

DA CLASSIFICAÇÃO DOS FENOTIPOS DE FREDRICKSON - perfis das lipoproteínas - AO ENTENDIMENTO DOS GENOTIPOS

ELISA MARIA CAMPOS

Departamento de Bioquímica. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

RESUMO

Neste texto, começaremos por ver os marcos históricos do trabalho experimental sobre lipoproteínas plasmáticas com aplicação clínica. Este trabalho iniciou-se por volta de 1950, década de expansão da Bioquímica. Assim, foram Gofman et al., em Berkeley, que estabeleceram o poder e a versatilidade da ultracentrífuga para o estudo das lipoproteínas e identificaram o colesterol das LDL como sendo o agente aterogénico. Em 1955, Havel et al., em Bethesda, utilizando a ultracentrífuga preparativa, mais simples, procederam ao isolamento das lipoproteínas plasmáticas e ao estudo da sua composição química. No entanto, fazia-se sentir a necessidade de uma técnica adaptada ao despiste de massas, uma vez que os estudos epidemiológicos de Framingham, iniciados em 1946, confirmaram a relação entre colesterolémia e aterosclerose. Em 1967, Fredrickson et al., aplicando a electroforese à separação de lipoproteínas propuseram a sua classificação de hiperlipidémias - suscitando alguma controvérsia, mas constituindo ainda hoje uma referência. Alaupovic, com o seu interesse pelo estudo das apolipoproteínas lançou a nomenclatura ABC pela qual são conhecidas. Em 1973, com o avanço das técnicas de biologia celular, Brown e Goldstein descreveram o receptor das LDL e a sua função na regulação da homeostase do colesterol, lançando as bases de uma classificação genética.

Concluiremos com a base genética das hiperlipidémias, através dos trabalhos de vários grupos de investigação, que estudaram, sobretudo, mutações na origem de hipercolesterolémias; a maioria das hipertrigliceridémias não está tão bem definida em termos genéticos.

Palavras-chave: lipoproteínas apolipoproteínas hiperlipidémia hiperlipoproteinémia dislipoproteinémia fenotipo genotipo mutações polimorfismos

SUMMARY

FROM FREDRICKSON'S CLASSIFICATION OF PHENOTYPES – lipoprotein patterns – to genotype comprehension

First, we will review the major episodes of the initial clinical investigations on lipoproteins. They were carried out in the 1950s, decade of the expansion of Biochemistry. Gofman and his colleagues, at Berkeley, established the power and versatility of the ultracentrifugation method to study the serum lipoproteins. This research group identified Low Density Lipoprotein cholesterol, rather than generic cholesterol as the atherogenic agent. In 1955, Havel et al. at Bethesda, reported a simpler method for the separation of serum lipoproteins by preparative ultracentrifugation, which permitted chemical analysis of defined fractions. However,

there was an obvious need for a technique to undertake a screening of a population because the epidemiological Framingham Study, started in 1946, had confirmed serum cholesterol levels as a major risk factor of atherosclerosis. In 1967, Fredrickson et al. applying electrophoresis methods to the separation of lipoproteins developed a classification of lipoprotein disorders, which was somewhat controversial, but it is still a reference. Alaupovic, pursuing his apolipoprotein studies, introduced the ABC nomenclature, the one in use today. In 1973, Brown and Goldstein described the LDL receptor and its function on regulating cholesterol homeostasis, laying the foundations of a classification of hyperlipoproteinemias on a genetic basis.

Then, we will review the genetic basis of lipoprotein disorders, through the work of several research groups, studying, mainly, mutations leading to hypercholesterolemias; most hypertriglyceridemias are not well defined in genetic terms.

Key-words: lipoproteins apolipoproteins hyperlipidemia hyperlipoproteinemia dislipoproteinemia phenotype genotype mutations polymorphisms

1. A CLASSIFICAÇÃO DE FENOTIPOS DE FREDRICKSON

Dos lípidos às lipoproteínas

Embora as determinações dos níveis sanguíneos de colesterol tivessem começado na década de 1930, e, os indivíduos com excesso de colesterol fossem aconselhados a evitarem alimentos ricos neste composto, foi um artigo de John Gofman et al. que despertou a comunidade médica para os perigos do colesterol alimentar^a. Neste artigo os autores confirmaram os estudos de Anitschkow, segundo os quais o colesterol era uma substância lesiva para as artérias; com a introdução da ultracentrifuga, identificaram também o colesterol das LDL¹ (C-LDL) como sendo o agente aterogénico – facto que constituía uma grande contribuição da física na medicina.

Na década de 1940, Blix, Tiselius e Svensson demonstraram que a maior parte dos lípidos plasmáticos migravam num campo eléctrico com mobilidades idênticas às das α e β -globulinas². Pelos anos 50 o desenvolvimento das técnicas de precipitação fraccionada permitiu a Cohn et al realizarem a precipitação selectiva de α e β -lipoproteínas³. O objectivo de Gofman et al. era o de estudarem o modo como os lípidos eram transportados no sangue e esclarecerem algumas divergências entre resultados obtidos por electroforese e as primeiras aplicações da ultracentrifugação aos estudos de lipoproteínas plasmáticas, realizadas em 1947, por Pedersen, no Instituto Karolinska de Upsala⁴. Foram, assim, Gofman et al., no laboratório Donner de Berkeley, Universidade da Califórnia, que estabeleceram a ultracentrifugação como método de estudo das lipoproteínas plasmáticas⁵. Estas, são particu-

las de elevado peso molecular, solúveis em solução aquosa, de estrutura geralmente esférica, sendo o núcleo constituído por lípidos hidrófobos (triglicéridos e colesterol esterificado) e o envólucro exterior constituído por fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas.

Gofman et al observaram que as lipoproteínas se repartem por zonas de concentrações ao longo de um gradiente de densidade de 0,99 g/ml a 1,21 g/ml e classificaram-nas em três classes principais:

- Quilomicra de $d < 0,99$ g/ml

- LDL (*Low Density Lipoproteins*) $0,99 < d < 1,063$

- HDL (*High Density Lipoproteins*) $1,063 < d < 1,21$, assim como as suas subclasses, HDL₁, HDL₂ e HDL₃

Avaliaram ainda o significado clínico da associação entre hiperlipoproteinémia, termo que tinham introduzido em 1950, e a susceptibilidade para o aparecimento precoce da doença aterosclerótica⁶. Utilizando uma técnica de ultracentrifugação mais simples e bem adaptada à análise química, ultracentrifugação preparativa, Havel, Eder e Bragdon publicaram em 1955 os primeiros resultados de conjunto sobre a composição das lipoproteínas nas diversas afecções hiperlipidémicas⁷. É ainda hoje a técnica de referência de isolamento de lipoproteínas.

