



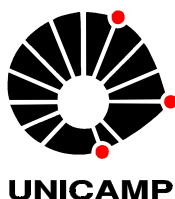
LUIZ SÉRGIO FERNANDES DE CARVALHO

INFLUÊNCIA DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) E DE SEU
METABOLISMO INTRAVASCULAR SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E FUNÇÃO
ENDOTELIAL NA FASE AGUDA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO

*HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN (HDL) AND ITS INTRAVASCULAR METABOLISM
INFLUENCE INFLAMMATORY RESPONSE AND ENDOTHELIAL FUNCTION DURING
ACUTE PHASE OF MYOCARDIAL INFARCTION*

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LUIZ SÉRGIO FERNANDES DE CARVALHO

INFLUÊNCIA DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) E DE SEU
METABOLISMO INTRAVASCULAR SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E FUNÇÃO
ENDOTELIAL NA FASE AGUDA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO

*HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN (HDL) AND ITS INTRAVASCULAR METABOLISM
INFLUENCE INFLAMMATORY RESPONSE AND ENDOTHELIAL FUNCTION DURING
ACUTE PHASE OF MYOCARDIAL INFARCTION*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas com área de concentração em Ciências Biomédicas.

Thesis presented to the Medical Sciences Faculty at the State University of
Campinas as a partial requirement to obtain the Doctoral (PhD) degree in Medical
Sciences, concentration field in Biomedical Sciences.

ORIENTADOR: ANDREI CARVALHO SPOSITO
CO-ORIENTADOR: VALÉRIA NASSER FIGUEIREDO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO LUIZ SÉRGIO FERNANDES DE CARVALHO E ORIENTADO PELO
PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO.

Campinas

2015

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

C253i Carvalho, Luiz Sérgio Fernandes de, 1986-
Influência da lipoproteína de alta densidade (HDL) e de seu metabolismo intravascular sobre a resposta inflamatória e função endotelial na fase aguda do infarto do miocárdio / Luiz Sérgio Fernandes de Carvalho. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Andrei Carvalho Sposito.
Coorientador: Valéria Nasser Figueiredo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lipoproteínas HDL. 2. Disfunção endotelial. 3. Infarto do miocárdio. 4. Síndrome de resposta inflamatória sistêmica. 5. Reação de fase aguda. 6. Proteínas de transferência de ésteres de colesterol. I. Sposito, Andrei Carvalho, 1967-. II. Figueiredo, Valéria Nasser, 1983-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: High-density lipoprotein (HDL) and its intravascular metabolism influence inflammatory response and endothelial function after acute phase of myocardial infarction

Palavras-chave em inglês:

Lipoproteins, HDL
Endothelial dysfunction
Myocardial infarction
Systemic inflammatory response syndrome
Acute-phase reaction
Cholesterol ester transfer proteins

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Andrei Carvalho Sposito [Orientador]
José Carlos Nicolau
Amanda Guerra de Moraes Rego Sousa
Maria Luiza Moretti
Otávio Rizzi Coelho

Data de defesa: 06-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

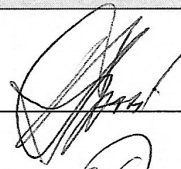
LUIZ SÉRGIO FERNANDES DE CARVALHO

Orientador PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO

Coorientadora PROFA. DRA. VALÉRIA NASSER FIGUEIREDO

MEMBROS:

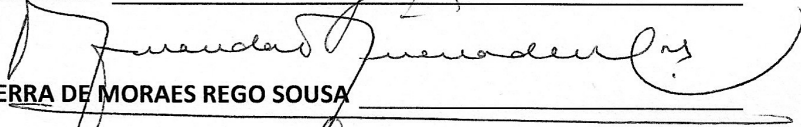
1. PROF(A). DR(A). ANDREI CARVALHO SPOSITO



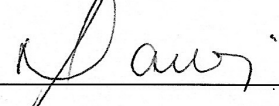
2. PROF(A). DR(A). JOSÉ CARLOS NICOLAU



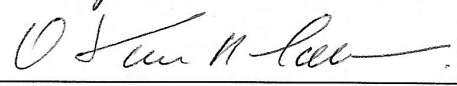
3. PROF(A). DR(A). AMANDA GUERRA DE MORAES REGO SOUSA



4. PROF(A). DR(A). MARIA LUIZA MORETTI



5. PROF(A). DR(A). OTÁVIO RIZZI COELHO



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06 de fevereiro de 2015.

RESUMO

Introdução: A resposta de fase aguda (RFA) transforma a lipoproteína de alta densidade (HDL) em uma partícula disfuncional que pode favorecer o estresse oxidativo/inflamatório e disfunção da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Ao mesmo tempo, a modulação do metabolismo da HDL pela proteína de transferência de colesterol ester (CETP) parece estar associada a um potencial efeito anti-inflamatório durante a RFA relacionada a sepse. Embora esses mecanismos possam estar envolvidos na disfunção endotelial que se segue ao infarto do miocárdio com supra de ST (IMCSST), essas hipóteses nunca foram testadas em humanos.

Método: Plasma foi obtido de pacientes consecutivos com IMCSST (n=116 a 180) nas primeiras 24 horas após o início dos sintomas (D1) e no 5º dia (D5), sendo utilizado para medir: proteína C reativa (PCR), nitrato/nitrito (NOx) e atividade de CETP. As lipoproteínas foram isoladas por ultracentrifugação de gradiente. A oxidabilidade de LDL co-incubada com HDL (HDL_{aoxLDL}) e auto-oxidabilidade da HDL (HDL_{autox}) foram medidas após a incubação com CuSO₄. A atividade anti-inflamatória da HDL foi estimada pela secreção de VCAM-1 por células endoteliais da veia umbilical humana, após a incubação com TNF- α . Dilatação mediada por fluxo (FMD) foi avaliada no 30º dia (D30).

