

Influencia de Combinaciones Genéticas en los Niveles de HDL-c en una Población del Sur del Brasil

Fabiana Michelsen de Andrade¹, Marilu Fiegenbaum^{2,3}, Silvana de Almeida³, Mara Helena Hutz⁴

Universidade Feevale¹; Centro Universitário Metodista IPA²; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre³; Universidade Federal do Rio Grande do Sul⁴, Porto Alegre, RS - Brasil

Resumen

Fundamento: Bajos niveles de HDL-c son importantes predictores de enfermedad coronaria, la primera causa de muerte en todo el mundo. Muchos factores afectan los niveles de HDL-c, tales como los polimorfismos de genes que codifican proteínas-clave para la vía de transporte reverso de colesterol.

Objetivo: Investigar la influencia de siete polimorfismos de los genes CETP, APOA1, ABCA1 y SCARB1 genes en los niveles de HDL-c en una población de la región sur del Brasil.

Métodos: Los polimorfismos fueron investigados en una muestra de 500 individuos de descendencia europea, pero los niveles de HDL-c de solamente 360 individuos fueron ajustados para cofactores usando regresión lineal múltiple en el estudio de asociación. La muestra fue dividida en terciles de acuerdo con los niveles ajustados de HDL-c y frecuencias de alelos y haplotipos fueron comparadas entre el 1º y el 3º terciles de los niveles ajustados de HDL-c.

Resultados: Cuando las combinaciones de los alelos de riesgo fueron probadas, la frecuencia de combinaciones alélicas en tres genes (haplotipo 1 del gen APOA1, variante 2S del gen SCARB1, y alelo B1 del gen CETP) fue significativamente más alta en el tercil inferior de los niveles ajustados de HDL-c (28,3%) que en el tercil superior (14,9%; $p=0,008$), lo que indica que la presencia de esas variantes aumentó 2,26 veces la posibilidad de tener niveles de HDL-C < 39,8 mg/dl.

Conclusión: Se espera que esos marcadores, cuando sean estudiados separadamente, tengan una pequeña influencia en la característica que está siendo analizada, pero una influencia mayor fue detectada cuando los marcadores fueron estudiados en combinación. En una población de la región sur del Brasil, nuestros datos mostraron una influencia significativa de las combinaciones de las variantes de los genes APOA1, SCARB1 y CETP en los niveles de HDL-c. (Arq Bras Cardiol 2010; 95(4): 430-435)

Palabras clave: Colesterol HDL/genética, población/genética, polimorfismo genético, región sur/Brasil.

Introducción

Estudios epidemiológicos han mostrado fuertes evidencias de que niveles bajos de lipoproteína de alta densidad (HDL-c) están asociados con aumento del riesgo de enfermedad arterial coronaria (EAC)¹. Siendo así, las causas de los bajos niveles de HDL-c han sido intensivamente investigadas y estudios genéticos se han concentrado en los genes que codifican las proteínas que tienen un papel importante en el metabolismo del HDL-c o en el transporte reverso del colesterol (TRC). Las proteínas en esos grupos incluyen: apolipoproteínas, tales como LA-I, LA-II y Y; enzimas, tales como CETP, LCAT y LIPC; y receptores de membrana, tales como ABCA1 y SCARB1. Cuando son asociados, esos genes candidatos son sustancialmente polimórficos y muchos

estudios han investigado la asociación de esos polimorfismos con el riesgo de alteraciones en los perfiles lipídicos. Entre tanto, aun precisa ser aclarado si esos polimorfismos afectan los perfiles lipídicos y si esa influencia es encontrada en diferentes poblaciones; lo que no fue investigado en ninguna población sudamericana hasta hoy.

Este estudio investigó la influencia de siete polimorfismos de los genes CETP, APOA1, ABCA1 y SCARB1 en los niveles de HDL-c en una población de la región sur del Brasil.

