherosclerosis*;137(2):243-52, 1998.
- ❖ Reed RG, Kris-Etherton P, Stewart PW, Pearson TA.. Variation of lipids and lipoproteins in premenopausal women compared with men and postmenopausal women. DELTA (Dietary Effects on Lipoproteins and Thrombogenic Activity) Investigators. *Metabolism*; 49(9):1101-5, 2000.
- ❖ Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 11;319(7224):1523-8, 1999.
- ❖ Ritter MC, Kannan CR, Bagdade JD. The effects of hypothyroidism and replacement therapy on cholesteryl ester transfer. *J Clin Endocrinol Metab* ; 81(2):797-800, 1996.
- ❖ Roheim PS, Asztalos BF. Clinical significance of lipoprotein size and risk for coronary atherosclerosis. *Clin Chem* 1995 Jan;41(1):147-52

- ❖ Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Menju M, Arai T, Kobayashi K, Ishigami M, Yoshida Y, Hoshino T, Nakajima N, *et al.* Frequency of exon 15 missense mutation (442D:G) in cholesteryl ester transfer protein gene in hyperalphalipoproteinemic Japanese subjects. *Atherosclerosis* 24;114(2):139-45, 1995.
- ❖ Sakai, J.; Hoshino, A.; Takahashi, S.; Miura, Y.; Ishii, H.; Suzuki, H.; Kawarabayasi, Y.; Yamamoto, T. : Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* 269: 2173-2182, 1994.
- ❖ Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, Amar M. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*;9(3):211-9, 1998.
- ❖ Santamarina-Fojo S, Lambert G, Hoeg JM, Brewer HB Jr. Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*; 11(3):267-75, 2000.
- ❖ Sapin R, Gasser F, d'Herbomez M, Wemeau JL, Ebert C, Schlienger JL. Elecsys thyrotropin (TSH) assay evaluated. *Clin Chem*; 43(3):545-7, 1997.
- ❖ Savolainen MJ, Hannuksela M, Seppanen S, Kervinen K, Kesaniemi YA. Increased high-density lipoprotein cholesterol concentration in alcoholics is related to low cholesteryl ester transfer protein activity. *Eur J Clin Invest*; 20(6):593-9, 1990.
- ❖ Schubert GE. Simple enzymatic method for the determination of glycerine fatty acid esters and glycerine phosphatide in tissues. *Frankf Z Pathol*;74(5):460-4, 1965.
- ❖ Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, Harvey SC, Liadaki KN, Zannis V. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*;11(2):105-15, 2000.
- ❖ Seip RL, Moulin P, Cocke T, Tall A, Kohrt WM, Mankowitz K, Semenkovich CF, Ostlund R, Schonfeld G. Exercise training decreases plasma cholesteryl ester transfer protein. *Arterioscler Thromb* ;13(9):1359-67, 1993.
- ❖ Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest*; 96(6):3005-8, 1995.
- ❖ Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Dallongeville J, Federspiel MC, Cherfils C, Raisonnier A, Turpin G, Beucier I. Characterization of two HDL subfractions and LpA-I, LpA-I:A-II distribution profiles and clinical characteristics of hyperalphalipoproteinemic subjects without cholesterol ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis*;138(2):351-60, 1998.

- ❖ Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Egloff M, Auer C, Gautier V, Turpin G, Beucler I. Hyperalphalipoproteinemia: characterization of a cardioprotective profile associating increased high-density lipoprotein2 levels and decreased hepatic lipase activity. *Metabolism*;47(8):965-73, 1998.
- ❖ Siedel J, Schiefer S, Rosseneu M, Bergeaud R, De Keersgieter W, Pautz B, Vinaimont N, Ziegenhorn J. Immunoturbidimetric method for routine determinations of apolipoproteins A-I, A-II, and B in normo- and hyperlipemic sera compared with immunonephelometry. *Clin Chem*;34(9):1821-5, 1988.
- ❖ Siler SQ, Neese RA, Hellerstein MK. De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. *Am J Clin Nutr*; 70(5):928-36, 1999.
- ❖ Silverman, D.I.; Ginsburg, G.S.; Pasternak, R.C. High-density lipoprotein subfractions. *Am. J. Med.*, 94:636-45, 1993.
- ❖ Singaraja RR, Bocher V, James ER, Clee SM, Zhang LH, Leavitt BR, Tan B, Brooks-Wilson A, Kwok A, Bissada N, Yang YZ, Liu G, Tafuri SR, Fievet C, Wellington CL, Staels B, Hayden MR. J Biol Chem Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoA1-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron. 7;276(36):33969-79, 2001.
- ❖ Speijer, H.; Groener, J.E.M.; Ramshorst, E.; Van Tol, A. Different locations of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfers protein activities in plasma. *Atherosclerosis*, 90:159-168, 1991.
- ❖ Sprecher DL. Raising high-density lipoprotein cholesterol with niacin and fibrates: a comparative review. *Am J Cardiol* , 21;86(12A):46L-50L, 2000.
- ❖ Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH: A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 8;325(6):373-81, 1991.
- ❖ Stein O, Dabach Y, Hollander G, Ben-Naim M, Halperin G, Stein Y. Dexamethasone impairs cholesterol egress from a localized lipoprotein depot in vivo. *Atherosclerosis*; 137(2):303-10, 1998.
- ❖ Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*; 144(2):285-301, 1999.

- ❖ Steinmetz J, Boerwinkle E, Gueguen R, Visvikis S, Henny J, Siest G: Multivariate genetic analysis of high density lipoprotein particles. *Atherosclerosis* 92(2-3):219-27, 1992.
- ❖ Sternberg JC. A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions. *Clin Chem*; 23(8):1456-64, 1977.
- ❖ Suter E, Marti B, Gutzwiller F. Jogging or walking--comparison of health effects. *J Appl Physiol*; 82(1):270-7, 1997.
- ❖ Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta*. 79:93-98, 1977.
- ❖ Tall AR Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J.Clin.Invest.*,86(2):379-84,1990.
- ❖ Tall, A. Plasma lipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 64:235-257, 1995.
- ❖ Tan KC, Shiu SW, Kung AW. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hyper- and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*; 83(1):140-3, 1998.
- ❖ Tan, K.C., Shiu, S.W., Chu, B.Y. Roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein in determining low density lipoprotein subfraction distribution in Chinese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 145(2): 273-278, 1999.
- ❖ Teh EM, Dolphin PJ, Breckenridge WC, Tan MH: Human plasma CETP deficiency: identification of a novel mutation in exon 9 of the CETP gene in a Caucasian subject from North America. *J Lipid Res* 39(2):442-56, 1998.
- ❖ Thompson PD, Gadaleta PA, Yurgalevitch S, Cullinane E, Herbert PN: Effects of exercise and lovastatin on serum creatine kinase activity. *Metabolism* 40(12):1333-6, 1991.
- ❖ Thuren T: Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol* 11(3):277-83, 2000.
- ❖ Tikkanen MJ, Laakso M, Ilmonen M, Helve E, Kaarsalo E, Kilkki E, Saltevo J. Treatment of hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia with simvastatin and gemfibrozil in patients with NIDDM. A multicenter comparison study. *Diabetes Care*; 21(4):477-81, 1998.
- ❖ Tomng PL, Su TC, Sung FC, Chien KL, Huang SC, Chow SN, Lee YT. Effects of menopause and obesity on lipid profiles in middle-aged Taiwanese women: the

