

## NUOVI SCENARI

# CAPACITÀ DI EFFLUSSO DI COLESTEROLO (CEC): INDICE DI ATTIVITÀ ATEROPROTETTIVA DELLE HDL?

## Cholesterol efflux capacity (CEC): an index of atheroprotective activity of HDL?

ELDA FAVARI, FRANCO BERNINI

Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma

### SUMMARY

RCT provides a physiological strategy of protection from atherosclerosis. HDL play a leading role by promoting the removal of excess cholesterol in the arterial wall through the induction of cellular cholesterol efflux from cells. Cholesterol efflux represents the first and perhaps most important step of RCT. The ability of HDL to promote cholesterol efflux depends on their quality and the pathologic processes that induce their modifications. Many of the available data on the physiology and pharmacology of RCT depend on studies in animal models that have demonstrated that the enhancement of RCT is inversely correlated with the development of atherosclerosis.

Although the inverse association between HDL plasma levels and CVD risk has been postulated for years, recently this concept has been challenged by studies reporting that HDL antiatherogenic functions may be independent of their plasma levels. In humans, the efficiency of the RCT can be evaluated with the surrogate parameter of serum cholesterol efflux capacity, CEC, that indicates the ability of HDL to promote efflux of cholesterol in the individual patient. Recent clinical data suggest that the evaluation of CEC is a strong predictor of atherosclerosis extent in humans and may represent in the future a useful biomarker of cardiovascular risk.

**Keywords:** Cholesterol efflux, HDL, atherosclerosis.

Numerosi studi epidemiologici definiscono le HDL come il più potente fattore plasmatico ateroprotettivo nell'uomo; un aumento di 1 mg/dl di colesterolo HDL (HDL-C) si associa infatti ad una riduzione del 3-4% della mortalità cardiovascolare (1). Alcune post-hoc analisi di studi randomizzati e controllati suggeriscono inoltre che l'aumento di HDL-C influisce in modo positivo sul rischio di malattia

cardiovascolare (2). Tuttavia, la valenza protettiva dell'aumento dei livelli di HDL-C indotto farmacologicamente non è ancora stata dimostrata.

I risultati dei recenti studi clinici in cui niacina e dalcetrapib (inibitore dell'enzima CETP) venivano aggiunti alla terapia standard di riduzione del colesterolo LDL non sono riusciti a dimostrare un beneficio clinico aggiuntivo, nonostante il raggiungimento del target farmacologico di aumento della concentrazione plasmatica di HDL-C (3, 4). Inoltre, l'osservazione che varianti genetiche associate ad aumentati livelli di HDL-C non comportano miglioramento degli outcomes cardiovascolari (5)

*Indirizzo per la corrispondenza*

Dott.ssa Elda Favari  
Dipartimento di Farmacia  
Parco Area delle Scienze, 27/A  
43124 Parma  
Email: elda.favari@unipr.it

ha rafforzato l'idea che l'aumento dei livelli plasmatici di HDL-C non rappresenti un obiettivo terapeutico efficace.

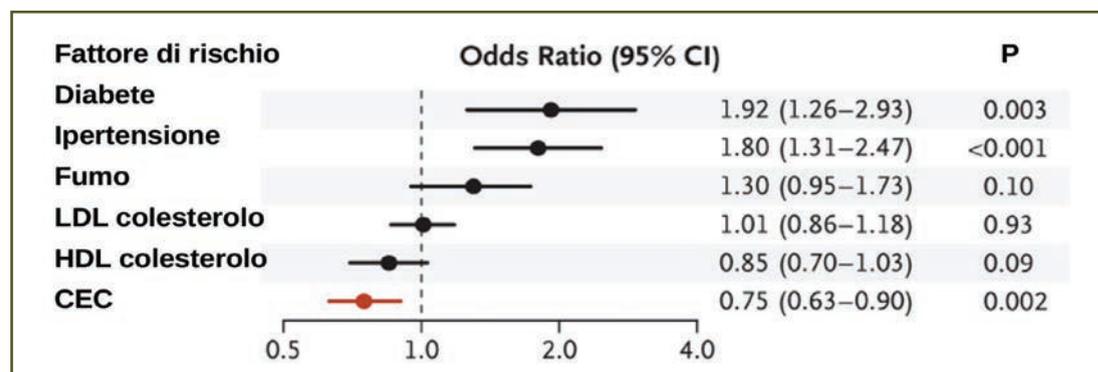
Nell'ambito di questo dibattito è parallelamente emerso il concetto di "qualità" delle HDL. Queste lipoproteine infatti, diversamente dalle LDL, sono eterogenee in termini di dimensione, carica, contenuto lipidico (6) e caratteristiche strutturali che conferiscono loro specificità e differenze funzionali, quali la promozione dell'efflusso cellulare di colesterolo (7).