Resultados: Entre os pacientes no 1º tercil de HDL-colesterol no D1 (<33mg/dL), o incremento de NOx entre D1 e D5 e a FMD ajustada para várias co-variáveis foram maiores do que naqueles no 2º (33-42mg/dL) e 3º (>42mg/dL) tercils. Do D1 ao D5 houve redução no tamanho e no número de partículas de HDL, bem como aumento da HDL_{aoxLDL} e HDL_{autox}. A secreção de VCAM-1 após estímulo com TNF- α foi reduzida após co-incubação com HDL de voluntários saudáveis, de doentes com IM no D1 e D30, mas não para a HDL do D5. A oxidação da HDL foi medida pela concentração de TBARS em partículas de HDL isoladas, sendo observado aumento entre D1 e D5, e permanecendo elevado no D30. O aumento no conteúdo de TBARS na HDL foi associado com a atividade de CETP (r=0,72; p=0,014), FMD (r=-0,61; p=0,046) e HDL-C (r=0,83; p=0,004). Em paralelo, elevada atividade de CETP na admissão foi associado a menor FMD, menor biodisponibilidade de NOx e a maior incidência de morte súbita e infarto recorrente após 30 (OR=12,8; p=0,032) e 180 dias (OR=3,3; p=0,044).

Conclusão: O IMCSST induz mudanças na composição química e função do HDL, bem como alterações na atividade enzimática da CETP que paralelamente contribuem para o aumento da oxidação de partículas de HDL, que se traduz em disfunção endotelial.

Palavras-chave: Lipoproteínas HDL; Disfunção endotelial; Infarto do miocárdio; Síndrome de resposta inflamatória sistêmica; Reação de fase aguda; Proteína de transferência de ésteres de colesterol.

ABSTRACT

Introduction: Acute phase response (APR) turns high-density lipoprotein (HDL) into a dysfunctional particle that may favor oxidative/inflammatory stress and endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS) dysfunction. Moreover, modulation of HDL intravascular metabolism by cholesteryl ester transfer protein (CETP) action has also been implicated as a potentially anti-inflammatory and thrombotic mechanism during APR. Although these mechanisms may be involved into endothelial dysfunction that follows acute ST-elevation myocardial infarction (STEMI), these assumptions have never been investigated in humans.

Method: Plasma was obtained in the first 24-hours after STEMI symptoms onset (D1) and after 5 days (D5) in consecutive patients (n=116 to 180), and then used to measure C-reactive protein (CRP), nitrate/nitrite (NO_x) and CETP activity. Lipoproteins were isolated by gradient ultracentrifugation. The oxidizability of low-density lipoprotein incubated with HDL (HDL_{aoxLDL}) and the HDL self-oxidizability (HDL_{autox}) were measured after CuSO₄ co-incubation. Anti-inflammatory activity of HDL was estimated by VCAM-1 secretion by human umbilical vein endothelial cells after incubation with TNF- α . Flow-mediated dilation (FMD) was assessed at the 30th day (D30) after STEMI.

Results: Among patients in the first tertile of admission HDL-Cholesterol (<33mg/dL), the increment of NO_x from D1 to D5 and the FMD adjusted for multiple covariates were higher than in those in the second (33-42mg/dL) or third (>42mg/dL) tertiles, respectively. From D1 to D5, there was a decrease in HDL size and particle number and increase in both HDL_{aoxLDL} and HDL_{autox}. VCAM-1 secretion after TNF- α stimulation was reduced after co-incubation with HDL from healthy volunteers, from MI patients at D1 and D30 but not from D5. Oxidized HDL was measured by TBARS in isolated HDL particles and increased from D1 to D5, and remaining elevated at D30. The change in TBARS content in HDL was associated with CETP activity (r=0.72;p=0.014), FMD (r=-0.61;p=0.046) and HDL-C (r=0.83;p=0.004). High CETP activity at admission was associated lower FMD, lower NO_x bioavailability and with the incidence of sudden death and recurrent MI at 30 days (OR 12.8;p=0.032) and 180 days (OR 3.3;p=0.044).

Conclusion: STEMI induces changes in the chemical composition and function of HDL as well as changes in the enzymatic activity of CETP that in parallel contribute to increased oxidation of HDL particles, and thus inducing endothelial dysfunction.