Foram estes autores que introduziram a designação VLDL ($0,99 < d < 1,019$), (Very Low Density Lipoproteins) (8), garantindo a adopção do novo paradigma (VLDL-LDL-HDL) pela nova geração de investigadores.

Também nos anos 50, Dole e Gordon descreviam a existência de ácidos gordos livres em circulação e esclareciam o seu papel no metabolismo energético^{9,10}. Em 1955, em Bethesda, Edward Korn, isolou e caracterizou o factor

tecidual libertado pela heparina; esse factor provocava a cascata lipolítica, isto é, a transformação das lipoproteínas ricas em triglicéridos ou de baixa densidade, em lipoproteínas de menores dimensões e mais elevada densidade, as LDL¹¹. Designou-o por lipoproteína lipase (LPL) e esta descoberta constituiu um passo fundamental para a compreensão do metabolismo dos triglicéridos. Foi complementado pelo isolamento, em 1970, da apolipoproteína CII, em três laboratórios distintos, e pelo conhecimento desta apolipoproteína como cofactor da LPL, cofactor de cuja existência já se suspeitava em Bethesda¹². De salientar que o grupo de Gofman já tinha procurado esclarecer o efeito anti-quilomicra da heparina – observado pela primeira vez na década de 1940, em Berkeley¹³. Havel, em 1956, apresentava num congresso, em Bruxelas, subordinado ao tema “Blood Lipids and the Clearing Factor”, um tipo de hiperlipidémia que se manifestava por um aumento de quilomicra no soro – primeiro caso de deficiência congénita de LPL registado, em três membros da mesma família¹⁴. Começava a era moderna do metabolismo das lipoproteínas.

Contudo, o índice de aterogenicidade proposto por Gofman não foi aprovado pelos especialistas em lípidos desse tempo; estes, consideravam os níveis de colesterol total um tão bom índice de doença cardiovascular como as lipoproteínas¹⁵. A controvérsia gerada em torno do novo paradigma levou Gofman a abandonar esta área de investigação.

Apolipoproteínas

Nos finais dos anos 50, desenvolveram-se as técnicas de deslipidação que marcaram o início da era das apolipoproteínas. Sem o componente lipídico, as apolipoproteínas podiam ser fraccionadas. Estes estudos conduziram ao conhecimento das estruturas primária e secundária das apolipoproteínas, assim como à compreensão da base química do polimorfismo das apolipoproteínas e significado funcional destes polimorfismos em termos de ligação a lípidos, activação de enzimas ou interacção com receptores membranares. Duas alterações genéticas do transporte de lípidos demonstraram o papel essencial das apolipoproteínas na formação das lipoproteínas: abetalipoproteinémia e doença de Tangier. Foram caracterizadas primeiramente pela ausência de uma apolipoproteína e só em seguida se deu conta da ausência total ou fraca concentração de uma dada classe de lipoproteínas - duas mutações raras que conduziam a uma hipolipoproteinémia. Esta descoberta relançou o interesse pela química das lipoproteínas e permitiu o isolamento de várias novas apolipoproteínas.

A primeira destas deficiências metabólicas, ausência

de β -lipoproteínas, foi descrita por Salt et al. em Inglaterra, numa menina de 17 meses, em 1960¹⁶. Por esta altura já se diferenciavam as lipoproteínas do soro em duas grandes categorias imunologicamente distintas: as α -lipoproteínas e as β -lipoproteínas. Verificou-se a ausência de apo B no plasma. Foi o primeiro caso reconhecido de abetalipoproteinémia (ABL). Só em 1994 se identificou a deficiência bioquímica subjacente. Trata-se da proteína microsomal de transferência dos triglicéridos ou MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein). Na sua ausência a partícula nativa é totalmente degradada¹⁷. Poucos meses depois da descrição do primeiro caso de abetalipoproteinémia, Fredrickson et al., em Bethesda, detectaram níveis muito baixos de α -lipoproteínas ou HDL no plasma de um rapaz de cinco anos (18), conduzindo a uma enorme acumulação de ésteres de colesterol no sistema retículoendotelial do organismo. Designaram esta anomalia por doença de Tangier, nome da ilha onde residia a família. Praticamente não se detecta apo A-I na doença de Tangier (inferior a 3% do normal), situação rara, em que se verifica um turnover excepcionalmente rápido desta apolipoproteína. Estudos recentes mostraram que a doença de Tangier é causada por mutações no transportador ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1)¹⁹. Mediando o efluxo de colesterol livre e de fosfolípidos das células, o ABCA1 promove a transferência destes lípidos para a apoAI, dando origem às HDL nascentes.

Estes dois casos levaram à pesquisa de outras apolipoproteínas e à uniformização da sua nomenclatura. A aplicação de novos processos físicos de separação e estudo das apolipoproteínas, permitiram pôr em evidência a heterogeneidade das apolipoproteínas dentro de cada classe de densidade. O isolamento e caracterização de várias apolipoproteínas individuais do plasma, assim como a obtenção de anticorpos que lhes são monoespecíficos permitiram a Alaupovic *et al* realizar o estudo sistemático da composição em apolipoproteínas das diferentes classes de densidade²⁰. Propuseram uma terceira classificação de lipoproteínas, baseada no conceito de “família de lipoproteínas”. Com base na composição proteica das lipoproteínas, aqueles autores distinguem diferentes famílias: Lipoproteína-A (LP-A), Lipoproteína B (LP-B) e Lipoproteína C (LP-C).

Inicialmente, a nomenclatura das apolipoproteínas era muito confusa, com base no aminoácido C-terminal, por exemplo, apoVLDL-Val, hoje apoC-I.