Questo processo, che promuove la rimozione di colesterolo dai macrofagi della parete arteriosa e ne media il trasporto al fegato per l'eliminazione intestinale (8), rappresenta infatti una tra le più importanti proprietà antiaterogene delle HDL. Studi di modificazioni genetiche e farmacologiche in modelli animali hanno dimostrato come la valutazione del processo di trasporto inverso del colesterolo, mediato dalla funzionalità delle HDL nelle diverse fasi di questo processo, possa essere considerata come un indicatore della malattia aterosclerotica migliore rispetto alla semplice valutazione della concentrazione plasmatica delle HDL (9).

Poiché nell'uomo l'efflusso cellulare del colesterolo può avvenire tramite diversi meccanismi mediati specificamente da alcuni trasportatori attivi (SR-BI, ABCA1 ed

ABCG1), oltre che attraverso il processo passivo di diffusione acquosa, e poiché è descritto come l'attività dei trasportatori sia favorita in modo specifico dalle diverse sottoclassi funzionali delle HDL, l'efficacia dell'attività delle HDL di ogni singolo individuo può essere valutata misurando la "Capacità di Efflusso di Colesterolo" (CEC) con metodiche standardizzate che permettono di misurare l'apporto dei singoli meccanismi coinvolti (7). La prima osservazione sperimentale che ha attribuito alla CEC del siero un significato come indice di protezione cardiovascolare viene da uno studio che ha dimostrato come, in due coorti distinte di soggetti, questa variabile rappresenti un parametro predittivo dell'ispessimento medio-intimale carotideo, quale indice di aterosclerosi subclinica, indipendentemente dai valori plasmatici delle HDL sieriche (*Figura 1*) (10). Inoltre, un nostro studio condotto su soggetti sani ha mostrato come la CEC ABCA1-mediata correli inversamente ed in modo indipendente dai livelli di HDL-C con la rigidità vascolare (*Figura 2*) (11).

Tali osservazioni suggeriscono che la funzionalità delle HDL, misurata tramite la CEC, potrebbe essere più rilevante delle concentrazioni plasmatiche nella quantificazione del rischio cardiovascolare.



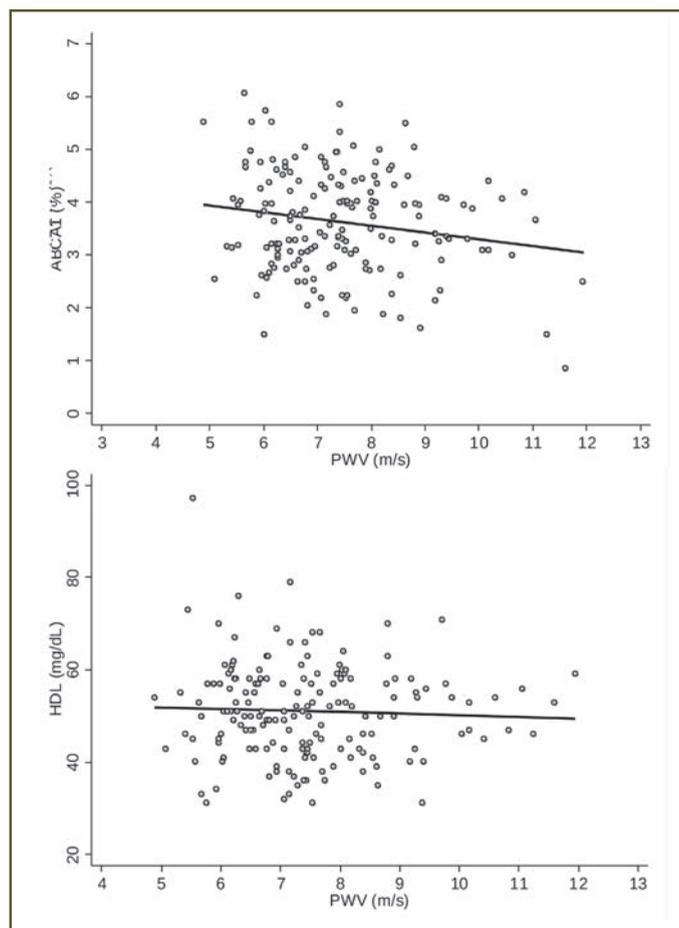
**Figura 1** - Odds Ratio di malattia coronarica di CEC e fattori di rischio selezionati. Modificata da Khera A.V. et al. NEJM, 2011.