- Chin-Shan Community Cardiovascular Cohort Study. *Atherosclerosis* 153(2):413-21, 2000.
- ❖ Tu AY, Nishida HI, Nishida T. High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. *J Biol Chem*, 268(31):23098-105, 1993.
 - ❖ Uboldi, P.; Spoladore, M.; Fantappie, S.; Marcovina, S.; Catapano, A.L. Localization of apolipoprotein A-I epitopes involved in the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.*, 37:2557-68, 1996.
 - ❖ Urabe M, Yamamoto T, Kashiwagi T, Okubo T, Tsuchiya H, Iwasa K, Kikuchi N, Yokota K, Hosokawa K, Honjo H: Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase and lipids including apolipoprotein E in climacteric and elderly women. *Endocr J* 43(6):737-42, 1996.
 - ❖ Vaisman BL, Lambert G, Amar M, et al. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest* 108(2):303-9, 2001.
 - ❖ Valimaki M, Laitinen K, Ylikahri R, Ehnholm C, Jauhiainen M, Bard JM, Fruchart JC, Taskinen MR. The effect of moderate alcohol intake on serum apolipoprotein A-I-containing lipoproteins and lipoprotein (a). *Metabolism*; 40(11):1168-72, 1991.
 - ❖ Van Haperen, R, Van Tol, A., Vermeulen, P., Jauhiainen, M., Van Gent, T., Van der Berg, P., Ehnholm, S., Grosveld, F., Van der Kamp, A., De Crom, R.. Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 20(4): 1082-1088, 2000.
 - ❖ Van Tol A, Hendriks HF. Moderate alcohol consumption: effects on lipids and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol*; 12(1):19-23, 2001.
 - ❖ van Tol A, Urgert R, de Jong-Caesar R, van Gent T, Scheek LM, de Roos B, Katan MB. The cholesterol-raising diterpenes from coffee beans increase serum lipid transfer protein activity levels in humans. *Atherosclerosis* 25;132(2):251-4, 1997.
 - ❖ Vega GL, Clark LT, Tang A, Marcovina S, Grundy SM, Cohen JC: Hepatic lipase activity is lower in African American men than in white American men: effects of 5' flanking polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC). *J Lipid Res* 39(1):228-32, 1998.

- ❖ von Eckardstein A, Assmann G. Prevention of coronary heart disease by raising high-density lipoprotein cholesterol? *Curr Opin Lipidol* 2000 Dec;11(6):627-37
- ❖ von Eckardstein A, Assmann G. Prevention of coronary heart disease by raising high-density lipoprotein cholesterol? *Curr Opin Lipidol*;11(6):627-37, 2000.
- ❖ von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, Weng W, Funke H, Assmann G. Apolipoprotein C-III(Lys58----Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1991 May;87(5):1724-31
- ❖ von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, Weng W, Funke H, Assmann G. Apolipoprotein C-III(Lys58----Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest*; 87(5):1724-31, 1991.
- ❖ Von Eckardstein A; Assmann G: High density lipoproteins and reverse cholesterol transport: lessons from mutations. *Atherosclerosis* 137: S7-S11, 1998.
- ❖ Walsh BW, Spiegelman D, Morrissey M, Sacks FM: Relationship between serum estradiol levels and the increases in high-density lipoprotein levels in postmenopausal women treated with oral estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 84(3):985-9, 1999.
- ❖ Wells IC, Peitzmeier G, Vincent JK. Lecithin: cholesterol acyltransferase and lysolecithin in coronary atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*; 45(3):303-10, 1986.
- ❖ Windler, E.; Chao, Y.; Havel, R.J. Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *J. Biol. Chem.*, 255:5475-5480, 1980.
- ❖ Wion KL, Kirchgessner TG, Lusis AJ, Schotz MC, Lawn RM. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 27;235(4796):1638-41, 1987.
- ❖ Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation* 8;99(22):2901-7, 1999.
- ❖ Yamashita S, Maruyama T, Hirano KI, Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*; 152(2):271-85, 2000.
- ❖ Zambon A, Austin MA, Brown BG, Hokanson JE, Brunzell JD. Effect of hepatic lipase on LDL in normal men and those with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*; 13(2):147-53, 1993.
- ❖ Zambon A, Hokanson JE: Lipoprotein classes and coronary disease regression. *Current Opinion on Lipidology*;9(4):329-36,1998.

- ❖ Zhong S; Sharp DS; Grove JS; Bruce C; Yano K; Curb JD; Tall A: Increased coronary heart disease in Japanese American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J. Clin. Invest.* 97: 2917-2923, 1996.
- ❖ Zmuda JM, Yurgalevitch SM, Flynn MM, Bausserman LL, Saratelli A, Spannaus-Martin DJ, Herbert PN, Thompson PD. Exercise training has little effect on HDL levels and metabolism in men with initially low HDL cholesterol. *Atherosclerosis*;137(1):215-21, 1998.
- ❖ Zoratti EM, Havstad S, Rodriguez J, Robens-Paradise Y, Lafata JE, McCarthy B. Health service use by African Americans and Caucasians with asthma in a managed care setting. *Am J Respir Crit Care Med*;158(2):371-7, 1998.

ABSTRACT

High-density lipoproteins (HDL) confer a cardiovascular protective status so there is substantial interest in investigating HDL metabolism. Ninety-five Brazilian adults were studied: 48 hyperalphalipoproteinemic (HALP), defined as having HDL-cholesterol at and above the 90th percentile for a local population (n=1700), and 47 controls (CTL) defined as having it below the 90th percentile. The activities of lipid transfer proteins and enzymes involved in the plasma reverse cholesterol transport and the prevalence of factors that modulate HDL metabolism- alcohol consumption, ponderosity, physical exercise, menopause and use of hormone replacement treatment (HRT) in women- were measured, as well as the prevalence of cardiovascular disease (CVD) and of various risk factors for coronary heart disease: dyslipidemia, hypertension, smoking habit and family history of coronary heart disease. The HDL₂/HDL₃ cholesterol and triglyceride ratios were similar in both groups. Postheparin lipoprotein lipase and hepatic lipase activities were altered in HALP (unesterified fatty acid released as nmol FFA/mL/h). HL was 40% lower (1410 ± 103 in HALP, n=43 x 2370 ± 231 in CTL, n=43) and LPL activity was 35% higher in HALP (5301 ± 317 in HALP, n=43 and 3444 ± 255 in CTL, n=43). Phospholipid transfer protein and cholesteryl ester transfer protein activities were similar in the two groups. They showed no differences in their frequencies of cardiovascular disease. The frequency of physical exercise was higher in HALP. In HALP, HDL-chol was associated with BMI, LPL and apo A-I; HDL₂-chol with apo A-I and LPL and HDL₃-chol with apo A-I and age. HRT explained apo A-I and the use of alcohol and ponderosity and their interaction explained the LPL's activity. CETP was influenced by race (non-white) and PLTP by age (inverse). The unique phenotype found in this Brazilian HALP population – low HL and high LPL – was not atherogenic and could be determined by genetic components, which future work will focus on.

INTRODUCTION

Numerous epidemiological studies demonstrate the inverse relationship between HDL-cholesterol (chol) and coronary heart disease (CHD) (1, 2). Several studies and a meta-analysis of clinical trial data revealed that a reduction of 1 mg/dL in HDL-chol is accompanied by a 2 and 3% reductions in cardiovascular risk, respectively in men and women (3, 4).

Some studies indicate that this negative relationship is due to HDL₂ and not HDL₃, the main sub-fraction of HDL (5, 6). However, this is a very controversial subject (7).