Métodos

Individuos

La muestra poblacional consistió en 500 individuos de ascendencia europea, como fue anteriormente descrito². Los voluntarios incluidos en esa muestra fueron invitados a participar del estudio en dos centros clínicos de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul entre individuos que fueron encaminados a varios centros de salud para exámenes de sangre de rutina. Un cuestionario fue utilizado para coleccionar

Correspondencia: Fabiana Michelsen de Andrade •

Universidade Feevale - 239/2755, PROPI s. 201 F - Vila Nova - 93352-000 - Novo Hamburgo, RS - Brasil

E-mail: fabiana.andrade@feevale.br, fabiana.michelsen@hotmail.com

Artículo recibido el 21/08/09; artículo revisado recibido el 03/03/10; aceptado el 12/04/10.

datos sobre uso de medicamentos y variables relacionadas al estilo de vida, tales como tabaquismo, actividad física, etilismo, uso de anticonceptivos orales, menopausia y medidas antropométricas. El tabaquismo fue clasificado como no-fumante o fumante actual; ex-fumantes fueron excluidos. Todos los individuos dieron su consentimiento libre e informado antes de ser incluidos en el estudio. Los criterios de exclusión fueron: gravidez, hiperlipidemia secundaria debido a enfermedad renal, hepática o tiroidea; y diabetes o niveles de glucemia de ayuno > 7 mmol/l³. Mujeres recibiendo terapia de reposición hormonal e individuos recibiendo medicamentos hipolipemiantes, betabloqueantes o antiinflamatorios también fueron excluidos.

Los participantes fueron examinados por la mañana después de un ayuno de 12 horas. El peso fue medido sin zapatos y con ropas leves. La altura fue medida sin zapatos, con los talones juntos y con el dorso recostado en la pared. El índice de masa corporal (IMC) fue calculado como peso/altura² (kg/m²). La circunferencia de la cintura (CC) fue medida en la menor circunferencia horizontal entre la 12^a costilla y la cresta ilíaca.

Análisis de laboratorio

Las muestras de sangre fueron colectadas después de un ayuno de 12 horas. Colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidad colesterol (HDL-c) y triglicéridos (TG) fueron dosados en cada centro clínico usando métodos enzimáticos estandarizados⁴. Los niveles de lipoproteína de baja densidad colesterol (LDL-c) fueron calculados usando la fórmula de Friedwald⁵. Los niveles de glucemia también fueron dosados para asegurar que ningún individuo con diabetes haya sido incluido en el estudio.

La técnica de salting-out fue utilizada para extraer el ADN de las muestras de sangre⁶. El ADN fue amplificado utilizándose PCR y *primers* oligonucleotídicos bajo las condiciones previamente descritas para CETP⁷, APOA1⁸, ABCA1⁹ y SCARB1¹⁰. Los productos de la amplificación fueron subsecuentemente digeridos con las siguientes enzimas de restricción bajo las condiciones recomendadas por el fabricante: Taq I (CETP - TaqIB), Msp I (APOA1 - g-75a y c+83t), Xag I (ABCA1 - Arg219Lys), Alu I (SCARB1 - Gly2Ser), ApaI (SCARB1 - c780t) y Hae III (SCARB1 - c1050t). Los genotipos fueron determinados después de la realización de electroforesis en gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio y un marcador de 100 pb fue usado para determinar los tamaños de las bandas.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas fueron estimadas por el método de conteo de genes. Un test χ^2 para "goodness of fit" fue utilizado para verificar si las frecuencias alélicas eran las esperadas de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias de haplotipos de máxima verosimilitud y el desequilibrio de ligazón fueron estimados usando el *software* Arlequin 2000¹¹. Los haplotipos de los genes SCARB1 y APOA1 fueron determinados usando el método descripto por Long¹².