A sostegno di questa osservazione, in accordo sia con alcuni studi genetici precedentemente menzionati (5) che con i risultati delle nuove strategie farmacologiche di innalzamento delle concentrazioni plasmatiche delle HDL (3, 4), abbiamo dimostrato come elevati livelli di HDL-C non concorrano ad una riduzione del rischio cardiovascolare e come invece la funzionalità delle HDL rappresenti un parametro da valutare non solo nella determinazione del rischio ma anche come target farmacologico (12, 13).

Al momento esistono pochi dati ed in parte discordanti sulle correlazioni tra CEC ed eventi cardiovascolari e/o progressione delle lesioni ateromasiche in soggetti con aterosclerosi subclinica o clinica.

A tale proposito, diverse evidenze sperimentali suggeriscono che la CEC sia sensibile alla composizione delle HDL piuttosto che ai livelli plasmatici di HDL-C. È stato dimostrato infatti come la capacità del siero di promuovere l'efflusso di colesterolo tramite il trasportatore ABCA1 dipenda strettamente dalla presenza nel siero di HDL nascenti (pre-beta) e non dalla concentrazione plasmatica del colesterolo HDL (14, 15). I soggetti portatori della mutazione apo-AI<sub>Milano</sub> o deficit dell'enzima esterificante il colesterolo LCAT, che hanno alti livelli circolanti di queste particelle pre-beta HDL, mostrano una buona capacità del siero di rimuovere la massa di colesterolo dai macrofagi nonostante livelli molto bassi di HDL-C (14, 16, 17) e presentano un'eccezionale longevità dovuta, almeno in parte, alla rarità degli eventi cardiovascolari (18, 19). Sulla base di queste ed altre osservazioni vi è quindi una crescente evidenza di come la misura della funzionalità HDL in diverse popolazioni, come valutazione della CEC del siero, possa essere considerata un migliore predittore di malattia coronarica rispetto alla misura dei livelli di HDL-C (10). Questo

concetto è concorde con gli studi in cui si dimostra come i soggetti affetti da CVD non solo hanno deficit di HDL, ma presentano anche importanti riarrangiamenti della composizione di queste lipoproteine (20, 21) che di conseguenza ne modificano la funzione. Inoltre, in accordo con questa ipotesi è stato dimostrato come in soggetti con aterosclerosi la mieloperossidasi porti alla formazione di HDL modificate e non funzionali nel mediare l'efflusso di coleste-



**Figura 2** - Correlazione tra PWV e CEC ABCA1-mediata delle HDL del siero. Pannello superiore: PWV = Pulse Wave Velocity carotide-femorale, ABCA1 = CEC ABCA1-mediata (%) dopo 4 h di esposizione al 2% di siero; ( $r=-0,183$ ;  $P=0,018$ ) Pannello inferiore: PWV = Pulse Wave Velocity carotide-femorale, HDL (mg/dL) = concentrazione sierica delle HDL-C; ( $r=-0,002$ ;  $P=0,985$ ). Modificata da Favari et al. JLR, 2013.

rolo dai macrofagi tramite ABCA1 in modo indipendente dalla concentrazione plasmatica delle HDL-C (22).