Although the mechanisms for the antiatherogenic effect of HDL has not been completely established, its participation in the reverse cholesterol transport (RCT), a very efficient mechanism of disposal of excess cholesterol from tissues to the liver for excretion, may be one of its main protective actions. HDL play a pivotal role on RCT. This system involves free cholesterol efflux from cell membranes, via ABCA1 (ATP binding cassette transporter) (8, 9) and SR-B1 (scavenger receptor type B class 1) (10, 11) to nascent HDL, containing apolipoproteins (Apo) A-I and A-II, derived in part from the gut, the liver and the lipolysis of triglyceride rich lipoproteins by lipoprotein lipase (LPL). Cholesterol esterification by lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) and the transfer of the cholesteryl ester to triglyceride rich lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein (CETP) are subsequent steps of RCT. The cholesteryl ester can be transferred to the liver directly through SR-B1 receptors (11). Hepatic lipase (HL) and phospholipid transfer protein (PLTP) are involved in the interconversion of the two main HDL sub-fractions, regenerating acceptor lipoproteins for cholesterol efflux (12).

Besides the participation in the RCT, HDL has several pleiotropic effects that are cardioprotective: namely anti-oxidative (13), anti-inflammatory (14); anti-thrombotic (14); the reduction in platelet aggregation (15), in monocyte adhesion and in smooth muscle cell proliferation (14).

The antiatherogenic effects of HDL are apparently quite complex: with data from population and clinical studies showing that the status of high levels of HDL are not always protective (16) and as well, patients with HDL deficiency do not necessarily present premature atherosclerosis (17).

HDL levels in plasma are modulated by environmental factors like age, sex, race, ponderosity, diet and sedentariness, besides the genetic factors. Genetic studies in different populations indicate that the contribution of the genetic component to the variation of HDL is large: 44% (18), 83% (19) and 65% (20).

Hiperalphalipoproteinemia (HALP) is a metabolic state that has been associated to primary and/or secondary causes. In different studies it has been associated more frequently with familial CETP (1, 21, 22), or HL (6, 23, 24) deficiencies. It has also been found in a family with an increased production rate of Apo A-I (25) or in its polymorphism. Secondarily, several drugs, alcoholism, primary biliary cirrhosis and emphysema are causes also pointed.

The specific objectives of this study were to investigate which phenotype determined the moderate HALP and what factors influenced HDL metabolism in the selected homogeneous group of adults. To find out if HALP patients were more resistant to atherosclerosis, the frequencies of cardiovascular disease and of risk factors for CHD were carefully evaluated. To better understand the HDL metabolism in HALP the relative power of influence that LPL, CETP, HL, PLTP and Apo A-I exert on HDL and its main sub-fractions were measured, using a multiple linear regression analysis that hierarchically determined also what environmental factors could modulate these proteins' activities.

MATERIALS AND METHODS

Experimental protocol:

The study comprised 95 individuals native of the State of São Paulo (Brazil) and defined by their HDL-chol as controls (CTL, n= 47) for values below 68mg/dL and hyperalphalipoproteinemic (HALP, n=48) for HDL-chol equal and above 68mg/dL, the 90th percentile for a local population attended by the Clinical Chemistry Laboratory at the State University of Campinas Hospital (n=1700). After selection, they were invited by a letter to take part in this study. They came from urban areas in the State of São Paulo. They were adults, from 21 to 79 years of age (y), 21% males (M) and 79% females (F) in the control group and from 23 to 77 years, 21% M and 79% F in HALP; 59% were white and 41% non-white in CTL and 68% versus 32% in HALP. They had their blood pressure and anthropometric data measured during a complete clinical examination, had a blood sample drawn for the requested baseline tests and

answered a detailed questionnaire that was composed of three parts: the first had information on the presence of coronary, cerebral and peripheral artery diseases and on history of coronary revascularization procedures: PCTA (percutaneous transluminal coronary angioplasty), CABG (coronary artery grafting bypass) or others. The second part contained questions on the presence of the following risk factors for the development of CHD: dyslipidemia (DYS), hypertension (HYP), cigarette smoking (SMO) and positive family history of CHD (FAM). The third part of the questionnaire was on the presence and frequency of alcohol consumption (ALCO), physical exercise (EXER), use of hormone replacement therapy (HRT) or contraceptive pills (CONTR) and other drugs like statins, fibrates, phenytoin and thyroid hormones. Cases of renal, hepatic, gastrointestinal, pulmonary, endocrine and oncological diseases were excluded from the study. The presence of menopause (MENO) was defined as the ages ≥ 51 years by the criteria of the North American Menopause Society (26). Some of the patients, if recommended, had their electrocardiogram (ECG) taken. The two groups were selected to be matched by race, sex, body mass indexes [BMI-weight (kg)/height (m^2)], waist circumference and were roughly matched for their diets. The participants were defined as being overweight if BMI ≥ 25 Kg/ m^2 (ponderosity) (PON). The participants were classified as dyslipidemic (DYS) using the recent National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III (NCEPIII) (27) classification for: LDL-cholesterol ≥ 100 mg/dL and triglycerides ≥ 150 mg/dL.

The blood samples were drawn in the fasting period in all participants. Heparin was injected intravenously (100UI/Kg of body weight, Lique mine[®], Roche) as described (28) for lipases' measurements and 15 min after, the samples were collected. The plasma was isolated by centrifugation at 4° C, 1000g for 10 minutes.

All procedures followed were approved by the Ethical Committee of the School of Medicine of the State University of Campinas and all participants gave written informed consent to participate in the study.

Biochemical measurements:

Plasma glucose, urea, uric acid, alanine aminotransferase and δ - glutamiltransferase were assayed in an automated system (Mega- Bayer) using enzymatic methods by Merck (Merck, Darmstadt, Germany).

TSH was measured using by electrochimoluminescence using a commercial kit in the Elecsys (Roche).

Lipid, Apolipoprotein and Lipoproteins analysis:

Total cholesterol (chol) (Merck, Darmstadt, Germany) and triglyceride (Tg) (Merck, Darmstadt, Germany) were determined using enzymatic diagnostic reagents provided by Merck in an automated system (Mega-Bayer). Free fatty acids (FFA) and phospholipids (PL), by enzymatic colorimetric assays (Wako Chemicals, VA, USA).

Plasma HDL-cholesterol was measured in the in the supernatant after precipitation of apoB₁₀₀-containing lipoproteins. HDL₂ and HDL₃ were separated by sequential microultracentrifugation (Airfuge, Beckman). LDL-cholesterol (LDL-chol) was estimated by the Friedewald's formula (29).

Apolipoproteins A-I, B₁₀₀ and Lp (a) were measured by nephelometric assays in the system Array 360 (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Apolipoproteins A-II was measured by nephelometric assays in the Dade Boehringer system (Boehringer, Germany).

Determination of Lipases and Transfer Proteins:

Lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL) activities were quantified in post-heparin plasma samples, on the basis of fatty acid release, using a radiolabeled triolein emulsion as the substrate and NaCl (1M) as the LPL inhibitor (28). The results were expressed as nmol FFA/mL/hour.

The cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity was measured by an exogenous assay (41). It measures the transfer of ¹⁴C-Cholesteryl ester (CE) between donor exogenous ¹⁴C-HDL and an exogenous unlabeled acceptor mixture of VLDL plus LDL. The lipoproteins were isolated from a pool of normolipidemic plasmas. The plasma CETP source was incubated for 4h at 37°C with 50nmol of ¹⁴C-HDL and 1000μmol of unlabeled LDL in tris buffer. The blank controls were obtained from the reaction mixture at 37°C without plasma. After apoB₁₀₀ containing lipoprotein precipitation, radioactivity remaining in the supernatant was determined by scintilography. The results were expressed as percent of cholesteryl ester transferred from HDL per hour.