Keywords: Lipoproteins, HDL; Endothelial dysfunction; Myocardial infarction; Systemic inflammatory response syndrome; Acute-phase reaction; Cholesterol ester transfer proteins.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.1	O HDL e o Risco Residual	2
1.2	HDL EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS AGUDOS E NA FASE AGUDA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO	3
1.3	A HDL COMO MODULADORA DA RESPOSTA OXIDATIVO-INFLAMATÓRIA E FUNÇÃO ENDOTELIAL NO PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO	8
1.3.1	HDL disfuncional e atividade oxidativo-inflamatória no IM	8
1.3.2	HDL disfuncional e função endotelial no IM	9
1.4	A <i>CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN</i> (CETP) NA FASE AGUDA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO	11
1.4.1	O papel da CETP na doença arterial coronária	11
1.4.2	O potencial papel da CETP na fase aguda do IM	13
2	REVISÃO DE ASPECTOS RELEVANTES À TESE	15
2.1	FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DO HDL E SEU PAPEL NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA	15
2.1.1	Transporte Reverso de Colesterol e Remodelamento Intravascular do HDL	15
2.1.2	Ações Antioxidantes do HDL	19
2.1.3	Ações Antiinflamatórias do HDL – da Fisiologia ao Estresse Agudo	21
2.2	METABOLISMO DO ÓXIDO NÍTRICO	22
2.3	REATIVIDADE BRAQUIAL E DILATAÇÃO ARTERIAL MEDIADA PELO ENDOTÉLIO	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	25
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	25
4	MÉTODOS	27
4.1	CASUÍSTICA	27
4.2	COMITÊ DE ÉTICA E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO	29
4.3	DELINEAMENTO DO ESTUDO	29

4.3.1	Análises Bioquímicas.....	30
4.3.2	Medida da atividade da CETP plasmática	31
4.3.3	Isolamento das partículas de HDL e detecção de partículas oxidada de HDL.....	32
4.3.4	Angiografia coronária.....	34
4.3.5	Dilatação fluxo-mediada	34
4.3.6	Ressonância Nuclear Magnética Cardíaca (RNMC)	35
4.3.7	Seguimento ambulatorial.....	35
4.3.8	Desfechos clínicos	35
4.4	CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL	36
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
5	CAPÍTULO 1	39
6	CAPÍTULO 2	47
7	RESULTADOS COMPLEMENTARES E DISCUSSÃO	55
7.1	HDL DISFUNCIONAL E FUNÇÃO ENDOTELIAL NO IMCSST	55
7.2	ATIVIDADE DA CETP E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NO IMCSST	59
8	CONCLUSÕES	65
9	PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A – Parecer Favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Distrito Federal	83
	ANEXO B – Evolução Temporal (em Dias) da Atividade Inflamatória Medida pela Proteína C Reativa após o IMCSST, de Acordo com o Uso de Sinvastatina na Fase Aguda	84
	ANEXO C – Correlação entre a Variação da Auto-Oxidação de HDL Induzida por Sulfato de Cobre entre D1 e D5 vs. dilatação fluxo-mediada medida no D30 após o IMCSST ...	85
	ANEXO D – Histogramas, Gráficos de Dispersão Residual e Testes de Distribuição	86
	ANEXO E – Atividade de CETP no D1, D3, D5 e D30 após o IMCSST	87
	ANEXO F – Atividade de CETP no D1 vs. Delta CETP entre D1 e D5	88
	ANEXO G – Atividade de CETP no D1 vs. Atividade Média de CETP entre D1 E D5 ..	89
	ANEXO H – Conteúdo de TBARS na HDL Isolada vs. Atividade de CETP à Admissão e Dilatação Fluxo-Mediada (FMD)	90
	ANEXO I – Prêmios em Congressos e Editorial no Jornal <i>Atherosclerosis</i>	91

DEDICATÓRIA

A meus pais (Maria e João) e irmãos (João Paulo e Ana Paula), cujos valores me inspiram, minha eterna gratidão

A minha doce Rebeca, a quem devo prazer de ter conviver todos estes anos; a quem pude moldar na mesma intensidade em que fui moldado, como se fôssemos dois vasos de argila justapostos a girar em tornos de olaria.

Dedico a vocês

AGRADECIMENTOS

Por mais que se possa fazer ciência em Fernando de Noronha, Cabo Verde ou até em Timor Leste, conhecimento não se produz numa ilha. Por mais que o solipsismo do cientista e seu distanciamento possa torná-lo alheio ao que se avizinha à sua bancada, ao seu escritório; o pensamento científico não se constrói sem colaboração e sem a solidez do que já está edificado. Ciência é e deve ser feita com olhos nos problemas do presente, mas como um caleidoscópio que une toda a história e todos que a fizeram. Assim, paradigmas científicos somente são quebrados sobre os ombros dos gigantes.

A presente Tese se deve em maior grau aos esforços de um grupo estabelecido inicialmente em Brasília e que, ao longo de 8 anos, soube criar bases sólidas entre o ensino médico e a pesquisa translacional, entre o leito hospitalar e a bancada do laboratório. A Coorte Brasília (depois chamada de *Brasília Heart Study*), não tenho dúvida, moldou grande parte do meu arcabouço de conhecimento e contribuiu sobremaneira para o que sou hoje. Assim, ao se mostrar um verdadeiro berço de cientistas, a Coorte soube se reinventar, manter seu patrimônio, agregar valor, expandir em Campinas e crescer sob a liderança do professor Andrei Sposito, ele que se mostrou muito mais que um orientador, muito mais que um bom amigo, tornou-se um verdadeiro “pai científico” para mim e muitos dos meus colegas (o termo aliás foi cunhado pelo caríssimo Daniel “Sam” Munhoz). Mas, sem dúvida, não se pode deixar de mencionar a contribuição vital de uma série de amigos e colegas, entre os quais o Prof José Carlos Quináglia e Prof Osório Rangel (dois valentes guerreiros), Valéria Nasser Figueiredo, Simone Santos, Wladimir Magalhães, Prof Joalbo Andrade, Prof Maurício Daher, Ana Paula Rezende, Andrea Plácido, Thiago Quináglia, Rodrigo Modolo, Luiz Quáglia, Prof Otávio T Nóbrega, Prof Francisco A R Neves, Prof Otavio Rizzi Coelho, Prof Mário Saad, Prof^a Patrícia Prada, Prof Wilson Nadruz-Jr e Prof^a Eliana Cotta de Faria (a quem agradeço em especial por permitir boa parte dos recursos materiais, técnicos e intelectuais para a realização desta Tese).