Questa osservazione è stata confermata in soggetti con sindrome coronarica acuta (SCA), in cui modificazioni strutturali delle HDL portano ad una loro alterata capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo cellulare (23). I livelli, la composizione e le proprietà antiaterogene delle HDL, compresa la CEC, sono risultati alterati in pazienti affetti da malattie reumatiche croniche (24, 25).

In particolare si è osservato che la CEC è compromessa in pazienti con artrite reumatoide e lupus eritematoso sistemico in cui l'infiammazione unita ad elevati livelli di attività plasmatica della mieloperossidasi giustificavano, almeno in parte, l'elevato rischio cardiovascolare; negli stessi soggetti la CEC è risultata correlata con il grado di infiammazione e con gli elevati livelli di attività plasmatica della mieloperossidasi (26, 27). Analogamente, in donne con sindrome dell'ovaio policistico è stato descritto un profilo lipidico proaterogeno in termini di numero, dimensioni delle particelle e riduzione della CEC del siero, a sostegno, anche in questo caso, del quadro di elevato rischio cardiovascolare che caratterizza queste pazienti (28). Al fine di avvalorare ulteriormente la tesi relativa alla "funzionalità delle HDL" sono stati pubblicati alcuni lavori scientifici che prendono in considerazione differenti parametri quali indicatori di indice di rischio cardiovascolare. È stato dimostrato come la dilatazione flusso mediata (FMD), quale indice di funzionalità endoteliale e parametro surrogato di rischio cardiovascolare (29), mostri una correlazione positiva con l'efflusso mediato dalla proteina ABCA1, a conferma di come la valutazione della funzionalità delle HDL possa rappresentare un indicatore di tale rischio (30).

Li e colleghi hanno fornito dati che indicano come i soggetti nel terzile superiore della CEC abbiano un rischio moderatamente aumentato rispetto ad un end-point cardiovascolare composito di incidenza di infarto del miocardio, ictus, o morte durante tre anni di follow-up (31).

Tuttavia, nello stesso studio, la CEC era inversamente associata alla malattia coronarica. Le ragioni di questi risultati, apparentemente contraddittori, richiedono un'ulteriore valutazione, ma possono essere correlati alle caratteristiche della popolazione coinvolta nello studio stesso (32). Un recente studio caso-controllo ha dimostrato come la CEC sia inversamente associata all'aumento della stenosi carotidea ed ad una più avanzata morfologia della placca, suggerendo quindi che la CEC possa essere un biomarker di malattia a questo livello (33). Complessivamente, i dati disponibili suggeriscono come la valutazione della CEC possa correlare meglio con il rischio di malattia coronarica rispetto alla valutazione dei livelli plasmatici di HDL-C, indicando inoltre come il miglioramento terapeutico della qualità e funzionalità delle HDL possa rappresentare una strategia farmacologica più efficace (34) anche se ulteriori studi sono necessari per dimostrare il ruolo ateroprotettivo delle HDL e della CEC come indice di predizione del rischio cardiovascolare.

### Glossario

- CETP:** Cholesteryl ester transfer protein.
- RCT:** Reverse cholesterol transport.
- CEC:** Capacità di efflusso di colesterolo.
- SR-BI:** Scavenger receptor, class B, type I.
- ABCA1:** ATP-binding cassette A1.
- ABCG1:** ATP-binding cassette G1.
- LCAT:** Lecithin cholesterol acil transferase.
- CVD:** Cardiovascular disease.
- SCA:** Sindrome coronarica acuta.
- FMD:** Flow mediated dilation.