Apenas 360 individuos fueron analizados en el estudio de asociación entre SNPs y niveles de HDL-c, por que los datos

completos de los otros individuos no estaban disponibles. Regresiones lineales múltiples fueron realizadas para ajustar los niveles de HDL-c usando el método backward stepwise. Las covariantes incluidas en el primer modelo fueron sexo, edad, CC, tabaquismo, etilismo, IMC, niveles de triglicéridos (TG) y menopausia, así como todos los términos de interacción posibles. En el modelo final usado para el ajuste de los niveles de HDL-c, las covariantes significativas que permanecieron en el modelo fueron sexo, edad, IMC, niveles de TG, niveles de TG x edad, estado post-menopausia y niveles de TG x menopausia para mujeres. Los niveles de TG fueron log-transformados para remoción de asimetría en la distribución. La muestra fue dividida de acuerdo con los terciles de HDL-c y la heterogeneidad entre los grupos en tablas de contingencia fue probada usando el Test χ^2 o Test Exacto de Fisher. Las regresiones logísticas fueron realizadas para obtener el odds ratio (OR) para cada variante genética o combinación de variantes. Todos los análisis fueron realizados con el *software* Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versión 11.0 para Windows.

Resultados

La Tabla 1 muestra las frecuencias de alelos y genotipos para los genes CETP, ABCA1 y SCARB1 genes, así como las frecuencias de haplotipos para el gen APOA1. Las frecuencias de haplotipos del gen SCARB1 no son mostradas por que ellas no influenciaron los niveles de HDL-c en cualquier análisis posterior. Todas las frecuencias genotípicas están en equilibrio de Hardy-Weinberg (datos no mostrados). Un fuerte desequilibrio de ligazón entre las dos variantes del gen APOA1 fue detectado ($D' = -0,84$, $c^2 = 10,04$, $p < 0,001$) y el haplotipo 1 (-75g/+83c) fue el más común. Para el gen SCARB1, el alelo 780t fue el más frecuentemente encontrado con 1050c, indicando un desequilibrio significativa ($D' = -0,44$, $c^2 = 5,97$, $p = 0,015$). Gly2Ser no estuvo ligado a ninguna de las otras dos variantes investigadas en ese gen.

La prevalencia de cada haplotipo del gen APOA1 y las frecuencias alélicas de las otras variantes del estudio fueron comparadas entre el 1^o y el 3^o terciles de HDL-c ajustado para variables no-genéticas (Tabla 2) y las características clínicas de acuerdo con esos grupos son mostradas en la Tabla 3. Aunque la diferencia no haya sido estadísticamente significativa, el haplotipo 1 del gen APOA1, el alelo TaqIB*1 del gen CETP, y el alelo 2Ser del gen SCARB1 fueron más frecuentes en el 1^o tercil ($p = 0,18$, $p = 0,16$ y $p = 0,29$). Cuando las frecuencias de alelos y haplotipos fueron nuevamente comparadas entre el 1^o y el 4^o cuartiles de HDL-c, las mismas tendencias fueron encontradas, excepto por el Gly2Ser SNP del gen SCARB1, que tenía un valor de p menor ($p = 0,14$).

Con base en esos resultados, los alelos de riesgo para bajos niveles de HDL-c fueron seleccionados a partir de las comparaciones estadísticas que resultaron en valores de $p < 0,25$. Esas variantes, llamadas de "variantes de riesgo", son mostradas en la Tabla 4, que también muestra como los portadores de esas variantes fueron analizados posteriormente: como portadores homocigotos, o como portadores heterocigotos y homocigotos.

La frecuencia de individuos con combinaciones de riesgo genético para bajos niveles de HDL-c fue comparada

Artículo Original

Tabla 1 - Frecuencias de alelos, haplotipos y genotipos en la muestra total

Genotipos, alelos, haplotipos	Número GenBank	Muestra total, n = 500	
		n	%
CETP-TaqIB	rs 708272		
B1B1		89	17,9
B1B2		241	48,4
B2B2		168	33,7
B2			35,7
ABCA1 - Arg219Lys	rs 2230806		
Arg Arg		219	43,8
Arg Lys		236	47,2
Lys Lys		45	9
Lys			32,6
APOA1 -g75a	rs 670		
gg		296	59,3
ga		176	35,3
aa		27	5,4
la			23,0
APOA1 +c83t	rs5069		
cc		444	89,0
ct		53	10,6
tt		2	0,4
t			5,7
APOA1 -g75a / +c83t	rs 670 / rs5069		
11		253	50,8
12		164	32,9
13		39	7,8
22		27	5,4
23		13	2,6
33		2	0,4
1) -75g / +83 c			71,2
2) -75a / +83 c			23,2
3) -75g / +83 t			5,6
SCARB1 - Gly2Ser	rs 4238001		
Gly Gly		376	75,2
Gly Ser		116	23,2
Ser Ser		8	1,6
Ser			13,2
SCARB1 - c780t	rs 7967975		
cc		420	84
ct		75	15
tt		5	1
T			17
SCARB1 - c1050t	rs 5888		
cc		180	37,2
ct		233	48,1
tt		71	14,7
t			29,3