Naturalmente, agradeço também aos meus contemporâneos de Coorte, com quem tive a oportunidade de crescer junto e ter discussões riquíssimas e muito inspiradoras: Daniel Munhoz,

Tiago Morato, Augusto Gurgel, Antônio Carlos Macedo, Riobaldo Cintra, Ana Laura Araújo, André Hideo Ono, Audrey Tonet, Lucas Miranda, Elayne Oliveira, Alison Alexandre, Bruno Alvarenga, Uelver Cintra, Natália Panzoldo (a quem agradeço em especial pela paciência na bancada do laboratório), Vitor Wilson, Fernanda Amaral, Eliane Parra, Filipe Vendrame, Vanessa Zago, Carolzinha, Érica, Cidinha, Carminha, Natalie Camargo, Alexandre Anderson, André Japiassú, Luiza Pego, Guilherme de Carvalho, Filipe Moura, Juliana de Pina Araújo, Marco Antônio Freitas, Fernando Souza, Naiara Viúdes, Lauro Bogniotti e Rodrigo Lobo. E aos professores da banca de qualificação: Stephen Hyslop, Heloísa Blotta e Pedro Paulo de Oliveira.

Aos alunos com quem tive o prazer de aprender muito mais do que ensinar: Frank Venâncio, Lara Romero Pereira, Carolina da S Alves, Mário Nóbrega, Foncieli Fontana, Bruno Sakamoto, Nestor Martins, Meyrienne Almeida, Bruna Teles, Carla Borges, Lara Ribeiro, Jéssica Silverio, Breno Faria, Fillipe Frod, Gabriel Salmen, Luciana Trindade, Marcelo Artiaga e Rodrigo Barbosa.

Agradeço a todos os amigos que, de perto ou de longe, me ajudaram a ir levando os últimos anos numa tranquila, numa boa: aos meus sogros A. Sérgio e Lêda; aos amigos de Brasília: Dani (cunhada), Ricardo e Dani, Jéssica e Márcio, Marreta, Aníbal, Piauí, Larissa, Duda, Cissa, Fred, Gustavo, Ana Luísa, Helena, Cecília, Rafa, Ignácio e Yves; a turma do posto: Elaine, Anselmo, Jane, Pedro, Brenda, Adva, Débora, Lidiane, Elzimar, Marlene, Margarida, Aldeni, Lilian, Gil, Rose, Neide, Josi, Ivanete, Silvia, Tiana, Chico, Pablo, Hernando, Elton, Thiago, Cláudia, Marcão, Alana, Nira, Advailson, Andréia, Miriam e Ana Lins; a galera de Campinas: Zeca e Ivan; aos amigos Brasil e mundo afora: Bernardo, Valdenha, Valquíria, Hélio, Aline, Paulo e Débora; to my african buddies: Villyen, Natasha, Katundo, Michael, Marelize, Steven, Miriam, Horacia, Phumla, Toyin, Bathabile, Wynand, Nicholas, Lovejoy, Denise; to my russian pals: Pavel and Sergei; to my argentinean friends: Ines and Dario; to my fellow from Costa Rica: Marianela; to the NGS Core Team members and associates: Colin Pillai, Linda Armstrong, Fareed, Marcelo, Rita, Henri, Isabella. E, sem dúvida, a tantos outros que dividiram alguns de seus pensamentos comigo.

Finalmente, agradeço em especial a cada um dos mais de 600 pacientes que já fizeram e que ainda fazem parte do *Brasília Heart Study*.

“
Tu és meu Brasil em toda parte
Quer na ciência ou na arte
Portentoso e altaneiro
Os homens que escreveram tua história
Conquistaram tuas glórias
Epopéias triunfais
Quero neste pobre enredo
Reviver glorificando os homens teus
Levá-los ao panteon dos grandes imortais
Pois merecem muito mais

Não querendo levá-los ao cume da altura
Cientistas tu tens e tens cultura
E neste rude poema destes pobres vates
Há sábios como Pedro Américo e César Lattes
”

—Cartola

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

American College of Cardiology: ACC

American Heart Association: AHA

Carga de trombo coronário: CTB

Célula endotelial de veia umbilical humana: HUVEC

Dilatação fluxo-mediada: DFM / FMD

Doença arterial coronária: DAC

Fator de necrose tumoral tipo α : TNF- α

Hemoglobina glicosilada: HbA1c

Infarto do miocárdio: IM / MI

Infarto do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST: IMCSST / STEMI

Interleucina: IL

Lipoproteína de alta densidade colesterol: HDL-C

Lipoproteína de baixa densidade colesterol: LDL-C

Molécula de adesão a célula vascular 1: VCAM-1

Nitrito/nitrato: NO_x

Oxidabilidade auto-dirigida da HDL: HDL_{autox}

Oxidabilidade de LDL incubada com HDL: HDL_{aoxLDL}

Óxido nítrico: NO

Proteína C reativa: PCR / CRP

Proteína de transferência de colesterol ester / Cholesteryl ester transfer protein: CETP