Como alguns dos aminoácidos C-terminais precisavam de ser corrigidos e várias apolipoproteínas tinham o mesmo aminoácido C-terminal, a nomenclatura ABC, proposta por Alaupovic, acabou por ser a adoptada pelo grupo de

Bethesda²¹. Num artigo recente, aquele autor salienta o significado clínico das “famílias de lipoproteínas”: A Lp-A é constituída por três subclasses designadas, consoante a sua composição em apolipoproteínas, Lp-AI, Lp-AI:AI e Lp-AII; a Lp-B por cinco subclasses, designadas Lp-B, Lp-B:E, Lp-B:C, Lp-B:C:E e Lp-AII:B:C:E. Cada subclasse é caracterizada por uma composição química e propriedades metabólicas específicas. As dislipoproteinémias caracterizam-se por diferenças quantitativas, mais do que qualitativas, dos níveis destas subclasses. As subclasses Lp-A diferem quanto às suas capacidades anti-aterogénicas relativas e as subclasses Lp-B quanto ao seu potencial aterogénico. Enquanto a Lp-AI pode ter maior capacidade anti-aterogénica, a Lp-B:C parece ser a subclasse mais aterogénica²².

Fenotipagem das hiperlipoproteinémias

Na década de 1960, Fredrickson e os seus colegas do Instituto Nacional de Saúde, onde trabalhavam desde 1953, formaram a Secção de Doenças Moleculares com o objectivo de investigar e descrever as doenças geneticamente determinadas, envolvendo lipoproteínas plasmáticas num livro intitulado *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*²³.

Paradoxalmente, o estudo das apolipoproteínas não parecia oferecer uma abordagem racional a esta tarefa. Assim, Fredrickson et al. utilizaram uma combinação da ultracentrifugação preparativa, de métodos de precipitação com heparina e manganésio, das determinações do colesterol e triglicéridos plasmáticos e da electroforese em papel, para estabelecerem uma classificação de hiperlipoproteinémias que caracterizava cinco tipos (Fig.1) (24). Esta classificação teve o mérito de ter permitido um melhor conhecimento das várias hiperlipoproteinémias sob os aspectos de diagnóstico, epidemiológico e genético; facilitou também o diálogo entre investigadores e clínicos: os termos ‘Tipo I’, ‘Tipo II’, etc. são simples e permitem a pronta comunicação entre o laboratório e a clínica, referindo-se a perfis de lipoproteínas específicos, independentemente de estarem associados a hiperlipoproteinémias primárias ou secundárias; por exemplo ‘Tipo IV’ é um termo mais simples do que ‘hiperprebetalipoproteinémia’ ou ‘VLDL aumentadas’. Os autores consideraram este sistema de classificação uma solução temporária. Também chamaram a atenção para o facto de um dado fenotipo não reflectir necessariamente a alteração de um genotipo, embora na concepção original de Fredrickson cada tipo de hiperlipoproteinémia correspondesse à expressão de uma mutação, ou seja, de um genotipo^b. O facto de al-

gumas das deficiências terem sido observadas numa mesma família conduziu a alguma especulação de que fenotipos específicos estariam associados com hiperlipidémias geneticamente determinadas.

METODOLOGIA UTILIZADA:

Electroforese em papel

A electroforese em papel era o meio mais conveniente e económico de separação de lipoproteínas. Adaptava-se ao despiste de um grande número de indivíduos. Hatch e Lees²⁵ tinham alterado o sistema convencional de electroforese das proteínas e lipoproteínas adicionando albumina ao tampão barbiturato, o que permitia uma melhor resolução das quatro principais lipoproteínas do plasma, depois coradas por um corante de lípidos. No ponto de aplicação ficavam, quando existiam, os quilomicra, seguidos de β -, pré β - e α -lipoproteínas, sucessivamente. A numeração dos perfis de lipoproteínas, I, II ... contem em si uma mnemónica, de acordo com a migração sequencial das lipoproteínas: tipo I referindo-se à presença de quilomicra, tipo II a uma hiperbetalipoproteinémia, etc. Separavam-se assim os lípidos de origem exógena (quilomicra) dos lípidos de origem endógena (pré- β). Muitos reagentes antes manufacturados pelos próprios investigadores foram comercializados na forma de “kit”; a generalização da sua aplicação despertou o interesse de várias especialidades médicas, mas foi a comunidade cardiovascular a que mais beneficiou desta interligação por ser a que necessitava da interpretação das análises de lipoproteínas. O sucesso da definição do perfil lipoproteico por esta abordagem sistemática depende muito da padronização dos procedimentos uma vez que as lipoproteínas não podem ser quantificadas a partir do lipidograma. Para comparação incluía-se um soro controlo, cuja composição em lipoproteínas era conhecida. Levy, à sua chegada a Bethesda, observou que as lipoproteínas com migração β ocasionalmente se encontravam presentes no sobrenadante após uma noite de ultracentrifugação. Estas β flutuantes e a banda β larga que produziam não eram um artefacto da técnica, mas correspondiam ao que se tornou no tipo III, e contribuiu para a classificação apresentada na figura 1.

Os casos de difícil fenotipagem necessitavam determinações complementares: colesterol e triglicéridos plasmáticos, precipitação das LDL e ocasionalmente a utilização da ultracentrífuga. Esta última era necessária para determinar a quantidade de β -lipoproteínas e confirmar se as lipoproteínas de mobilidade β tinham a densidade normal, isto é, superior a 1,006g/ml.

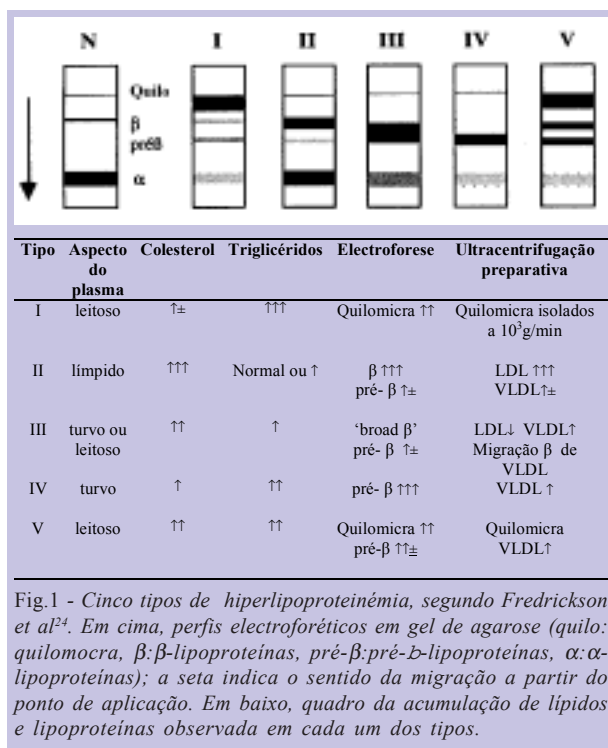
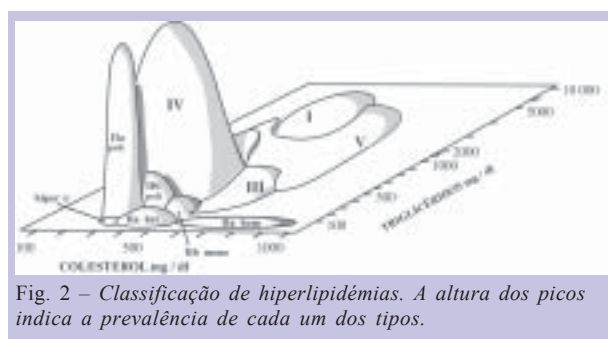