Tabla 2 - Frecuencias alélicas de acuerdo con los terciles de HDL-C*

	1o. tercil (< 39,8 mg/dl)	3o. tercil (> 47,1 mg/dl)	p
	n=120	n= 121	
CETP TaqIB*2 (-)	37,8	44,2	0,16
APOA1*haplotipo 1	76,5	71,1	0,18†
ABCA1*219Lys	37,1	33,9	0,51
SCARB1*2Ser	15,4	12	0,29‡
SCARB1*780t	10	7,9	0,43
SRB1*1050t	37,7	38	1

* Niveles de HDL fueron ajustados por género, edad, IMC, niveles de triglicéridos x edad, estado post-menopausia y niveles de triglicéridos x menopausia en mujeres; †comparación del haplotipo 1 vs otros haplotipos. ‡ cuando las diferencias entre cuartiles fueron probadas, el valor de p de ese SNP fue 0,14.

Tabla 3 - Características clínicas y de laboratorio de los participantes del estudio de acuerdo con los terciles de HDL

	1o. tercil (< 39,8 mmol/l)	3o. tercil (> 47,1 mmol/l)	p
	n=120	n= 121	
CT (mg/dl)	190,8 ± 39,8	204,1 ± 41,6	0,01
HDL-C (mg/dl)	34,8 ± 5,7	56,4 ± 9,4	<0,001
LDL-C (mg/dl)	129,9 ± 36,4	124,0 ± 38,5	0,18
Triglicéridos (mg/dl)	130,6 ± 61,7	118,4 ± 68,2	0,04
IMC (kg/m ²)	25,9 ± 4,8	26,1 ± 5,3	0,78
Edad (años)	42,5 ± 14,4	41,0 ± 16,3	0,45
Circunferencia cintura (cm)	92,0 ± 12,7	89,5 ± 13,8	0,14
Sexo (% masculino)	72,5%	38%	<0,001
Menopausia	15,2%	24%	0,44
Inactividad física	62,5%	60%	0,79
Tabaco	34,2%	29,8%	0,49
Consumo de alcohol	24,2%	22,3%	0,76
Consumo de vino	9,2%	5,8%	0,34

^a mujeres recibiendo terapia de reposición hormonal fueron excluidas; ^b ex-fumantes fueron excluidos; ^c consumo de alcohol o vino fue definido como siendo por lo menos un vaso/copa por semana.

Tabla 4 - Variantes de riesgo para cada gen y estado del portador

Gen	Polimorfismo	Variantes de riesgo	Estado del portador
APOA1	-g75a / +c83t	Haplotipo 1	Homocigotos 11
SCARB1	Gly2Ser	Ser	SerSer + GlySer
CETP	TaqIB	B1	B1B1 + B1B2

entre el 1º y el 3º terciles de HDL-c (Tabla 5). Primero, los portadores de combinaciones de dos variantes deletéreas fueron evaluados, como es mostrado en la Tabla 4 y entonces

la frecuencia de los portadores de combinaciones de tres variantes deletéreas fue comparada. Esas comparaciones mostraron que ser un portador de variantes de riesgo de los genes APOA1 y CETP aumentó en 2,4 veces la posibilidad de tener niveles de HDL-c < 39,8 mg/dl ($p=0,005$). Cuando, además de esa combinación, el individuo también es portador del alelo de riesgo del gen SCARB1, esa posibilidad era 2,26 veces mayor ($p=0,008$). Aunque ese gen no parezca alterar el riesgo de presentar bajos niveles de HDL-c, eso puede ser el resultado del hecho de que apenas un pequeño número de portadores cargan esa combinación triple. Cuando el gen SCARB1 fue analizado en combinaciones con los genes CETP y APOA1, resultados limítrofes fueron encontrados ($OR=1,6$, $p=0,08$), lo que no fue observado cuando los genes CETP y APOA1 genes fueron evaluados separadamente (Tabla 2).