The phospholipid transfer protein was measured by an exogenous radiometric method using phospholipid liposomes as the substrate (30) and an HDL pool, obtained from plasma donors as the acceptor. The activity was expressed as the rate of phospholipid transferred to HDL per hour.

The assays for CETP, PLTP and lipases were conducted in triplicate. The inter-assays coefficients of variation were 16%, 2%, 9% and 8% respectively for CETP, PLTP, LPL and HL.

Statistics:

The data were analyzed by the SAS statistical package utilizing the following tests to measure differences between the groups: Mann-Whitney, Chi-Square and Fisher's exact, all at the significance level of 5%; levels between 5 and 10% were considered marginally significant. Triglycerides, HL and LPL were log transformed. The Spearman test was used to correlate the variables in both groups. A hierarchical multiple linear regression analysis was used to assess the influence of specific plasma proteins on HDL-cholesterol concentrations (and its sub-fractions) and on HDL-triglyceride sub-fractions. The results are expressed as coefficients of determination R^2 , that represents the percent of variation in the dependable variables explained by the independent variables. The independent predictors of HDL were: sex (women/men), age (all ages), BMI (all BMI), race (white/non white), LH (log), LPL (log), CETP, PLTP and Apo A-I. The dependable variables were HDL-chol, HDL₂-chol and Tg and HDL₃-chol and Tg. Sequentially, several independent variables were tested for their influence on these proteins: sex, age, race, BMI, use of alcohol, physical activity, menopause, use of HRT or of contraceptive pills.

RESULTS

Clinical and Biochemical Characteristics of the Participants:

Tables 1 and 2 summarize the clinical and biochemical characteristics of the participants. The sex distribution was similar in both groups but HALP were older than CTL ($p=0.0294$) although the difference was not large; 38 females and 10 males, with an age range between 23 to 69 years and 38 to 77 years, respectively, comprised the HALP group; their HDL-chol ranged from 68 to 100 mg/dL; 47 controls with HDL-chol between 34 and 66 mg/dL, were distributed as 37 females and 10 males, with an age ranges from 29 to 68 years and 21 to 79 years, respectively.

No differences were observed for glucose levels, blood pressure ($p=0.0737$, systolic), waist circumference and BMI. The results of the electrocardiograms (positive/negative) were similar in the two groups: 4/21 (HALP) and 3/31 (CTL).

No differences were also found in the baseline tests measuring metabolic variables such as thyroid, renal and liver functions, and the values were in the reference ranges; (data as mean $\pm$ standard error of mean, CTL x HALP, number of individuals): TSH (uIU/mL): 1.66 ± 0.5 (20) x 1.47 ± 0.5 (20); uric acid (mg/dL): 4.6 ± 0.2 (28) x 5.0 ± 0.3 (33); urea (mg/dL): 28 ± 1 (29) x 29 ± 2 (29); alanine aminotransferase (U/L): 15 ± 1 (28) x 23 ± 6 (34) and δ -glutamyltransferase (U/L) $27. \pm 5$ (28) x 54 ± 11 (31).

Lipids, Apolipoproteins and Lipoproteins:

Table 2 shows plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins levels. Concentrations of cholesterol, HDL-chol and apo A-I were higher in HALP, respectively 16%, 38% and 24%, as expected by the selection criteria of the cases, but the participants were classified as moderately HALP. Apo A-II showed a trend to higher values ($p=0.0659$) in HALP probably because it was measured in a fewer number of participants. LDL-chol, apo B-100, phospholipids and Lp (a) were similar in both groups. Free fatty acids were equal, although measured in a fewer number of participants. The triglyceridemia showed a trend to lower values (14%) in HALP ($p \leq 0.0578$).

When the lipid composition of HDL sub-fractions was analyzed (Table 3) there were striking differences between the groups for chol in both HDL sub-fractions, but not for Tg. The ratios HDL₂/HDL₃ for chol and Tg were similar in both groups; also no bimodal distributions were found.

Lipases and transfer proteins and its metabolic relationships:

Fasting post-heparin plasma LPL was higher in HALP by 35%, but the activity of HL was 40% lower when compared to controls (Table 4, Fig. 1).

Table 5 displays the associations between several parameters in HALP and CTL: LPL correlated positively with HDL-chol and HDL₂-chol in HALP ($r= 0.42$ and 0.40 respectively); HL correlated negatively with Tg ($r = -0.33$) in HALP; in CTL HL correlated negatively with HDL₃-Tg ($r= -0.33$).

PLTP correlated positively with PL in HALP ($r=0.37$); in CTL it correlated negatively with chol, LDL-chol and apo B₁₀₀ ($r= -0.37, -0.39, -0.38$ respectively).

The exogenous CETP activity was similar in both groups. In HALP, CETP was correlated positively with HDL₃-Tg ($r=0.31$).

Apo A-I correlated positively in HALP with HDL-chol ($r=0.55$) and its sub-fractions (HDL₂-chol; $r=0.42$ and HDL₃-chol, $r=0.54$) in CTL, apo A-I correlated with chol (0.30), Tg (0.34), HDL-chol (0.58), and both sub-fractions- HDL₂-chol and HDL₃-chol (0.50 and 0.48).

Prevalence of Cardiovascular Disease and Risk Factors for Coronary Heart Disease:

Table 6 presents the distribution in HALP and CTL of cardiovascular disease and its main risk factors. The prevalence of hypertension was higher in HALP ($p \leq 0.0418$). Smoking was lower in HALP and statistically different from controls. All the others risk factors distributions were similar in the two groups. CVD was highly prevalent in both groups, but HALP apparently did not show cardioprotection. The frequency of dyslipidemia in this population is very high, in part owing to the more strict NCEP III diagnostic criteria used in this study. The use of alcoholic beverages was high in both groups and included beer, wine and *cachaça* (a Brazilian drink).

Distribution of Secondary Factors that Modulate Plasma HDL:

The frequency of physical exercises was higher in HALP than in CTL (Table 7). Physical exercises comprised walking, swimming, biking and anaerobic exercises. The ponderosity, physical activity and smoking frequencies were comparable to the described earlier for a Brazilian population by our research group (31).

No differences were observed between the groups for the use of hormones and contraceptives by the participants of this study.

Multiple Linear Regression Analysis:

In order to evaluate if some of the observed relationships in the univariate analysis are independent of each other and true, the effects of age, sex, race, BMI, LPL, HL, PLTP, CETP and Apo A-I on HDL-chol and Tg and its sub-fractions in HALP, individuals were studied by multiple linear regression analysis, where HDL₂-chol, HDL₃-chol, HDL₂-Tg, and HDL₃-Tg were addressed as dependent variables and each one of the five proteins above as independent variables (Table 8).

The results showed that in HALP (Table 8), HDL-chol was independently determined by Apo A-I, LPL and BMI, by 56%. HDL₂-chol was independently correlated to LPL plus Apo A-I

- 33%. Age and Apo A-I explained 37% of the variation in HDL₃-chol. HL did not explain any of the dependent variables.

In controls (data not shown) HDL-chol was independently determined by apo A-I ($R^2=0.32$) and HDL₂-chol by apo A-I ($R^2=0.34$). HDL₃-chol was explained by: CETP (inverse), LPL, sex (women) and BMI (inverse) ($R^2=0.48$). HDL₃-Tg was independently determined by age, race (white) and BMI (inverse) ($R^2=0.48$).

Hierarchically the variables that were significant in the regression models above were tested (dependent variables) for secondary and environmental factors that most strongly correlated with them (independent variables): age, sex, race, BMI, use of alcohol; physical activity; menopause; hormone replacement therapy, use of contraceptive pills as shown in Table 9.