Fig. 1 - Cinco tipos de hiperlipoproteinemia, segundo Fredrickson et al²⁴. Em cima, perfis electroforéticos em gel de agarose (quilo: quilomicro, β:β-lipoproteínas, pré-β:pré-β-lipoproteínas, α:α-lipoproteínas); a seta indica o sentido da migração a partir do ponto de aplicação. Em baixo, quadro da acumulação de lípidos e lipoproteínas observada em cada um dos tipos.

Outra forma comum de apresentar os grandes núcleos de anomalias de lípidos ou lipoproteínas conhecidas na época está resumida na figura 2.



2. Recomendação da classificação de Fredrickson Generalização da prática de fenotipagem

Esta classificação fenotípica das hiperlipoproteinémias, elaborada em 1967 por Fredrickson et al., foi revista em 1970 (26), por uma comissão da Organização Mundial de Saúde (OMS), da qual também fazia parte Fredrickson, e continua uma referência para os lipidologistas apesar dos seus 35 anos de existência.

Na revisão de 1970 os autores explicitam que estes perfis não correspondem a uma única doença e cada um deles pode ter múltiplas causas. Em comparação com a figura 1 há a assinalar a subdivisão do tipo II nos subtipos

IIa e IIb. Em ambos existe um aumento das LDL (β) mas no tipo IIb esse aumento é acompanhado por um aumento de VLDL (pré-β). Ambos os perfis se podem encontrar numa mesma família, por isso os autores os consideram sob o mesmo tipo, II.

Em Bethesda, continuaram os esforços para tornarem a fenotipagem mais prática para os clínicos. Nos laboratórios de rotina, sem ultracentrifuga, o tipo III era de difícil diagnóstico. Por esta razão se procuraram vários algoritmos e análises simples para obter informação.

Aperfeiçoamentos sucessivos através da fórmula de Friedewald, fenotipagem da ApoE e determinação do C-RLP

Na classificação da OMS recomendava-se o exame do plasma após 24h em repouso a 4° C, para distinguir os tipos I e V: uma camada leitosa sobre um infranadante límpido era característico do tipo I enquanto sobre um infranadante turvo caracterizava o tipo V. Recomendava-se também determinar o quociente entre colesterol total e triglicéridos como teste complementar.

O diagnóstico do tipo II requeria a determinação ou uma estimativa do valor de C-LDL. Levy e Fredrickson ao estudarem a composição das VLDL efectuada por vários laboratórios e em centenas de indivíduos hipertriglicéridémicos observaram que o C_{VLDL} é relativamente constante e aproximadamente igual à razão TG/5, com a excepção dos tipos III ou em presença de quilomicro. Propuseram um método indirecto para determinar a concentração em colesterol das LDL, através da fórmula :

$$C_{LDL} = C_T - C_{HDL} - TG/5,$$

conhecida por fórmula de Friedewald²⁷, nome do matemático que estabeleceu a validade da fórmula de modo independente, como nos conta Fredrickson²⁸. Esta fórmula teve (e tem ainda) uma enorme utilização.

O diagnóstico preciso do tipo III continuou só sendo possível aos laboratórios especializados, uma vez que requeria o isolamento das VLDL, seguido da determinação do quociente C-VLDL/TG plasmáticos (aumentado em relação aos outros fenotipos) ou da sua mobilidade electroforética, β-VLDL; foi ainda o grupo de Fredrickson a estabelecer a composição anómala das VLDL, característica do tipo III. No entanto, em 1973, Havel e Kane, observaram um predomínio de apoE, uma nova apolipoproteína recentemente descrita pelos Shore²⁹, no plasma dos tipo III³⁰; esta observação, conduzirá a um novo tipo de diagnóstico para o tipo III, através da fenotipagem da apoE, como veremos.

Mais recente no diagnóstico deste tipo de HLP é a determinação do C-RLP (Colesterol das Lipoproteínas Remanescentes), metodologia proposta por Nakajima et

al^{31,32}. Utilizando cromatografia de imunoafinidade isolam uma população de partículas remnescentes com as mesmas propriedades que as β -VLDL isoladas de doentes com HLP de tipo III³³.

Assim, o interesse prático do lipidograma foi ultrapassado pelo doseamento directo das fracções lipídicas, como previsto por Fredrickson³⁴, deixando, por isso, de ser utilizado.

Em termos práticos, a actual classificação da Sociedade Europeia de Aterosclerose considera apenas três tipos fenotípicos básicos de dislipidémia: hipercolesterolemia, hipertrigliceridémia e as hiperlipidémias mistas³⁵. Na realidade, também na classificação recomendada pela OMS em 1970, sob o subtítulo de Hiperlipidémia, se considerou que o conhecimento das concentrações de colesterol e triglicéridos permitia a distinção de três tipos gerais de hiperlipoproteinémias.

Resistências à classificação de Fredrickson

A classificação de Fredrickson é referida na generalidade dos livros de texto de Bioquímica, por exemplo, na 13ª edição de “Physiological Chemistry” de HA Harper, 1971 (36). A 25ª edição, de 2000, ainda menciona os tipos I-V, sem referir a origem da designação. No entanto há excepções: RW McGilvery e GH Goldstein em *Biochemistry – a functional approach*, em 1983³⁷, não referenciam esta classificação e explicam o facto fundamentando-se no editorial de Lawrence Crouse³⁸. A maior crítica de Crouse é a da fronteira entre hiperlipidémia primária e secundária não ser nítida e muitas vezes uma causa apontada como secundária ser o reflexo de uma alteração genética.