Discusión

Las frecuencias alélicas encontradas en ese estudio son en su mayoría similares a aquellas detectadas en estudios con diferentes poblaciones. Para el gen CETP, la prevalencia de 35,7% para el alelo raro es levemente menor que aquella detectada en poblaciones de ascendencia europea exclusivamente, que fue de aproximadamente 40%¹³⁻¹⁷. En el gen ABCA1, los valores encontrados para el SNP Arg219Lys estuvieron dentro de los límites de variación encontrados en otras poblaciones de ascendencia europea: de 25% para alemanes a 38% para norte-americanos^{9,18-21}. Resultados similares fueron encontrados para el gen APOA1 cuando fue comparado con valores para otras poblaciones de ascendencia europea²². Nuestros datos sobre el gen SCARB1 son comparables a aquellos relatados en algunos pocos estudios publicados hasta hoy, pero la frecuencia alélica de 17% encontrada en el estudio para el SNP del intron 5 y la frecuencia de 29,3% para la variante del exon 8 son levemente diferentes de las frecuencias encontradas por Richard et al²³ para norteamericanos (9% y 49%) y por Acton et al¹⁰ para una población española (10,5% y 43,8%). Nuestro análisis de la variante en el exon 1 mostró que la frecuencia del alelo raro fue levemente más baja que aquella encontrada en una población española¹⁰. Esas diferencias pueden reflejar diferencias en la composición étnica de las poblaciones comparadas.

El estándar del desequilibrio de ligazón entre las variantes del gen APOA1 fue similar a aquel encontrado en la literatura²⁴. En nuestra población, ningún desequilibrio de ligazón fue encontrado entre el SNP del exon 1 del gen

SCARB1 y los otros SNPs del estudio, de acuerdo con los hallazgos relatados para otras poblaciones^{10,25,26}. Entre tanto, el estándar de ligazón de desequilibrio entre los SNPs del intron 5 y exon 8 difieren dependiendo de la población estudiada: en las poblaciones española¹⁰ y norteamericana²⁵, la variante rara del intron 5 estuvo ligada a la variante común del exon 8, que fue el mismo encontrado en otras poblaciones. Entre tanto, en una muestra poblacional de Austria y en una muestra poblacional diferente de los EUA, los dos alelos comunes estuvieron ligados^{23,26}.

Cuando fueron evaluados separadamente, nuestros datos no mostraron ninguna influencia significativa de los polimorfismos estudiados en los niveles de HDL-c (Tabla 4). Tres de las variantes estudiadas tenían frecuencias alélicas similares en la comparación entre el 1º y el 3º terciles. Dos de ellas son polimorfismos del gen SCARB1, encontrados en el intron 5 y exon 8, y los pocos datos sobre ellos en la literatura no muestran ninguna influencia sobre los niveles de HDL-c^{10,25-28}, ni indican ninguna asociación con el sexo y uso de hormonas^{23,28,29}. Además de eso, ninguna influencia de la variante Arg219Lys en el gen ABCA1 fue encontrada en varios estudios con diferentes poblaciones^{20,21,30}.

Seleccionamos polimorfismos de los genes CETP, APOA1 y SCARB1 para una evaluación combinada. Aunque algunos autores hayan detectado efectos aislados de esos genes en los niveles de HDL-c, varios otros estudios descubrieron que la influencia de esos genes es muy débil para ser detectada cuando son evaluados separadamente^{13,26,31,32}.