Reação de fase aguda: RFA / APR

Ressonância nuclear magnética cardíaca: RNMC / CMRI

Síndromes coronarianas agudas: SCA

Sintase de óxido nítrico endotelial: eNOS

Sociedade Brasileira de Cardiologia: SBC

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico: TBARS

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as mais frequentes causas de óbito não apenas no mundo desenvolvido, mas também no Brasil e noutros países em desenvolvimento (Santos, Timerman et al. 2009). Entre as doenças cardiovasculares figuram as doenças cerebrovasculares e as doenças isquêmicas do coração, que compõem cerca de 21% de todas as causas de óbito no mundo (WHO 2010) e 62% dos óbitos em indivíduos entre 20 e 59 anos de idade no Brasil (DATASUS 2014). Além disso, ao atingir uma população em plena fase produtiva, tais doenças geram custos diretos para o sistema de saúde pública brasileiro da ordem de onze bilhões de reais ao ano, e custos indiretos por perda de produção no trabalho de dezessete bilhões de reais (Azambuja, Foppa et al. 2008). Nesse contexto, o infarto do miocárdio (IM) consiste hoje em uma das mais potentes causas de morbidade e de perda de produtividade na população adulta brasileira (Teich and Araujo 2011).

Embora a incidência de IM esteja em franca ascensão, estudos epidemiológicos têm mostrado, entretanto, uma queda em sua letalidade intra-hospitalar (Piegas, Avezum et al. 2003, Coppieters, Collart et al. 2011). Em 1980, o óbito nos primeiros 30 dias após o IM era verificado em torno de 21-30% dos pacientes. No ano 2008, já se podia verificar uma redução drástica na letalidade, alcançando níveis tão baixos quanto 3 a 12% (Coppieters, Collart et al. 2011). A relevante queda observada na letalidade intra-hospitalar foi conquistada em grande parte por admissões hospitalares mais precoces e pela adoção de práticas como reperfusão com agentes trombolíticos e angioplastia, além do uso de antiplaquetários em pacientes com IM (Coppieters, Collart et al. 2011).

Apesar dos grandes avanços nas estratégias terapêuticas, pacientes com síndromes coronarianas agudas (SCA), em particular aqueles acometidos por IM, permanecem sob elevado risco de eventos cardiovasculares. O risco de morte cardiovascular ou recorrência do evento no primeiro ano após um episódio de síndrome coronariana aguda é de cerca de 8 a 20% (Yusuf, Zhao et al. 2001), ou seja, 20 vezes maior que pacientes de baixo risco e até 3-7 vezes maior que pacientes de alto risco pelos escores de risco tradicionais (Ajani and Ford 2006, Ridker, Genest et al.). Em doentes crônicos, mesmo aqueles que se encontram em uso de estatinas em dose máxima tolerada e com adequado manejo e controle da glicemia, pressão arterial, dieta e sedentarismo, a

redução máxima do risco é de 40 a 50% (Baigent, Blackwell et al. 2010). Dessa forma, o ensaio clínico COURAGE (*Clinical Outcomes Utilizing Revascularization and Aggressive Drug Evaluation*) mostrou que ainda persiste nesses pacientes crônicos um risco residual para IM e óbito próximo a 3% ao ano, mesmo com o melhor tratamento disponível (Boden, O'Rourke et al. 2007).

Em pacientes na fase aguda do IM e nas SCA, o risco residual parece ter impacto ainda mais relevante. Mesmo quando se usa dupla inibição plaquetária, com o uso de ácido acetilsalicílico (AAS) e ticagrelor em pacientes tratados por angioplastia primária (James, Roe et al. 2011), combinada à redução do LDL colesterol pelo uso de estatinas (Waters, Schwartz et al. 2002, Kinlay, Schwartz et al. 2003), o risco de morte e recorrência do IM permanece superior a 8% no primeiro ano. A persistência de elevados índices de mortalidade e recorrência de eventos após o IM sinaliza a existência de outros possíveis fatores que, até o momento, não receberam abordagem adequada para este contexto.

1.1.1 O HDL e o Risco Residual

Nos últimos anos, tem-se procurado alternativas para a redução do risco residual e uma das perspectivas mais promissoras tem se concentrado em investigar o papel dos níveis de HDL colesterol como marcador de risco, bem como em avaliar o potencial do aumento dos níveis de HDL colesterol em pacientes com doença arterial coronária (DAC) (Barter, Gotto et al. 2007, Barter, Caulfield et al. 2007, Schwartz, Olsson et al. 2009, Natarajan, Ray et al. 2010). Há mais de 60 anos surgiram as primeiras documentações em estudos caso-controle de que pacientes com IM apresentavam menores níveis de colesterol HDL que indivíduos saudáveis (Barr, Russ et al. 1951, Miller and Miller 1975, Steinberg 2005). Mas levou diversas décadas para que as propriedades anti-aterogênicas do HDL ganhassem popularidade (Nicholls and Nissen 2005, Steinberg 2005). Na década de 70, o estudo de *Framingham* mostrou que o HDL era a variável bioquímica mais fortemente associada ao risco cardiovascular (Asztalos, Cupples et al. 2004). Posteriormente, diversos estudos clínicos prospectivos, incluindo o *US Physicians Health Study*, o estudo *Prospective Cardiovascular Munster* (PROCAM), e o estudo *Atherosclerosis Risk in*

Communities (ARIC) confirmaram a observação de que baixos níveis de HDL colesterol constituem um fator de risco independente para DAC tanto em diabéticos, como em indivíduos não-diabéticos com e sem história de DAC estável (Maron 2000, Sharrett, Ballantyne et al. 2001, Gotto and Brinton 2004). Além disso, em pacientes com DAC estável em uso de altas doses de estatinas e níveis de colesterol LDL tão baixos quanto 70 mg/dL, os níveis de HDL permaneciam fortes preditores do risco cardiovascular, de acordo com uma subanálise do estudo *Treating to New Targets* (TNT) (Barter, Gotto et al. 2007).