Algumas críticas que actualmente lhe são feitas são de não considerar as hipolipoproteinémias, as disalfalipoproteinémias, a hiperlipoproteinémia (a), isto é, de não abarcar todas as situações patológicas. Carlson salientou que a relação entre a anomalia do perfil lipoproteico e a patogénese subjacente é limitada e chamou a atenção para o facto de ser o plasma e não o doente que está a ser classificado³⁹. Contudo, mesmo Crouse refere que a classificação contribuiu muito para a compreensão das hiperlipoproteinémias.

3. Aplicação de técnicas de biologia molecular ao diagnóstico de dislipoproteinémias: classificação etiológica

O tempo mostrou que os fenótipos não são específicos geneticamente e podem reflectir doenças monogénicas, poligénicas (combinação de factores genéticos e ambientais) ou serem de causa secundária.

Os avanços da tecnologia do DNA recombinante tor-

naram possível a pesquisa de uma deficiência ou defeito genéticos mesmo nos casos em que não está identificada a anomalia duma proteína específica. Todos os defeitos genéticos conhecidos hoje envolvem uma proteína: apolipoproteína, enzima lipolítica, receptor membranário, ou proteína reguladora.

A compreensão da hipercolesterolemia familiar representou um importante avanço da investigação da etiologia das hiperlipoproteinémias, apresentada no Quadro I.

Quadro I - Dislipoproteinémias primárias: classificação etiológica

Deficiência metabólica	Gene	Diagnóstico	Transmissão	Prevalência	Fenótipo	Implicações clínicas
enzima	lipoproteína lipase (LPL)	deficiência em LPL	autossómica recessiva	1:500 1:1 000 000	I	pancreatite aguda
receptor	LDL (B,E)	hipercolesterolemia familiar (FH) heterozigótica homozigótica	autossómica dominante		IIa	aterosclerose
apolipoproteínas	apoB100	deficiência familiar de apoB100 heterozigótica homozigótica	autossómica dominante	1:1 000 1:4 000 000	IIa	aterosclerose
	apoE	dislipoproteinémia ou dislipidémia de remanescentes	poligénica	1:10 000	III,IIb	aterosclerose
	apoCII	deficiência em apoCII	autossómica recessiva	1:250	I	pancreatite aguda
desconhecida		hipercolesterolemia poligénica	poligénica	1:200	IIa, IIb	aterosclerose
desconhecida		hiperlipidémia familiar combinada	poligénica	1:600	IIb, IV	aterosclerose
desconhecida		hipertrigliceridémia familiar	autossómica dominante		IV,V	controverso: factor de risco independente para a aterosclerose?

Os estudos de Goldstein et al indicavam uma classificação genética na qual se distinguem três hiperlipoproteinémias dominantes autossómicas – hipertrigliceridémia, hipercolesterolemia e hiperlipidémia mista ou combinada; definiam também uma forma poligénica de hipercolesterolemia e uma forma esporádica de hipertrigliceridémia. Goldstein et al. não encontraram correspondência directa entre estes cinco tipos e a classificação baseada nos perfis lipoproteicos⁴⁰. Nas famílias com hiperlipidémias as lipoproteínas revelavam quatro fenótipos: IIa, IIb, IV e V. As duas formas de hipercolesterolemia podiam corresponder a perfis IIa ou IIb; famílias hipertrigliceridémicas, monogénica ou esporádica, tinham membros com perfis de tipo IV ou V. Quanto ao tipo III era familiar.

Nesta data, 1973, estes resultados demonstravam que uma classificação etiológica não pode assentar nos perfis lipoproteicos.

Hipercolesterolémias

Os estudos de Goldstein e Brown (Prémio Nobel de Medicina em 1985) estabeleceram a função dos receptores LDL no metabolismo do colesterol. Na hipercolesterolemia familiar (FH) o mecanismo essencial não é o aumento da síntese de colesterol, mas antes uma falta de depura-

ção periférica pelos receptores que reconhecem a apoB100 das LDL e permitem a sua entrada nas células. Já Muller, na Noruega, em 1938, tinha identificado a FH como sendo um único defeito genético⁴¹. Desde que se tornou evidente que o gene afectado era o do receptor LDL, homo- e heterozigóticos com este defeito genético foram intensivamente estudados. Brown, Goldstein et al. identificaram os produtos do gene com uma precisão elevada. Verificaram ser possíveis quatro tipos de alterações: ausência total ou diminuição da síntese de receptores LDL, receptores deficientes e anomalias ao nível da internalização dos receptores; são alterações que surgem em consequência de uma interferência ao nível dos vários passos da síntese do receptor, passagem pelo complexo de Golgi ou transporte para a membrana plasmática. Foi o estudo da estrutura e biossíntese dos receptores LDL que levou ao conhecimento de quatro classes principais de mutações do gene que codifica o receptor, cada uma das quais afectando uma região diferente do gene⁴². A FH pode provir de, pelo menos, 900 mutações possíveis do gene deficiente dos receptores LDL⁴³; essas mutações variam consoante os indivíduos, os países e as populações. Deste modo não há um único teste que possa identificar inequivocamente todos os doentes com FH. No entanto, entre as mutações conhecidas é possível seguir as que estão presentes nesta ou naquela população. Assim, em estudos realizados na década de 80, observou-se a mesma mutação em 63% das famílias afectadas no Canadá francófono⁴⁴, diferente da que atinge os doentes da África do Sul⁴⁵, por exemplo, populações onde se identificou um efeito fundador.

O ensaio da terapia génica foi facilitado pela existência de um modelo animal, o coelho Watanabe, que possui a mesma deficiência em receptores que os humanos. Primeiro, mostrou-se, que, nos coelhos Watanabe, nos quais se conseguiu, por tecnologia transgénica, a expressão hepática de receptores normais, o colesterol diminuiu⁴⁶; em seguida esta técnica foi experimentada numa doente do Canadá francófono: reinjectou-se o gene correspondente utilizando como vector as próprias células hepáticas da doente, depois de cultura *in vitro*, corrigindo a HLP em cerca de 40%⁴⁷. Mas a generalização desta forma de terapia depende do desenvolvimento de melhores vectores e mais seguros.