Esas diferencias en la magnitud de una influencia genética pueden reflejar diferencias entre la composición genética de cada población, así como las diferencias ambientales entre ellas. La evaluación del efecto combinado de genes en los niveles de HDL-c es rara en la literatura, lo que vuelve la comparación de datos difícil. La evaluación de dos o tres variantes de riesgo reveló una influencia significativa de las variantes de los genes APOA1, CETP y SCARB1 en los niveles de HDL-c. Ese hallazgo está de acuerdo con estudios de los genes APOA1 y CETP en otras poblaciones^{8,33-37}. Entre tanto, para el SNP Gly2Ser del gen SCARB1, los pocos estudios conducidos hasta ahora asociaron la presencia del alelo 2Gly con una disminución en los niveles de HDL-c. En nuestra población, la combinación del alelo 2Ser y las variantes de los genes APOA1 y CETP fue más frecuente en los participantes con niveles más bajos de HDL-c (Tabla 5). Dos otros autores^{25,27} no detectaron ninguna influencia significativa de ese alelo sobre los niveles de HDL-c. De esa forma, el papel

Tabla 5 - Frecuencia de variantes de polimorfismo de estado de portador duplo y triplo de acuerdo con terciles de HDL-C

	OR (95%CI)	1o. tercil n=120	3o. tercil n= 121	p
Variantes genéticas del estado de portador doble				
APOA1, CETP	2,4 (1,26 – 4,48)	85	70	0,005
APOA1, SCARB1	1,6 (0,88 – 2,91)	28	19,8	0,08
CETP, SCARB1	1,6 (0,88 – 2,91)	26	20	0,08
Variantes genéticas del estado de portador triple				
APOA1, CETP, SCARB1	2,26 (1,19 – 4,29)	28,3	14,9	0,008

de ese polimorfismo debe ser investigado en otros estudios y no podemos descartar la posibilidad de que actúe como marcador de otra variante aun no estudiada, aunque sea un intercambio de aminoácidos. La confirmación de esa hipótesis explicaría las diferencias entre nuestros datos y los hallazgos relatados por Acton et al¹⁰.

Los papeles fisiológicos de esas tres proteínas están íntimamente asociados: CETP es una enzima-clave en el metabolismo de HDL³⁸, en cuanto SR-BI y apoA1 actúan como receptor y ligante del HDL-c^{39,40}. De esa forma, la interacción detectada puede ser entendida cuando es analizada en asociación con el metabolismo y vía de absorción del HDL-c.

El presente estudio detectó influencias genéticas en los niveles de HDL-c, pero presentó algunas limitaciones. Los mayores problemas fueron el pequeño tamaño de la muestra para el estudio de asociación y el hecho de que no había datos disponibles para 140 pacientes. De esa forma, influencias genéticas menos evidentes, que pueden ser detectadas apenas en una muestra mayor, pueden haber sido perdidas. Además de eso, un estudio prospectivo de la influencia de las combinaciones alélicas debe ser realizado para confirmar el impacto clínico de esos genes en el perfil lipídico de nuestra población.

La dirección de la influencia genética en los niveles de HDL-c parece ser, en la mayoría de los casos, independiente del background genético o de variaciones ambientales, pero la magnitud de ese efecto difiere grandemente entre diferentes poblaciones. Cualquier característica

multifactorial es influenciada por varios *loci*; de esa forma, análisis de interacciones entre genes deben ser realizadas, pues pueden ser la única forma de evaluar su real papel genético en cada población.

Agradecimientos

Agradecemos a Maria Perpetua de Oliveira Pinto por su auxilio técnico y Marcel Arsand y Fabiano Roldão por su ayuda en la recolección de la muestra. Agradecemos al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico y Tecnológico (CNPq, Brasil), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) y Fundación de Amparo a la Pesquisa del Estado de Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brasil) por el apoyo financiero.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiamiento

El presente estudio fue financiado por el CNPq, CAPES, PRONEX y FAPERGS.

Vinculación Académica

Este artículo es parte de tesis de Doctorado de Fabiana Michelsen de Andrade por la Universidad Federal de Rio Grande do Sul.