**RIASSUNTO**

Il processo del trasporto inverso del colesterolo (RCT), dalle cellule periferiche al fegato, rappresenta una strategia fisiologica di protezione dall'aterosclerosi in quanto si contrappone all'accumulo di colesterolo nelle cellule stesse. Le HDL svolgono un ruolo di primo piano in questo processo favorendo la rimozione del colesterolo in eccesso dalla parete arteriosa tramite la loro capacità di indurre l'efflusso cellulare di colesterolo, che rappresenta infatti il primo e forse più importante step dell'RCT. La capacità delle HDL di promuovere l'efflusso di colesterolo dipende dalla loro qualità e dalle modificazioni qualitative che possono subire durante i diversi processi patologici.

Molti dei dati fisiologici e farmacologici relativi al processo dell'RCT derivano da studi in modelli animali che dimostrano come il miglioramento del processo di RCT sia inversamente correlato con lo sviluppo di aterosclerosi. Sulla base di questi risultati anche se l'associazione inversa tra i livelli plasmatici delle HDL ed il rischio cardiovascolare è stata ipotizzata da anni, recentemente questo concetto è stato contestato da studi che riportano come le funzioni antiaterogene delle HDL possano essere indipendenti dai loro livelli plasmatici. Negli esseri umani, l'efficienza del RCT può essere valutata attraverso un parametro indice della capacità di efflusso di colesterolo, CEC, che quantifica la capacità delle HDL di promuovere l'efflusso di colesterolo nel singolo paziente. Recenti dati clinici suggeriscono che la valutazione della CEC sia un forte predittore di aterosclerosi nell'uomo e potrebbe rappresentare in futuro un biomarker utile per una migliore definizione del rischio cardiovascolare.

**Parole chiave:** *Efflusso di colesterolo, HDL, aterosclerosi.*

**Bibliografia**

1. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002; 105: 310-5.
2. Toth PP, Barter PJ, Rosenson RS, Boden WE, Chapman MJ, Cuchel M, et al. High-density lipoproteins: a consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol*. 2013; 7: 484-525.
3. The role of niacin in raising high-density lipoprotein cholesterol to reduce cardiovascular events in patients with atherosclerotic cardiovascular disease and optimally treated low-density lipoprotein cholesterol: baseline characteristics of study participants. The Atherothrombosis Intervention in Metabolic syndrome with low HDL/high triglycerides: impact on Global Health outcomes (AIM-HIGH) trial. *Am Heart J*. 2011; 161: 538-43.
4. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012; 367: 2089-99.
5. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012; 380: 572-80.
6. Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. High-density lipoprotein quantity or quality for cardiovascular prevention? *Curr Pharm Des*. 2010; 16: 1494-503.
7. Adorni MP, Zimetti F, Puntoni M, Bigazzi F, Sbrana F, Minichilli F, et al. Cellular cholesterol efflux and cholesterol loading capacity of serum: effects of LDL-apheresis. *J Lipid Res*. 2012; 53: 984-9. PMID: 3329398.
8. Zanotti I, Favari E, Bernini F. Cellular cholesterol efflux pathways: impact on intracellular lipid trafficking and methodological considerations. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13: 292-302.
9. Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009; 50 (Suppl.): S189-94.
10. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011; 364: 127-35.
11. Favari E, Ronda N, Adorni MP, Zimetti F, Salvi P, Manfredini M, et al. ABCA1-dependent serum cholesterol efflux capacity inversely correlates with pulse wave velocity in healthy subjects. *J Lipid Res*. 2013; 54: 238-43.
12. Vigna GB, Satta E, Bernini F, Boarini S, Bosi C, Giusto L, et al. Flow-mediated dilation, carotid wall thickness and HDL function in subjects with hyperalphalipoproteinemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.