In HALP, LPL was determined by BMI, use of alcohol (positive), BMI plus use of alcohol (inverse) ($R^2=0.27$), CETP was independently determined by race (non-white) ($R^2=0.13$) and PLTP by age (inverse) ($R^2=0.15$).

Apo A-I was independently determined by hormone replacement therapy ($R^2=0.15$). None of the other secondary modulators determined HL or the other regulator proteins.

For controls (data not shown) variations in Apo A-I were accounted for by menopause, use of contraceptive pills and race (non-white) ($R^2=0.38$), CETP by use of HRT and of contraceptive pills ($R^2=0.26$). HL was independently associated with age (inverse) and physical exercise ($R^2=0.26$).

The use of other drugs was not evaluated because of the small number of participants using them.

DISCUSSION

HDL, an independent negative risk factor for coronary heart disease (4) is a therapeutic target, so there is substantial interest in understanding its metabolism.

This study evaluated the HDL metabolism modulators and the cardiovascular status in patients with a moderate HALP. It showed a plasma phenotype, to our knowledge not described before in the literature.

This phenotype was accounted by a conjugated decrease in HL and an increase in LPL associated with hypercholesterolemia, increases in HDL₂-chol and HDL₃-chol, in Apo A-I, a trend to decreased plasma tryglicerides and borderline hyperbetalipoproteinemia. HALP and controls in this study had not different profiles of HDL₂/HDL₃ -chol ratios, as described earlier by Sich et al (25, 32). Two other important components of the plasma reverse cholesterol transport system, namely CETP and PLTP, were investigated but were not altered in HALP.

During the LPL dependent hydrolysis of chylomicrons and VLDL, HDL₂-chol (13, 34) is generated. Like LPL, HL hydrolysis Tg and PL but unlike LPL there is an inverse relationship of HL and HDL, that reflects the removal of HDL₂- chol from the circulation. Thus these two enzymes have reciprocal functions in the metabolism of HDL. Oliveira e Silva et al (34) proposed that Apo A-I, Apo A-II, triglycerides and hepatic lipase explain 80% of the variation in HDL-chol. In the present study LPL -but not HL-, Apo A-I and BMI explained 58% of HDL-chol variation in HALP.

Univariate linear regression analysis indicated relationships between some variables: HDL-chol and HDL₂ -chol correlated strongly with LPL and Apo A-I. In sequence some multiple regression models were proposed: 33% of the variation of HDL₂-chol was determined by LPL and Apo A-I; for HDL₃-chol 37% was determined by Apo A-I and age and 10% of HDL₂-Tg variation was explained by race.

All participants were normotriglyceridemic although HALP presented a trend to lower Tg levels by 14%. This fact could reflect an increased lipolysis rate of triglyceride-rich lipoproteins in HALP due to increased LPL activity, simultaneously with reduced HL activity. The free fatty acids levels were not different between the groups and this fact could reflect a higher extraction of FFA from the circulation leading to increased hepatic production of VLDL and sub-sequentially LDL.

Lp (a) levels were not different between the group and to our knowledge this lipoprotein was not described in HALP by others authors.

LPL deficiency, present in cases of the mutation Gly188Glu, Asp9Asn and Asn291Ser is associated with reduced levels of HDL-chol and hypertriglyceridemia that confer an atherogenic lipoprotein profile. But atheroprotection in the presence of the mutation Ser447Stop, as described by Wittrup et al (36), leads to a modest increased in plasma HDL-chol and LPL

activity. Taskinen et al described increased LPL activity in HALP patients (37). HL reduced activity can be secondary to familial HL deficiency and a cause of HALP. In these patients abnormalities in triglyceride rich lipoproteins are present like the presence of beta-VLDL, enrichment in Tg of lipoproteins in the $d > 1.006 \text{ g/mL}$ leading to increased buoyancy (38). Low HL has been indicated as a novel risk factor for the development of atherosclerosis (39). However, the literature is not definitive about its proatherogenic role: studies on genetic polymorphisms on HL are not conclusive (23, 40); some studies on HL deficient states in humans, but not all, have reported the presence of atherosclerosis. In HL deficiency the increase in HDL is opposed by the increase in remnant lipoproteins and, in consequence, the risk may disappear (41). Three groups described premature CHD in HL deficiency (16, 38). In 1995 Hirano (16) showed that CHD is related inversely to CETP and HL activity.

CETP deficiency was not found in this study. It is characterized by increased HDL₂ rich in CE (25) and is the most frequent cause of HALP. Although it is more frequent in Japanese population, some recent studies describe it in Caucasian groups (30). When there is CETP deficiency, higher levels of HDL can be pro-atherogenic because of changes in LDL and HDL particles with consequent impairment in the reverse cholesterol transport (16).

It is known that Apo A-I modulates HDL (34). Two mutations of this protein were described leading to low HDL and increased Tg levels (42). Rader et al (43), described an increased production of apolipoprotein A-I in HALP, associated with elevated plasma levels of HDL, apo A-I and Lp- A-I. They concluded that a selective upregulation of apo A-I production is one cause of HALP and possibly this phenotype confers a protection against the atherosclerotic disease.

Another study by Hedrick et al (44) showed increased expression of apo A-II that is linked to the generation of a non-functional large HDL, a worse substrate for HL (44).

Several secondary or environmental factors were evaluated in this study. The HALP group presented higher frequency of physical activity and no differences in the other secondary factors evaluated.

In many studies physical exercise has a positive association with HDL-chol levels (42), due to increase LPL and reduced HL activities (45), as well as increase in the activity of CETP and LCAT (46).

However when a multiple regression model was proposed in this study for HALP, physical exercise had no effects on HDL modulators. Other secondary factors accounted for the variation of the regulator proteins: Apo A-I was explained by the use of HTR in women; LPL by alcohol, BMI and alcohol plus BMI (inverse); CETP by the non-white race and PLTP by age (inverse).

Another factor tested, hormone replacement therapy, suppresses the activity of HL but not of LPL (47). Walsh et al (48), showed increases of 8% and 16% in HDL-chol and Apo A-I after HRT. In HALP HRT explained Apo –AI partially.

Higher lipoprotein lipase can be associated with alcohol. Alcohol was shown to increase HDL-chol by 3,99mg/dL when consumed at 30g/dL/day in a meta-analysis of 42 studies (49). The mechanisms are a possible increase of LPL and reduced CETP (44, 50).

() shows a reduction of the activities of both LPL and HL. In our study alcohol explained partially LPL activity in HALP.

The body mass index has been described as negatively related to HDL-chol, and this effect may be due to hepatic lipase modulation (23). In our study ponderosity explained partially LPL.

Genetic studies in families (19), showed that the contribution of the genetic components is much larger than the environmental for several plasma lipids, lipoprotein, apolipoproteins and regulator proteins. The genetic contribution to HDL-chol levels reaches 80% (18).

Vega et al (51) demonstrated that differences between African men (lower HL activity) and white American men, that could be due to the genetic polymorphism in 514 position, leading to higher HDL-chol levels.

The studied groups presented different distribution of risk factors for CHD but similar final CHD risk score numbers: HALP presented HDL-chol levels equal and above 68mg/dL but a higher hypertension frequency and older ages (75th percentile: 50 years for CTL and 60 years for HALP, not shown). The controls were younger, not hypertensive but smoked more and had HDL-chol below 68mg/dL. It is interesting to notice that the prevalence of dyslipidemia is equally high between the groups.

The metabolic state in HALP here described was not atheroprotective since the groups are similar in terms of the frequency CVD manifestations.