Referencias

1. Assman G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience): Prospective Cardiovascular Munster study. *Am J Cardiol.* 1992; 70 (7): 733-7.
2. de Andrade FM, Silveira FR, Arsand M, Antunes ALS, Torres MR, Zago AJ, et al. Association between -250G/A polymorphism of the hepatic lipase gene promoter and coronary artery disease and HDL-C levels in a Southern Brazilian population. *Clin Genet.* 2004; 65 (5): 390-5.
3. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1997; 20 (7): 1183-97.
4. Pesce AJ, Kaplan LA. *Methods in clinical chemistry.* Saint Louis: The C. V. Mosby Co; 1987.
5. Friedwald 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 (6): 499-502.
6. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid Res.* 1991; 19 (19): 5444.
7. Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O, et al. Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism the cholesterol transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1995; 96 (3): 1664-71.
8. Wang XL, Badenhop R, Humphrey KE, Wilcken DEL. New MspI polymorphism at +83 bp of the human apolipoprotein AI gene: association with increased circulating high density lipoprotein cholesterol levels. *Gen Epidemiol.* 1996; 13 (1): 1-10.
9. Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwarts KY, Molhuizen HO, Roomp K, et al. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation.* 2001; 103 (9): 1198-205.
10. Acton S, Osgood D, Donoghue M, Corella D, Pocovi M, Cenarro A, et al. Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19 (7): 1734-43.
11. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. *Arlequin ver. 2.000: a software for population genetics data analysis.* Geneva: University of Geneva; 2000.
12. Long JC. Multiple locus haplotype analysis, version 2.0. Software and documentation distributed by the author: section on population genetics and linkage, laboratory of neurogenetics, NIAAA. Bethesda: National Institutes of Health; 1999.
13. Thompson JF, Durham LK, Lira ME, Shear C, Milos PM. CETP polymorphisms associated with HDL cholesterol may differ from those associated with cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2005; 181 (1): 45-53.
14. Klos KLE, Sing CF, Boerwinkle E, Hamon SC, Rea TJ, Clark A, et al. Consistent effects of genes involved in reverse cholesterol transport on plasma lipid and apolipoprotein levels in CARDIA participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26 (8): 1828-36.
15. Nettleton JA, Steffen LM, Ballantyne CM, Boerwinkle E, Folsom AR. Associations between HDL-cholesterol and polymorphisms in hepatic lipase and lipoprotein lipase genes are modified by dietary fat intake in African American and White adults. *Atherosclerosis.* 2007; 194 (2): e131-40.
16. Sorlí JV, Corella D, Francés F, Ramírez JB, González JJ, Guillén M, et al. The effect of the APOE polymorphism on HDL-C concentrations depends on