O grupo de Scott Grundy, nos EUA, em 1989, descreveu um defeito do gene da apolipoproteína de transporte apoB100, que se traduz numa menor capacidade de ligação ao receptor LDL, desencadeando também uma hipercolesterolemia, mais moderada⁴⁸. Este defeito tem a vantagem de corresponder a uma única mutação e de ser, hoje

em dia, de fácil despiste. A sua frequência é ligeiramente mais baixa que a deficiência dos receptores LDL e a sua gravidade menor.

Nestes dois tipos de lesão, do receptor LDL e da apoB100, a maioria dos doentes possui um gene alterado num dos dois alelos (na mesma posição em cada um dos segmentos cromossómicos herdados, um do pai e outro da mãe) responsáveis por uma transmissão monogénica dominante heterozigótica. Uma nova deficiência molecular foi descrita, identificando um terceiro gene envolvido numa forma autossómica dominante de hipercolesterolemia⁴⁹. A presença de hipercolesterolemia familiar nalguns doentes, pode, portanto, vir a ser explicada pela descoberta de mutações noutros genes envolvidos no catabolismo das LDL. Goldstein et al. definiram ainda a hipercolesterolemia poligénica (HCL) - que corresponde, em média a 85% das hipercolesterolemias - e que deve a sua origem, não a um único gene mutante, mas sim à complexa interacção de múltiplos factores genéticos da homeostase do colesterol e factores ambientais. A causa mais comum do aumento de C-LDL será o aumento da síntese hepática de VLDL com rápida conversão a LDL, mantendo-se os níveis de VLDL dentro dos limites normais.

Hiperlipoproteinémia familiar combinada (FCHL)

Herdada como um traço que se pensava inicialmente ser autossómico dominante, em resultado dos estudos de Goldstein et al., considera-se hoje, uma hiperlipidémia poligénica que surgirá na sequência de um aumento de síntese de apoB100 e VLDL por um lado, e uma diminuição da sua conversão para LDL, por outro. Designa-se por FCHL quando familiares apresentam hiperlipoproteinémia, caso contrário, por hiperlipoproteinémia combinada; poderão ser factores contribuintes uma baixa actividade de LPL⁵⁰, a diminuição da estimulação da incorporação dos ácidos gordos livres nos TG, os polimorfismos do *cluster* genético apoAI/CIII/AIV⁵¹ ou a resistência à insulina. Nesta situação, a relação C-LDL/apoB100 está diminuída, por transferência dos ésteres de colesterol das LDL para lipoproteínas ricas em triglicéridos - VLDL, por acção, primeiro, da CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein) e depois, da lipase hepática⁵². Estas LDL têm tendência para serem pequenas e densas; ora, sabemos dos estudos de Ronald Krauss, que as LDL de pequenas dimensões constituem um factor de risco para a aterosclerose e caracterizam o perfil lipoproteico aterogénico⁵³. Recentemente Brunzell et al. verificaram que a variabilidade deste fenotipo será regulada pela distribuição de apoB por VLDL ou LDL, o que distingue esta situação da hipertrigliceridémia familiar. A apoB elevada, assim como a presença de LDL de

pequenas dimensões, caracterizam a FCHL⁵⁴. Este fenotipo não será necessariamente detectado pelo doseamento do C-LDL, mas sim pela determinação da apoB. Corresponde aos fenotipos IIa, IIb ou IV de Fredrickson.

Disbetalipoproteinémia familiar ou dislipidémia de remanescentes

Forma rara de HLP, caracteriza-se pela presença de uma banda β larga (broad band β) entre a zona β e a zona pré - β . Descrita inicialmente sob o nome de xantomatose tuberosa, confundida depois no quadro das hiperlipidémias mistas, foi individualizada em 1967 por Fredrickson, Levy e Lees²⁴. Pouco depois de Havel e Kane terem descrito o predomínio de apoE no plasma de doentes com o tipo III, Gerd Utermann isolou a apoE das VLDL destes doentes; o seu trabalho incluiu a separação por focagem isoeléctrica da apoE em três componentes, E2, E3 e E4⁵⁵. Este polimorfismo da apoE é importante na HLP do tipo III, caracterizada por colesterol e triglicéridos elevados como resultado da diminuição da depuração das remanescentes de quilomícra e VLDL. A E2 tem a afinidade para o receptor LDL diminuída, sendo responsável pelo fraco reconhecimento destas lipoproteínas pelos receptores⁵⁶.

Estudos de Breslow et al. indicam que 90% dos tipos III apresentam homozigotia E2/E2⁵⁷, podendo esta ser a causa da HLP tipo III. No entanto, apenas 1-2% dos indivíduos com este fenotipo (E2/E2) manifestam a hiperlipidémia. Assim, Havel e Kane designaram por disbetalipoproteinémia o fenotipo E2/E2 para o distinguirem da expressão típica da HLP tipo III, que precisa de factores desencadeantes como nefropatia, diabetes mellitus, obesidade, alcoolismo, etc. Não está excluída, no entanto, a hipótese de que o tipo III possa resultar de dois defeitos genéticos, um, o gene estrutural da apoE e o segundo, um gene que influencie o catabolismo dos quilomícra e VLDL remanescentes.

Hipertrigliceridémias

Hipertrigliceridémia predominante

Com a tendência para os valores limites máximos de colesterol no soro baixarem nas revisões de factores de risco efectuadas pela Sociedade Internacional de Aterosclerose, situando-se actualmente em 190mg/dl, muitos indivíduos que só teriam hipertrigliceridémia agora têm hiperlipidémia combinada. Analogamente, a hipertrigliceridémia mais comum é a dos doentes com hiperlipidémia combinada que fazem terapêutica com estatinas e manifestam resistência à diminuição dos triglicéridos. Muitos indivíduos com triglicéridos aumentados e C-LDL aparentemente normal têm concentrações elevadas de LDL de pequenas dimensões, só detectadas pela determinação da apoB do soro.