We believe that in this group of HALP the simultaneous conjunction of the changes in the activities of the regulator protein -decreased HL and increased LPL- may lead to compensatory mechanisms; HL deficiency generates HDL particles that are relatively rich in triglycerides, and are not as good substrates for CETP; on the other hand, the increased LPL activity favors the generation of pre β -HDL and leads to an increased reverse cholesterol transport.

In conclusion, these results taken together show that in this Brazilian population presenting the HALP syndrome, with the unique mixed phenotype of HL deficiency and increased LPL activity, there was no modulation of HL by secondary factors and a partial modulation of LPL by BMI and alcohol. Therefore, the genetic components could be the primary cause of HALP, and genetic studies should aim at characterizing the genotype of these patients.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank Helymar Machado and Hildete Pinheiro for the statistical support and Miriam Danelon for the technical work.

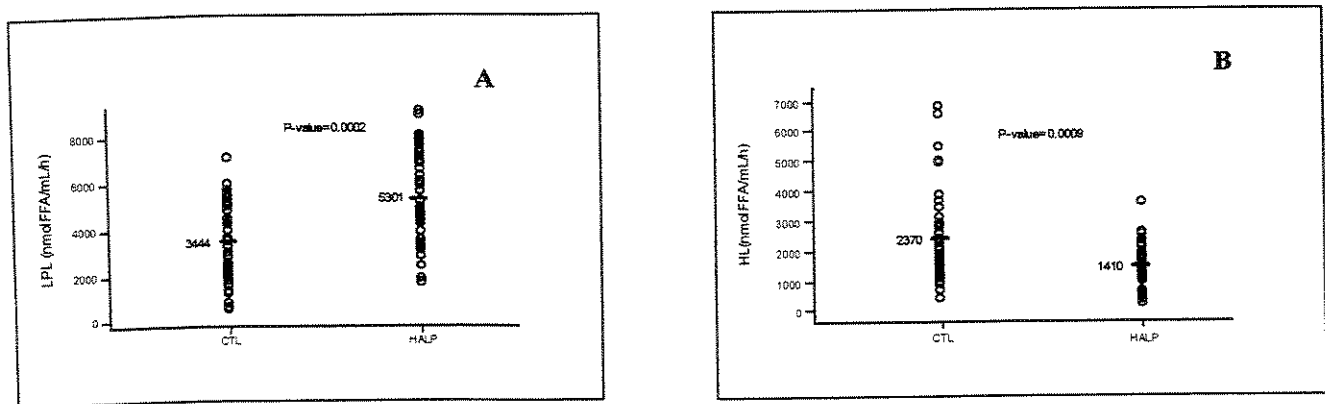


FIGURE 1 - Scatter plots of (a) lipoprotein lipase and (b) hepatic lipase activities in CTL and HALP. The horizontal lines represent the means. Statistical comparisons were done by the Mann-Whitney Test.

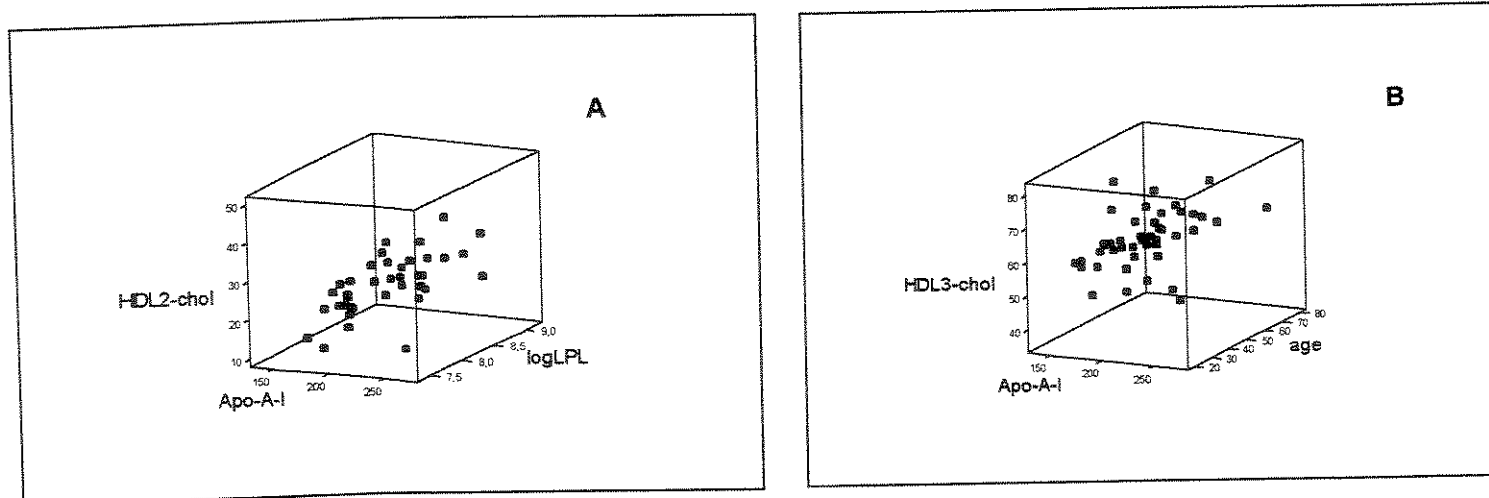


FIGURE 2: Regression plots for HDL₂-chol (A) and HDL₃-chol (B)

TABLE 1– ANTHROPOMETRIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF HALP AND CTL

PARAMETERS	HALP (n)	RANGE	CTL (n)	RANGE
Age (years)	49 ± 2 (48) [‡]	23-77	44 ± 2 (47)	21-79
Sex (M/F)	10 / 38	—	10 / 37	—
BMI (Kg/m ²)	24 ± 1 (45)	16-37	25 ± 1 (46)	18-36
Waist. (cm)	79 ± 2 (44)	58-117	82 ± 2 (47)	65-108
BP (Sistolic)(mmHg)	130 ± 32 (45)	80-210	123 ± 21 (46)	100-170
BP (Diastolic)(mmHg)	84 ± 19 (45)	50-120	82 ± 17 (46)	60-100
Glucose (mg/dL)	87 ± 2 (47)	56-123	88 ± 1 (43)	72-109

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects). BP= blood pressure. Statistical comparisons between HALP and controls by Mann-Whitney test: [‡]p ≤ 0.0294 and Chi-Square.

TABLE 2 – LIPIDS, LIPOPROTEINS AND APOLIPOPROTEINS IN HALP AND CTL

PARAMETERS	HALP (n)	RANGE	CTL (n)	RANGE
Chol (mg/dL)	232 ± 6 (48) [‡]	142-329	196 ± 6 (47)	127-306
LDL-chol (mg/dL)	134 ± 6 (47)	59-223	126 ± 5 (47)	66-215
HDL-chol (mg/dL)	81 ± 2 (48) [#]	68-110	50 ± 1 (47)	34-66
Tg (mg/dL)	86 ± 6 (48)	30-267	100 ± 6 (47)	31-200
FFA (mEq/L)	0.96 ± 0.06 (32)	0.27-1.73	0.96 ± 0.09 (10)	0.36-1.42
PL (mg/dL)	256 ± 11 (32)	120-375	246 ± 10 (29)	110-342
Apo A-I (mg/dL)	186 ± 4 (46) [#]	141-271	141 ± 3 (47)	53-184
Apo A-II (mg/dL)	46 ± 2 (18)	30-70	39 ± 3 (7)	30-50
Apo B100 (mg/dL)	98 ± 4 (46)	47-164	100 ± 4 (47)	54-187
Lp(a) (mg/dL)	30 ± 5 (43)	2-188	37 ± 5 (46)	2-111