13. Khera AV, Patel PJ, Reilly MP, Rader DJ. The addition of niacin to statin therapy improves high-density lipoprotein cholesterol levels but not metrics of functionality. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62: 1909-10.
14. Calabresi L, Favari E, Moleri E, Adorni MP, Pedrelli M, Costa S, et al. Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum. *Atherosclerosis*. 2009; 204: 141-6.
15. de la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos BF, Cuchel M, Rader DJ, Rothblat GH. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30: 796-801.
16. Favari E, Gomaschi M, Zanotti I, Bernini F, Lee-Rueckert M, Kovanen PT, et al. A unique protease-sensitive high density lipoprotein particle containing the apolipoprotein A-I (Milano) dimer effectively promotes ATP-binding Cassette A1-mediated cell cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2007; 282: 5125-32.
17. Calabresi L, Nilsson P, Pinotti E, Gomaschi M, Favari E, Adorni MP, et al. A novel homozygous mutation in CETP gene as a cause of CETP deficiency in a Caucasian kindred. *Atherosclerosis*. 2009; 205: 506-11.
18. Calabresi L, Baldassarre D, Castelnuovo S, Conca P, Bocchi L, Candini C, et al. Functional lecithin: cholesterol acyltransferase is not required for efficient atheroprotection in humans. *Circulation*. 2009; 120: 628-35.
19. Sirtori CR, Calabresi L, Franceschini G, Baldassarre D, Amato M, Johansson J, et al. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study. *Circulation*. 2001; 103: 1949-54.
20. Campos H, Roederer GO, Lussier-Cacan S, Davignon J, Krauss RM. Predominance of large LDL and reduced HDL2 cholesterol in normolipidemic men with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 1043-8.
21. Sweetnam PM, Bolton CH, Yarnell JW, Bainton D, Baker IA, Elwood PC, et al. Associations of the HDL2 and HDL3 cholesterol subfractions with the development of ischemic heart disease in British men. The Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease Studies. *Circulation*. 1994; 90: 769-74.
22. Shao B, Tang C, Sinha A, Mayer PS, Davenport GD, Brot N, et al. Humans With Atherosclerosis Have Impaired ABCA1 Cholesterol Efflux and Enhanced High-Density Lipoprotein Oxidation by Myeloperoxidase. *Circ Res*. 2014; 114: 1733-42.
23. Tan Y, Liu TR, Hu SW, Tian D, Li C, Zhong JK, et al. Acute coronary syndrome remodels the protein cargo and functions of high-density lipoprotein subfractions. *PLoS One*. 2014; 9: e94264.
24. Onat A, Direskeneli H. Excess cardiovascular risk in inflammatory rheumatic diseases: pathophysiology and targeted therapy. *Curr Pharm Des*. 2012; 18: 1465-77.
25. Watanabe N, Nakajima H. Coinhibitory molecules in autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 269756.
26. Ronda N, Favari E, Borghi MO, Ingegnoli F, Gerosa M, Chighizola C, et al. Impaired serum cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2013.
27. Charles-Schoeman C, Lee YY, Grijalva V, Amjadi S, FitzGerald J, Ranganath VK, et al. Cholesterol efflux by high density lipoproteins is impaired in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71: 1157-62.
28. Roe A, Hillman J, Butts S, Smith M, Rader D, Playford M, et al. Decreased cholesterol efflux capacity and atherogenic lipid profile in young women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99: E841-7.
29. Gori T, Muxel S, Damaske A, Radmacher MC, Fasola F, Schaefer S, et al. Endothelial function assessment: flow-mediated dilation and constriction provide different and complementary information on the presence of coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2012; 33: 363-71.
30. Vazquez E, Sethi AA, Freeman L, Zalos G, Chaudhry H, Haser E, et al. High-density lipoprotein cholesterol efflux, nitration of apolipoprotein A-I, and endothelial function in obese women. *Am J Cardiol*. 2012; 109: 527-32.
31. Li XM, Tang WH, Mosior MK, Huang Y, Wu Y, Matter W, et al. Paradoxical association of enhanced cholesterol efflux with increased incident cardiovascular risks. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33: 1696-705.
32. Khera AV, Rader DJ. Cholesterol efflux capacity: full steam ahead or a bump in the road? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33: 1449-51.
33. Doonan RJ, Hafiane A, Lai C, Veinot JP, Genest J, Daskalopoulou SS. Cholesterol efflux capacity, carotid atherosclerosis, and cerebrovascular symptomatology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34: 921-6.
34. Kosmas CE, Christodoulidis G, Cheng JW, Vittorio TJ, Lerakis S. High-density lipoprotein functionality in coronary artery disease. *Am J Med Sci*. 2014; 347: 504-8.