Hipertrigliceridémia familiar (FHTG)

A HTG familiar monogénica, de transmissão autossómica dominante é uma forma rara, em que se verifica um aumento da síntese de TG, com VLDL de maiores dimensões. A apoCIII, inibidora não competitiva da LPL, elevada nestes doentes comparativamente aos controlos, ou, polimorfismos do gene da apoCIII associados à HTG, poderão ter um papel proeminente na expressão desta dislipidémia⁵⁸; a apoCIII é ainda moduladora da interacção da apoE com os receptores hepáticos, podendo diminuir a captação das lipoproteínas ricas em triglicéridos e suas remanescentes⁵⁹. Corresponde ao tipo IV da classificação de Fredrickson. As formas poligénicas são mais frequentes; estas ocorrem frequentemente em adultos obesos, hiperuricémicos ou diabéticos, podendo o álcool, os estrogéneos exógenos, o hipotiroidismo, serem factores exacerbantes. Desconhece-se o factor genético que lhe está subjacente, mas Schaefer et al. em 1985 observaram uma maior frequência de E4 e apoCIII-2⁶⁰. Muitos doentes com HTG familiar podem flutuar entre os fenotipos IV e V de Fredrickson.

Neste trabalho, apenas pretendemos discutir a evolução do conhecimento genético das etiologias mais frequentes, HCL poligénica, FCHL, FHTG, ou de maior impacto, como FH, defeito familiar da apoB100 e dislipidémia de remanescentes. Quanto à relação entre as concentrações de C-HDL e as doenças cardiovasculares, não são lineares como inicialmente se pensava, existindo desvios a esta relação nos extremos do espectro de concentrações das HDL – ApoAI Milano, que se caracteriza por baixas concentrações de HDL e reduzido risco vascular; e deficiência em CETP que se caracteriza por elevadas concentrações de HDL, podendo estas não ser cardioprotectoras (61). E enquanto as síndromes de baixas concentrações de HDL, cujos valores se encontram entre 20 e 40 mg/dl, são de origem poligénica, as síndromes predominantes nos valores inferiores a 10mg/dl, são monogénicas, muito raras, na ausência de deficiências metabólicas identificáveis (Quadro II).

Quadro II – Dislipoproteinémias primárias

Deficiência metabólica	Gene	Diagnóstico	Transmissão	Prevalência	Fenotipo	Implicações clínicas
proteína de transferência	CETP	hiper α lipoproteinémia	autossómica dominante	1:200 (Japão)	HDL ↑	anti-aterogénica ?
desconhecida		hiper α lipoproteinémia	poligénica	variável	HDL ↑	anti-aterogénica
proteína reguladora	ABCA1	hipocolesterolemia familiar	monogénica	muito rara	HDL ↓	aterogénica
apolipoproteína	ApoA1	deficiência familiar de Apo A1	monogénica	muito rara	HDL ↓	aterogénica/sem efeitos
desconhecida		Hipocolesterolemia	poligénica	1:10	HDL ↓	aterogénica

Estão em curso estudos de polimorfismos comuns de alguns genes, em populações e em famílias que poderão, por um lado, preencher os dados ainda desconhecidos da classificação genética, por outro, em conjunto com o estudo bioquímico, determinar um perfil de risco de aterogênese mais preciso, dentro dos próximos anos.

¹ Abreviaturas: VLDL, lipoproteínas de muito baixa densidade; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; HDL, lipoproteínas de alta densidade; RLP, lipoproteínas remanescentes; HLP, hiperlipoproteinemia

² Segundo Richard Havel, investigador em Bethesda de 1953 a 1956

BIBLIOGRAFIA

- GOFMAN JW, LINDGREN FT, ELLIOT H, MANTZ W, HEWITT J, STRISOWER B, HERRING V: The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Science* 1950; 111:161-171 e 186
- BLIX G, TISELIUS A, SVENSSON H: Lipids and polysaccharides in electrophoretically separated blood serum protein. *J Biol Chem* 1941; 137:485-494
- COHN EJ, GURD FRN, SURGENOR DM et al: A system for the separation of the components of human blood: quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma. *J Amer Chem Soc* 1950; 72:465-474
- PEDERSEN K: On a low density lipoprotein appearing in normal human plasma. *J Phys Chem* 1947; 51:156-163
- GOFMAN JW, LINDGREN FT, ELLIOT H: Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem* 1949; 179:973-978
- JONES HB, GOFMAN JW, LINDGREN FT et al: Hyperlipoproteinemia. *Am J Med* 1951; 11:358-380
- HAVEL RJ, EDER HA, BRAGDON J: Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34:1345-1353
- HAVEL RJ: Early effects of fat ingestion on lipids and lipoproteins of serum in man. *J Clin Invest* 1957; 36:6, Part I, 848-854
- DOLE VP: A relationship between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J Clin Invest* 1956; 35:150-154
- GORDON RG, CHERKES A: Unesterified fatty acid in blood plasma. *J Clin Invest* 1956; 35:206-212
- KORN EB: Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase: I: Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart *J Biol Chem* 1955; 215:1-14
- LA ROSA JC, LEVY RI, BROWN WV, FREDRICKSON DS: A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Commun* 1970, 41:57-62
- HAHN PF: Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. *Science* 1943; 98:19-20
- HAVEL JR: Altered lipid metabolism in three brothers with idiopathic hyperlipemia. In: *Actas da 3ª Conferência Internacional "Biochemical Problems of Lipids"* Bruxelas. Julho 1956; 268-272
- GOFMAN JW, HANIG M, JONES HB et al: Evaluation of serum lipoprotein and cholesterol measurements as predictors of clinical complications of atherosclerosis. *Circulation* 1956; 14:4, Part II, 691-741
- SALT HB, WOLFF OH, LLOYD JK, FORSBROOKE AS, CAMERON AH: On having no betalipoprotein: a syndrome comprising abetalipoproteinemia, acanthocytosis, and steatorrhea. *Lancet* 1960; 2:325-329
- GREGG RE, WETTEREAU JR: The molecular basis of abetalipoproteinemia. *Curr Opin Lipidol* 1994; 34: 971-981
- FREDRICKSON DS, ALTROCCHI PH, AVIOLI LV, GOODMAN DS: Tangier disease. *Ann Intern Med* 1961; 55:1016-1031
- Oram JF: ATP-binding cassette transporter AI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:373-381
- ALAUPOVIC P: Apolipoproteins and lipoproteins. *Atherosclerosis* 1971; 13:141-146
- FREDRICKSON DS, LUX SE, HERBERT PN: The apolipoproteins. *Adv Exp Med Biol* 1972; 26:25-26.
- ALAUPOVIC P: The concept of apolipoprotein-defined lipoprotein families and its clinical significance. *Curr Ather Reports* 2003; 5:459-467
- STANBURY JB, WYNGAARDEN JB, FREDRICKSON DS, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, Book Co 1960
- FREDRICKSON DS, LEVY RI, LEES RS: Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 1967; 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281.
- LEES RS, HATCH FT: Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin-containing buffer. *J Lab Clin Med* 1963; 61:518-528.
- BEAUMONT JL, CARLSON LA, COOPER GR, FAJFAR Z, FREDRICKSON DS, STRASSER T: Classification of Hyperlipoproteinemia. *Bull WHO* 1970; 43:891-915.
- FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS: Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
- FREDRICKSON DS, Phenotyping – On reaching base camp (1950-1975), *Circulation*, 1993, 87 (suppl III) : III-1-III-15.
- SHORE B, SHORE VG: Heterogeneity of human plasma VLDL: separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 1973; 12:502-507
- HAVEL RJ, KANE JP: Primary dysbetalipoproteinemia: Prevalence of a specific apoprotein species in triglyceride-rich lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:2015-2019
- NAKAJIMA K, SAITO T, TAMURA A et al: Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti-apoB100 and anti-apoAI immuniaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta* 1993; 223:53-71
- WANG T, NAKAJIMA K, LAWRY ET et al: Ratio of rem-