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects).
 Statistical comparisons between HALP and controls by Mann-Whitney test: [‡]p ≤ 0.0002,
[#]p ≤ 0.0001

TABLE 3 – COMPOSITION IN CHOLESTEROL AND TRIGLYCERIDES OF HDL SUB-FRACTIONS IN HALP AND CTL

PARAMETERS	HALP (n)	RANGE	CTL (n)	RANGE
HDL ₂ -chol (mg/dL)	21 ± 1 (46) [‡]	12-46	13 ± 1 (45)	4-28
HDL ₃ -chol (mg/dL)	60 ± 1 (46) [‡]	37-79	37 ± 1 (45)	24-50
HDL ₂ / HDL ₃ chol	0.36 ± 0.02 (46)	0.20-0.86	0.35 ± 0.02 (45)	0.13-0.93
HDL ₂ -Tg (mg/dL)	18 ± 1 (46)	4-32	18 ± 1 (44)	4-35
HDL ₃ -Tg (mg/dL)	32 ± 2 (46)	12-57	30 ± 2 (45)	8-53
HDL ₂ / HDL ₃ -Tg	0.52 ± 0.02 (46)	0.17-1.04	0.60 ± 0.03 (44)	0.30-1.21

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects).
 Statistical comparisons between HALP and controls by Mann-Whitney test: [‡]p ≤ 0.0001

TABLE 4 – LIPASES AND TRANSFER PROTEINS' S ACTIVITIES IN HALP AND CTL

PARAMETERS	HALP (n)	RANGE	CTL (n)	RANGE
LPL (nmol FFA/mL/h)	5301 ± 317 (43) [‡]	1679-9131	3444 ± 255 (43)	555-7099
HL (nmol FFA/mL/h)	1410 ± 103 (43) ^{##}	218-3602	2370 ± 231 (43)	404-6848
CETP (%)	10 ± 1 (45)	2-20	11 ± 1 (37)	5-18
CETP/Tg (%/mg/dL)	0.14 ± 0.01 (45)	0.02-0.36	0.12 ± 0.09 (37)	0.04-0.29
PLTP (%)	11 ± 1 (44)	2-23	12 ± 1 (34)	0-21

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects).
 Statistical comparisons between HALP and controls by Mann-Whitney test: [‡] p ≤ 0.0002;
^{##}p≤0.0006

TABLE 5 - DISTRIBUTION OF CARDIOVASCULAR DISEASE AND ITS RISK FACTORS IN HALP AND CTL

VARIABLES	HALP	CTL
CVD	10 / 48	06 / 47
DYS	36 / 48	35 / 47
HYP	17 / 48 [‡]	08 / 47
SMO	06 / 48 ^{##}	18 / 46
FAM	08 / 48	05 / 47

Data as positive cases/group; CVD: cardiovascular disease, DYS: dyslipidemia; HYP: hypertension; SMO: smoking; FAM: family history of CHD; Chi-Square test: [‡]p ≤ 0.0418 and ^{##}p ≤ 0.0031 as compared to CTL

TABLE 6 - DISTRIBUTION OF SECONDARY FACTORS THAT MODULATE PLASMA HDL IN HALP AND CTL

VARIABLES	HALP	CTL
ALCO	25/48	19/46
PON	29/48	23/47
PHYS	22/48 [‡]	10/47
MENO	14/38	07/37
HRT	08/16	02/06
CONTR	06/38	05/37

Data as positive cases/group ALCO: use of alcohol; PON: ponderosity; PHYS: physical activity; MENO: menopause; HRT: hormone replacement therapy; CONTR: use of contraceptive pills; Chi-Square and Fisher's exact: [‡]p ≤ 0.0113 as compared to CTL

TABLE 7 - UNIVARIATE LINEAR REGRESSION COEFFICIENTS FOR APOA1, LIPASES AND TRANSFER PROTEIN'S ACTIVITIES

PARAMETERS	GROUPS	LPL	HL	PLTP	CETP	Apo A-I
Chol	H			NS		NS
	C			-0.37 [‡]		0.30 [‡]
Tg	H		-0.33 [‡]			NS
	C		NS			0.34 [‡]
LDL-chol	H			NS		
	C			-0.39 [‡]		
HDL-chol	H	0.42 ^{##}	-			0.55 ⁸⁸⁸
	C	NS				0.58 ⁸⁸⁸
HDL ₂ -chol	H	0.40 ^{##}				0.42 ^{##}
	C	NS				0.50 ^δ
HDL ₃ -chol	H					0.54 ^δ
	C					0.48 [*]
HDL ₃ -Tg	H		NS		0.31 [‡]	
	C		-0.33 [‡]		NS	
PL	H	--		0.37 [‡]		
	C			NS		

H=HALP, C=CONTROLS; Spearman Coefficients: [‡]p ≤ 0,0500, [#]p ≤ 0.0100, ^{##}p ≤ .0050, ^δp ≤ 0.0005, ⁸⁸⁸p ≤ 0.0010, ⁸⁸⁸⁸p ≤ 0.0001

TABLE 8 - INFLUENCE OF THE REGULATOR PROTEINS ON PLASMA HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL AND ITS SUB-FRACTIONS IN HALP

MODELS	INDEPENDENT VARIABLES	p- VALUES	CUMULATIVE R ²
For HDL-chol (n=35)	BMI		
	Log LPL		
	Apo A-I	<0.0001	0.56
For HDL ₂ -chol (n=35)	Log LPL		
	Apo A-I	0.0016	0.33
For HDL ₂ -Tg (n=46)	Race	0.0314	0.10
For HDL ₃ -chol (n=35)	Age		
	Apo A-I	0.0006	0.37

Independent Variables: Apo A-I; LPL; HL; CETP; PLTP; SEX, AGE, RACE and BMI

TABLE 9 - INFLUENCE OF SECONDARY FACTORS ON PLASMA LIPASES AND TRANSFER PROTEINS IN HALP

MODELS	INDEPENDENT VARIABLES	p- VALUES	CUMULATIVE R ²
For LPL (n=33)	BMI		
	Alcohol		
	BMI +Alcohol	0.0271	0.27
For CETP (n=30)	Race	0.0473	0.13
For PLTP (n=28)	Age	0.0438	0.15
For Apo A-I (n=28)	HRT	0.0397	0.15

Independent Variables: use of alcohol, ponderosity, physical activity, menopause, hormone replacement therapy, use of contraceptive pills, sex, race and age

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TRABALHO CIENTÍFICO

1. Yamashita S, Maruyama T, Hirano KI, Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y: Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 152(2):271-85, 2000.
2. Zambon A, Hokanson JE: Lipoprotein classes and coronary disease regression. *Current Opinion on Lipidology*;9(4):329-36,1998.
3. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al: High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79(1):8-15, 1989.
4. Grundy SM: United states cholesterol guidelines 2001: expanded scope of intensive low-density lipoprotein-lowering therapy. *Am J Cardiol* 11;88 (7 Suppl 2):23-7, 2001.
5. Ohta T, Saku K, Takata K, Nagata N, Maung KK, Matsuda I: Fractional esterification rate of cholesterol in high density lipoprotein (HDL) can predict the particle size of low density lipoprotein and HDL in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 135(2):205-12, 1997.
6. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH: A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 8;325(6):373-81, 1991.
7. Atger V, Giral P, Simon A, Cambillau M, Levenson J, Garipey J, Megnier JL, Moatti N: High-density lipoprotein subfractions as markers of early atherosclerosis. PCVNETRA Group. *Prevention Cardio-Vasculaire en Medecine du Travail. Am J Cardiol* 15;75(2):127-31, 1995.
8. Dean M, Hamon Y, Chimini G: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J of Lipid Research* 42: 10071017, 2001.
9. Oram JF, Vaughan AM, Stocker R: ATP-binding Cassette Transporter A1 Mediates Cellular Secretion of alpha -Tocopherol. *J Biol Chem* 26;276(43):39898-902, 2001.
10. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, XU S: Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-20, 1996.
11. Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH: Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 98: 984-995, 1996.
12. Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR: Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 18:297-330, 1998.
13. Mead JR, Cryer A, Ramji DP: Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis?. *FEBS Lett* 462(1-2):1-6, 1999.
14. Stein O, Stein Y: Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 144(2):285-301, 1999.