Do ponto de vista epidemiológico, em uma análise ecológica com 137.000 pacientes norte-americanos, foi observada uma tendência de decréscimo dos níveis médios de HDL colesterol de 43 mg/dL em 2000-2001 para 38-39 mg/dL em 2005-2006 (Sachdeva, Cannon et al. 2009). Tal estudo sugere que a presença de baixos níveis de HDL colesterol em pacientes com SCA deve estar se tornando ainda mais comum. De fato, usando como base níveis de HDL adotados como limítrofes pelas diretrizes da SBC (Sociedade Brasileira de, Xavier et al. 2013) e da AHA/ACC (Stone, Robinson et al. 2014) (abaixo de 40 mg/dL para homens e 45 mg/dL para mulheres), aproximadamente metade dos pacientes com SCA apresentam baixos níveis de HDL colesterol (Olsson, Schwartz et al. 2005, Wolfram, Brewer et al. 2006). Estes achados epidemiológicos em paralelo com o forte poder preditivo para doença cardiovascular em indivíduos saudáveis e com DAC estável tornam razoável imaginar que os níveis de HDL possam ser significativos na determinação do risco cardiovascular também em pacientes após SCA.

1.2 HDL EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS AGUDOS E NA FASE AGUDA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO

O HDL desempenha diversas funções desde o transporte de colesterol e redução do estresse oxidativo até a neutralização de toxinas durante processos infecciosos (Barlage, Gnewuch et al. 2009, Grion, Cardoso et al. 2010). A lipoproteína apresenta um elevado potencial em carrear produtos tóxicos, como lípidos oxidados, prostaglandinas (Proudfoot, Barden et al. 2009) e lipopolissacarídeos (LPS) (Barlage, Gnewuch et al. 2009, Grion, Cardoso et al. 2010), representando uma relevante via de defesa contra agressores endógenos e exógenos.

Em modelos animais (Li, Dong et al. 2008) e em humanos (Grion, Cardoso et al. 2010), o HDL se mostrou não apenas um potente agente antiinflamatório, antioxidante e anti-infeccioso, mas também um importante marcador prognóstico [para revisão mais detalhada das ações fisiológicas do HDL, vide **Capítulo 2 – Revisão de Aspectos Relevantes à Tese**]. Em humanos durante a sepse, por exemplo, níveis mais baixos de HDL no início do processo estão associados a maior morbimortalidade em curto e longo prazo (Grion, Cardoso et al. 2010). Em termos mecanísticos, um conjunto de proteínas constituintes do HDL, tais como a apolipoproteína (apo) A-I, apo C-I e apo E, apresentam elevada capacidade imunomoduladora (Barlage, Gnewuch et al. 2009), participando da neutralização de LPS (Li, Dong et al. 2008), da ativação da fagocitose por macrófagos e redução dos níveis de citocinas e fatores pró-inflamatórios (Barlage, Gnewuch et al. 2009). Tal observação é consistente também com outros modelos de estresse inflamatório agudo, como nas SCA e no IM.

Uma relação inversa entre os níveis de HDL colesterol e a recorrência de eventos cardiovasculares após um primeiro episódio de SCA foi sugerida em diversas publicações (Nissen, Tsunoda et al. 2003, Olsson, Schwartz et al. 2005, Barter, Gotto et al. 2007). Em um dos estudos mais populares sobre o assunto, subanálise do estudo clínico *Myocardial Ischaemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering* (MIRACL), pacientes com SCA foram incluídos e tratados com 80mg de atorvastatina ou placebo, sendo avaliada a relação entre os níveis de lipoproteínas plasmáticas e a incidência de morte, IM recorrente e angina instável após 16 semanas. Baixos níveis de HDL colesterol foram fortemente associados aos desfechos clínicos, sendo que o aumento de cada 1 mg/dL de HDL colesterol associou-se a redução de 1,4% no risco relativo (Olsson, Schwartz et al. 2005). Porém, no estudo MIRACL a coleta de sangue foi tardia (em média 75 horas pós-SCA) e os resultados somente se mostraram significativos na análise combinada de desfechos duros (primordiais) e desfechos secundários, limitações que obrigam a consideração cautelosa dessa subanálise.

Por outro lado, um estudo recente com 12.292 pacientes, envolvendo três coortes de pacientes saudáveis e coronariopatas, mostrou que a mortalidade cardiovascular em 10 anos de seguimento não foi diferente entre indivíduos com altos e baixos níveis de HDL colesterol durante os episódios de SCA (Figura 1) (Silbernagel, Schottker et al. 2013). Em indivíduos saudáveis deste mesmo estudo, consistentemente com dados prévios, elevados níveis de HDL colesterol (tercil superior) se associaram a menor mortalidade cardiovascular com risco relativo

de 0,49 (0,34–0,71) na análise univariada e 0,63 (0,43–0,94) na multivariada. Porém, pacientes com DAC estável apresentaram uma atenuação crítica no risco relativo atribuído a baixos níveis de HDL colesterol. Apesar da heterogeneidade moderada destas últimas análises, o risco relativo do tercil superior de HDL colesterol foi de 0,67 (0,56–0,85) na análise univariada e 0,84 (0,67–1,06) na multivariada. Dessa forma, o estudo de Silbernagel et al. sugere que, diferentemente dos pacientes saudáveis, a presença de um contexto inflamatório/oxidativo desencadeado pelo estresse agudo pode reduzir a capacidade preditiva da HDL para desfechos clínicos nas SCA (Silbernagel, Schottker et al. 2013).