- the cholesterol ester transfer protein gene variation in a Southern European population. *Clin Chim Acta*. 2006; 366 (1-2): 196-203.
17. McCaskie PA, Beilby JP, Chapman CM, Hung J, McQuillan BM, Thompson PL, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene haplotypes, plasma high-density lipoprotein levels and the risk of coronary heart disease. *Hum Genet*. 2007; 121 (3-4): 401-11.
 18. Porchay I, Péan F, Bellili N, Royer B, Cogneau J, Chesnier M-C, et al. (for the D.E.S.I.R. Study Group): ABCA1 Single nucleotide polymorphisms on high-density lipoprotein-cholesterol and overweight: the D.E.S.I.R. Study. *Obesity*. 2006; 14 (11): 1874-9.
 19. Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JI, Burke GL, et al. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 2007; 193 (2): 352-60.
 20. Mantaring M, Rhyne J, Ho Hong S, Miller M. Genotypic variation in ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) as contributors to the high and low high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) phenotype. *Transl Res*. 2007; 149 (4): 205-10.
 21. Pasdar A, Yadegarfar G, Cumming A, Whalley L, St Clair D, MacLeod MJ. The effect of ABCA1 gene polymorphisms on ischaemic stroke risk and relationship with lipid profile. *BMC Med Genet*. 2007; 8: 30.
 22. Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Laakso M. MspI polymorphism at +83 bp in intron 1 of the human apolipoprotein A1 gene is associated with elevated levels of HDL cholesterol and apolipoprotein A1 in nondiabetic subjects but not in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *Diabetes Care*. 2000; 23 (6): 791-5.
 23. Richard E, von Muhlen D, Barrett-Connor E, Alcaraz J, Davis R, McCarthy JJ. Modification of the effects of estrogen therapy on HDL cholesterol levels by polymorphisms of the HDL-C receptor, SR-BI: the Rancho Bernardo Study. *Atherosclerosis*. 2005; 180 (2): 255-62.
 24. Kamboh MI, Bunker CH, Aston CE, Nestlerode CS, McAllister AE, Ukoli FA. Genetic association of five apolipoprotein polymorphisms with serum lipoprotein-lipid levels in African Blacks. *Genet Epidemiol*. 1999; 16 (2): 205-22.
 25. Osgood D, Corella D, Demissie S, Cupples LA, Wilson PWF, Meigs JB, et al. Genetic variation at the scavenger receptor class B type I gene locus determines plasma lipoprotein concentrations and particle size and interacts with type 2 diabetes: the Framingham Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88 (6): 2869-79.
 26. Ritsch A, Sonderegger G, Sandhofer A, Stanzl U, Tancevski I, Eller P, et al. Scavenger receptor class B type I polymorphisms and peripheral arterial disease. *Metabolism*. 2007; 56 (8): 1135-41.
 27. Morabia A, Ross BM, Costanza MC, Cayanis E, Flaherty MS, Alvin GB, et al. Population-based study of SR-BI genetic variation and lipid profile. *Atherosclerosis*. 2004; 175 (1): 159-68.
 28. Bauerfeind A, Knoblauch H, Costanza MC, Luganskaja T, Toliat MR, Nürnberg P, et al. Concordant association of lipid gene variation with a combined HDL/LDL-cholesterol phenotype in two European populations. *Hum Hered*. 2006; 61 (3): 123-31.
 29. Roberts CG, Shen H, Mitchell BD, Damcott CM, Shuldiner AR, Rodriguez A. Variants in scavenger receptor class B type I gene are associated with HDL cholesterol levels in younger women. *Hum Hered*. 2007; 64 (2): 107-13.
 30. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Steffensen R, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABCA1 predicts ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28 (1): 180-6.
 31. Ma YQ, Thomas GN, Tomlinson B. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI polymorphisms with lipid and blood pressure levels. *Int J Cardiol*. 2005; 102 (2): 309-14.
 32. Chien KL, Chen MF, Hsu HC, Su TC, Chang WT, Lee CM, et al. Genetic association study of APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and haplotypes on triglyceride and HDL cholesterol in a community-based population. *Clin Chim Acta*. 2008; 388 (1-2): 78-83.
 33. Boedkholdt SM, Thompson JF. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. *J Lipid Res*. 2003; 44 (6): 1080-93.
 34. Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V, McMahon AD, Braund PS, Cheng S, et al. A polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Eur Heart J*. 2003; 24 (20): 1833-42.
 35. Park KW, Choi JH, Kim HK, Oh S, Chae IH, Kim HS, et al. The association of cholesteryl ester transfer protein polymorphism with high-density lipoprotein cholesterol and coronary artery disease in Koreans. *Clin Genet*. 2003; 63 (1): 31-8.
 36. Ma YQ, Thomas GN, Ng M CY, Critchley JAJH, Cockram CS, Chan JCN, et al. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI polymorphisms with high density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels and indices of obesity in selected healthy Chinese subjects and in patients with early-onset type diabetes. *Clin Endocrinol*. 2003; 59 (4): 442-9.
 37. Zou Y, Hu D, Yang X, Jia X, Wang L, Cui L, et al. Relationships among apolipoprotein A1 gene polymorphisms lipid levels and coronary atherosclerosis disease. *Clin Med J (Engl)*. 2003; 116 (5): 665-8.
 38. Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr*. 1998; 18: 297-330.
 39. Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Engler JA, Borhani DW. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1531 (1-2): 4-46.
 40. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 1996; 271 (5248): 518-20.