- nant-like particle cholesterol to serum total triglycerides is an effective alternative to electrophoretic methods in the diagnosis of familial type III hyperlipoproteinemia. *Clin Chem* 1999; 45:1981-1987
33. CAMPOS E, NAKAJIMA K, TANAKA A, HAVEL RJ: Properties of an apolipoprotein E-enriched fraction of triglyceride rich lipoproteins isolated from human blood plasma with a monoclonal antibody to apolipoprotein B100. *J Lipid Res* 1992; 33:363-380
34. FREDRICKSON DS: It's time to be practical. *Circulation* 1975; 51:209-211
35. Recommendations of the European Atherosclerosis Society prepared by the International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease: prevention of coronary heart disease: scientific background and new clinical guidelines. *Nutr Metab Cardio Dis* 1992; 2:113-156.
36. HA HARPER: *Physiological Chemistry*. Los Altos, California: Lange Medical Publications 1971
37. RW MCGILVER, GH GOLDSTEIN: *Biochemistry – a functional approach*. Philadelphia: Saunders Company 3ª edição, 1983
38. CROUSE LD: A medical misdemeanor: I harboured evil thoughts about the Fredrickson fat classification. *JAMA* 1980; 244:2090-2091
39. CARLSON LA: Plasma or patient, paper electrophoresis or physician? The 4P problem in classification of hyperlipidaemia. *Atherosclerosis* 1970; 12:181-183
40. GOLDSTEIN JL, SCHROTT HG, HAZZARD WR, BIERMAN EL, MOTULSKY AG: Hyperlipidaemia in coronary heart disease II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidaemia. *J Clin Invest* 1973; 52:1544-1568
41. MÜLLER C: Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. *Acta Med Scand* 1938; 89:75-84
42. BROWN MS, GOLDSTEIN JL: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47
43. RADER DJ, COHEN J, HOBBS HH: Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 2003; 111: 1795-1803
44. HOBBS HH, BROWN MS, RUSSELL DW, DAVIGNON J, GOLDSTEIN JL: Deletion in the gene of the low density lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolaemia. *N Engl J Med* 1987; 317:734-737.
45. LEITERSDORF E, VAN DER WESTHUYZEN DR, COETZEE GA HOBBS HH: Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolaemia in Afrikanders. *J Clin Invest* 1989; 84:954-961
46. CHOWDHURY JR, GROSSMAN M, GUPTA S, CHOWDHURY NR, BAKER JR, WILSON JM: Long-term improvement of hypercholesterolemia after *ex vivo* therapy in LDLR deficient rabbits *Science* 1991; 254:1802-1805
47. GROSSMAN G, RAPER S, KOZARSKY K et al: Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nature Gene* 1994; 6:335-341
48. SORIA LF, LUDWIG EH, CLARKE HRG, VEGA GL, GRUNDY SM, MCCARTHY BJ: Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:587-591.
49. HADDAD L: Evidence for a third genetic locus causing familial hipercolesterolemia. A non-LDLR, non-ApoB kindred. *J Lipid Res* 1999; 40:1113-1122
50. BABIRAK SP, IVERIUS PH, FUJIMOTO WY, BRUNZELL JD: Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase. *Arteriosclerosis* 1989; 9:326-334
51. DALLINGA-THIE GM, VAN LINDE-SIBENIUS TRIP M, ROTTER JI et al: Complex genetic contribution of the AI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest* 1997; 99:953-965
52. KRAUSS RM: Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 1998; 81 (4A):13B-17B
53. AUSTIN MA, BRESLOW JL, HANNEKENS CH, BURING JE, WILLET WC, KRAUSS RM: Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260:1917-1921
54. AYYOBY AF, MCGLADDERY SH, MCNEELY MJ, AUSTIN MA, MOTULSKY AG, BRUNZELL JD: Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familiar combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1289-1294
55. UTERMANN GN, JAESCHKE M, MENZEL J: Familiar HLP type III – deficiency of a specific apolipoprotein (apoEIII) in very low density lipoprotein. *Febs Lett* 1975; 56:352-355
56. SCHNEIDER WJ, KOVANEN PT, BROWN MS et al: Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoproteinE to low density receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits and cows. *J Clin Invest* 1981; 68:1075-1085
57. BRESLOW JL: Genetics of Human Apolipoproteins. In Scam Am, Spector Aa, eds. *Biochemistry and Biology of Plasma Lipoproteins*. New York. Marcel Dekker 1986, p.85-143
58. AALTO-SETÄLÄ K, FISHER EA, CHEN X et al: Mechanisms of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased ApoCIII and reduced ApoE on the particles. *J Clin Invest* 1992; 90: 1889-1900
59. WINDLER FK, HAVEL RJ: Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and human on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver *J Lipid Res* 1985; 26: 556-565
60. SCHAEFER, LEVY RI: Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *N Engl J Med* 1985; 312:1300-1310
61. ZHONG S, SHARP DS, GROVE JS et al: Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesterol ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996; 97:2917-2923