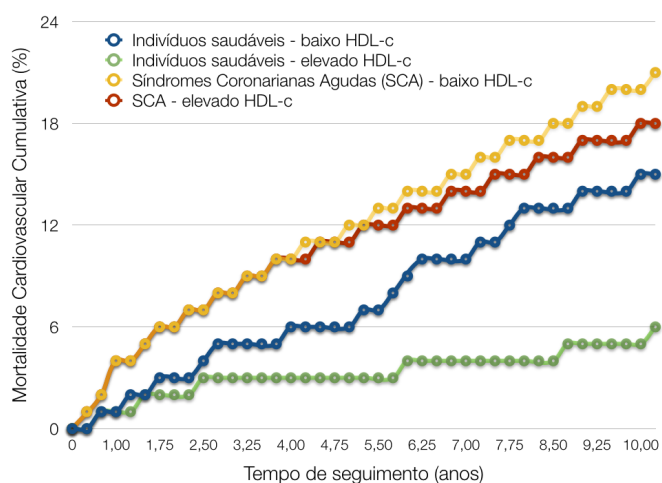


Figura 1. Adaptado a partir de Silbernagel et al. (Silbernagel, Schottker et al. 2013)

De fato, evidências recentes indicam que a associação entre HDL e desfechos clínicos parece depender de certos fatores, como a magnitude da ativação inflamatória no estresse e outros fatores capazes de modificar a estrutura e função da HDL (Van Lenten, Hama et al. 1995, Ansell, Navab et al. 2003, Corsetti, Ryan et al. 2010). Em pacientes com IM recente do estudo THROMBO, o grupo de pacientes com HDL colesterol e proteína C reativa (PCR) elevados foi o de maior risco para recorrência de morte cardiovascular, IM e angina instável com hospitalização após 26 meses de seguimento (Figura 2) (Corsetti, Ryan et al. 2010). Enquanto isso, o grupo com HDL colesterol mais baixo e baixa atividade inflamatória apresentaram o menor risco de recorrência de eventos cardiovasculares, sugerindo que o poder preditivo do HDL colesterol para desfechos clínicos depende diretamente do nível atividade inflamatória plasmática.

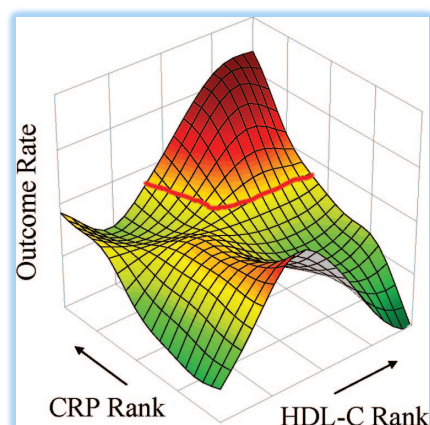


Figura 2. Extraído de Corsetti et al (Corsetti, Ryan et al. 2010).

Durante a resposta ao estresse agudo, a composição química e a funcionalidade das partículas de HDL se modificam intensamente. O estresse agudo leva ao aumento na HDL de proteínas pró-inflamatórias como amiloide A sérico (SAA), ceruloplasmina e frações do complemento (Van Lenten, Hama et al. 1995, Vaisar, Pennathur et al. 2007), e à redução de proteínas antiinflamatórias, como a paraoxonase 1 (PON-1) (Davidson, Silva et al. 2009). Ao mesmo tempo, o estresse inflamatório agudo promove indução da lipase endotelial e de fosfolipases do grupo II, e suprime a atividade da *lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT), gerando redução no conteúdo de colesteryl ester da HDL, bem como seu enriquecimento em colesterol livre, triglicérides e ácidos graxos livres (Khovidhunkit, Kim et al. 2004, Jahangiri, de Beer et al. 2009). Além disso, parece haver ainda aumento na relação esfingomiéline / fosfatidilcolina e na razão entre ácidos graxos saturados / poliinsaturados (SFA/PUFA). Tais modificações tornam a superfície lipídica da HDL mais rígida, o que compromete sua capacidade aceptora e redutora de hidroperóxidos e reduz seu potencial de hidrólise de fosfolípidos oxidados (Kontush and Chapman 2010).

Em termos funcionais, diversas enzimas componentes da HDL sofrem influências negativas do estresse agudo e as propriedades protetoras da HDL são inibidas (Van Lenten, Hama et al. 1995, Kontush, Chantepie et al. 2003, Davidson, Silva et al. 2009). Recentemente, foi demonstrado que as enzimas PON-1 e mieloperoxidase (MPO) formam um complexo terciário com apoA-I da HDL, onde PON-1 atua inibindo a ação da MPO ao passo que a MPO é capaz de oxidar e reduzir a atividade de PON-1 e apoA-I, de forma que o predomínio antioxidante ou pró-oxidante do complexo é determinado pelas condições inflamatórias do meio (Huang, Wu et al.