15. 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* 12;274(46):33143-7, 1999.
16. Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, Arai T, Yanagi K, Takami S, Menju M, et al: Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 115(11):1849-56, 1995.
17. Carlson LA, Holmquist L, Nilsson-Ehle P: Deficiency of hepatic lipase activity in post heparin plasma in familial hyper-alpha-triglyceridemia. *Acta Med Scand* 219(5): 435-447, 1986.
18. Heller DA, de Faire U, Pedersen NL, Dahlen G, McClearn GE: Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *N Engl J Med* 328(16):1150-6, 1993.
19. Perusse L, Rice T, Despres JP, Bergeron J, Province MA, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C: Familial resemblance of plasma lipids, lipoproteins and postheparin lipoprotein and hepatic lipases in the HERITAGE Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11):3263-9, 1997.
20. Steinmetz J, Boerwinkle E, Gueguen R, Visvikis S, Henny J, Siest G: Multivariate genetic analysis of high density lipoprotein particles. *Atherosclerosis* 92(2-3):219-27, 1992.
21. Von Eckardstein A, Assmann G: High density lipoproteins and reverse cholesterol transport: lessons from mutations. *Atherosclerosis* 137: S7-S11, 1998.
22. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall A: Increased coronary heart disease in Japanese American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J. Clin. Invest.* 97: 2917-2923, 1996.
23. Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, et al: High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(4):910-7, 1999.
24. Gehrisch S, Kostka H, Tiebel M, Patzak A, Paetzold A, Julius U, Schroeder HE, Hanefeld M, Jaross W: Mutations of the human hepatic lipase gene in patients with combined hypertriglyceridemia/hyperalphalipoproteinemia and in patients with familial combined hyperlipidemia. *J Mol Med* 77(10):728-34, 1999.
25. Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Dallongeville J, Federspiel MC, Cherfils C, Rissonnier A, Turpin G, Beucler I: Characterization of two HDL subfractions and LpA-I, LpA-I:A-II distribution profiles and clinical characteristics of hyperalphalipoproteinemic subjects without cholesterol ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis* 138(2):351-60, 1998.
26. Consensus opinion of The North American Menopause Society: *Menopause*, Mar-Apr;7(2):27, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS TRABALHO CIENTÍFICO

27. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III. JAMA 2001 May 16;285(19):2486-97
28. Ehnholm C, et al. Preparation, characterization, and measurement of hepatic lipase. Methods Enzymol.129:716-38, 1986.
29. Friedewald, WT, Levy RI, Fredrickson, DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. Clin Chem 18:499-502, 1972.
30. 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 Sep 14;712(3):444-52
31. Castanho VS, Oliveira LS, Pinheiro HP, Oliveira HC, de Faria EC: Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a Brazilian population. BMC Public Health 1(1):3, 2001.
32. Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Egloff M, Auer C, Gautier V, Turpin G, Beucier I: Hyperalphalipoproteinemia: characterization of a cardioprotective profile associating increased high-density lipoprotein2 levels and decreased hepatic lipase activity. Metabolism 47(8):965-73, 1998.
34. De Oliveira e Silva ER, Kong M, Han Z, Starr C, Kass EM, Juo SH, Foster D, Dansky HM, Merkel M, Cundey K, Brinton EA, Breslow JL, Smith JD. Metabolic and genetic determinants of HDL metabolism and hepatic lipase activity in normolipidemic females. J Lipid Res 40(7):1211-21, 1999.
34. Goldberg IJ, Merkel M: Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. Front Biosci 6 D388-405, 2001
36. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. Circulation 8;99(22):2901-7, 1999.
37. Taskinen MR, Glueck CJ, Kashyap ML, Srivastava LS, Hynd BA, Perisutti G, Robinson K, Kinnunen PJ, Kuusi T: Post-heparin plasma lipoprotein and hepatic lipases. Relationships to high density lipoprotein cholesterol and to apolipoprotein CII in familial hyperalphalipoproteinemic and in normal subjects. Atherosclerosis 37(2):247-56, 1980.
38. Hegele RA, Little JA, Vezina C, Maguire GF, Tu L, Wolever TS, Jenkins DJ, Connelly PW: Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. Arterioscler Thromb 13(5):720-8, 1993.
39. Miller GJ, Miller NE: Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. Lancet 4;1(7897):16-9, 1975.
40. Nie L, Niu S, Vega GL, Clark LT, Tang A, Grundy SM, Cohen JC: Three polymorphisms associated with low hepatic lipase activity are common in African Americans. J Lipid Res 39(9):1900-3, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS TRABALHO CIENTÍFICO

41. Thuren T: Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol* 11(3):277-83, 2000.
42. Ordoñas JM, Carmena R, *Hiperlipidemias, Clínica e Tratamento*, Barcelona, Doyma, 1999.
43. Rader DJ, Schaefer JR, Lohse P, Ikewaki K, Thomas F, Harris WA, Zech LA, Dujovne CA, Brewer HB Jr. Increased production of apolipoprotein A-I associated with elevated plasma levels of high-density lipoproteins, apolipoprotein A-I, and lipoprotein A-I in a patient with familial hyperalphalipoproteinemia. *Metabolism* 1993 Nov;42(11):1429-34.
44. Hedrick CC, Castellani LW, Wong H, Lusis AJ. In vivo interactions of apoA-II, apo A-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *J Lipid Res* 2001 Apr;42(4):563-70
45. Gordon PM, Fowler S, Warty V, Danduran M, Visich P, Keteyian S: Effects of acute exercise on high density lipoprotein cholesterol and high density lipoprotein subfractions in moderately trained females. *Br J Sports Med* 32(1):63-7, 1998.
46. Gupta AK, Ross EA, Myers JN, Kashyap ML. Increased reverse cholesterol transport in athletes. *Metabolism* 42(6):684-90, 1993.
47. Teh EM, Dolphin PJ, Breckenridge WC, Tan MH: Human plasma CETP deficiency: identification of a novel mutation in exon 9 of the CETP gene in a Caucasian subject from North America. *J Lipid Res* 39(2):442-56, 1998.
48. Rakic V, Puddey IB, Dimmitt SB, Burke V, Beilin LJ. A controlled trial of the effects of pattern of alcohol intake on serum lipid levels in regular drinkers *Atherosclerosis* 137(2):243-52, 1998.
49. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ: Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 319(7224):1523-8, 1999.
50. Walsh BW, Spiegelman D, Morrissey M, Sacks FM: Relationship between serum estradiol levels and the increases in high-density lipoprotein levels in postmenopausal women treated with oral estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 84(3):985-9, 1999.
51. Vega GL, Clark LT, Tang A, Marcovina S, Grundy SM, Cohen JC: Hepatic lipase activity is lower in African American men than in white American men: effects of 5' flanking polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC). *J Lipid Res* 39(1):228-32, 1998.