2013). Além disso, a redução na função de PON-1 relacionada ao estresse agudo torna a partícula de HDL capaz de ativar o receptor LOX-1 (*lectin-like oxidized LDL receptor 1*) no endotélio, o que promove a sinalização inibitória sobre expressão e função da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) bem como redução na produção de óxido nítrico (Besler, Heinrich et al. 2011). Entretanto, o impacto deste mecanismo sobre a função endotelial *in vivo* jamais foi testado.

Em paralelo, o aumento de citocinas inflamatórias decorrente do estresse agudo provoca não apenas inibição da síntese hepática de apoA-I, mas também redução de sua atividade e aumento de seu catabolismo (Khovidhunkit, Kim et al. 2004, Jahangiri, de Beer et al. 2009, Natarajan, Ray et al. 2010). As moléculas de apoA-I são altamente suscetíveis a modificações oxidativas e glicosilação, fatores que são acentuados durante o estresse agudo e que inibem a atividade de apoA-I (Zheng, Nukuna et al. 2004, Undurti, Huang et al. 2009). Tais alterações comprometem o transporte reverso de colesterol e a captação hepática do colesterol via *scavenger receptor-BI* (Artl, Marsche et al. 2000), bem como podem potencialmente intermediar a perda da capacidade antioxidante da HDL durante o estresse agudo (Cho, Shin et al. 2009, Patel, Khera et al. 2011).

Ao lado desses mecanismos indutores de disfunção da HDL durante o estresse, distintos processos relacionados ao seu remodelamento e metabolismo intravascular também podem potencialmente ocorrer na fase aguda do IM. Enzimas como a *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) contribuem para um aumento do conteúdo de triglicérides, bem como para a redução de colesteryl ester e aumento do catabolismo de apoA-I (Barter, Brewer et al. 2003, Brousseau, Diffenderfer et al. 2005). Embora o impacto de tais efeitos não tenha sido efetivamente estudado no contexto do IM, em pacientes com doença arterial coronária crônica a ação da CETP contribui em grande parte para o aumento na transferência de lípidos oxidados (Ohmura, Watanabe et al. 1999, Matsunaga, Hokari et al. 2003) e para a inibição do transporte reverso de colesterol pela HDL e de sua atividade antioxidante (Barter, Brewer et al. 2003). Além disso, a atividade de CETP foi associada à ativação dos fatores de coagulação VII e XI (Deguchi, Fernandez et al. 2007), bem como a disfunção endotelial (Gomaraschi, Ossoli et al. 2014). Neste contexto, o papel da CETP na fase aguda do IM pode ser clinicamente significativo, uma vez que sua atividade parece se relacionar não apenas ao remodelamento da HDL, mas também a outras vias associadas a pior prognóstico no IM. Entretanto, esta hipótese nunca foi testada e até o presente não está claro se a atividade da CETP desempenha algum papel na fase aguda do IM.

Tampouco está claro se as mudanças funcionais da HDL no estresse agudo teriam algum impacto mensurável em termos de função endotelial em humanos. Tais questões foram levantadas para o delineamento dos objetivos da presente Tese, mas antes de introduzi-los será apresentada uma breve revisão sobre as funções da HDL com foco em seu papel na doença arterial coronariana aguda e crônica.

1.3 A HDL COMO MODULADORA DA RESPOSTA OXIDATIVO-INFLAMATÓRIA E FUNÇÃO ENDOTELIAL NO PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO

1.3.1 HDL disfuncional e atividade oxidativo-inflamatória no IM

O estresse oxidativo constitui elemento central na formação e deposição de partículas oxidadas da lipoproteína de baixa densidade (LDLox) na íntima arterial e contribui para a perpetuação da resposta inflamatória na placa aterosclerótica (Stocker and Keaney 2004) em um ciclo vicioso pró-aterogênico. Do ponto de vista molecular, a expressão de fatores pró-inflamatórios e quimiotáticos como o *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *monocyte colony stimulating factor* (mCSF) e o *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) dependem ao menos parcialmente de fatores de transcrição regulados pelo estresse oxidativo em células endoteliais (Alexander 1995). Portanto, existe uma relação de interdependência entre a resposta inflamatória e o estresse oxidativo.

Após o infarto agudo do miocárdio, a atividade inflamatória eleva-se progressivamente como resultante da lesão por isquemia e reperfusão miocárdica. O pico da atividade inflamatória correlaciona-se temporalmente com a incidência de complicações, como a extensão e expansão da área infartada, que promove precocemente disfunção sistólica e arritmias, bem como tardiamente leva à formação de aneurisma ventricular esquerdo e rotura cardíaca (Frangogiannis, Smith et al. 2002, Nian, Lee et al. 2004). Além disso, a exacerbação da liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de reduzir o inotropismo cardíaco, favorece a fibrose

intersticial e deposição de colágeno no miocárdio não-infartado, exacerbando a disfunção ventricular (Nian, Lee et al. 2004).

Ao mesmo tempo, elevados níveis de radicais hidroxil são produzidos logo após a reperfusão da artéria culpada, como consequência da lesão por isquemia-reperfusão (Delanty, Reilly et al. 1997). O estresse oxidativo no pós-infarto contribui direta e indiretamente para resistência à insulina, disfunção endotelial e resposta inflamatória (Arstall, Yang et al. 1995, De Mattia, Bravi et al. 1998, Sochman 2002, Yesilbursa, Serdar et al. 2006), de forma a amplificar o estresse oxidativo por retroalimentação. Por outro lado, o tamponamento do estresse oxidativo plasmático e celular pode estar potencialmente comprometido.

A HDL, a principal via de atenuação do estresse oxidativo e da atividade inflamatória, encontra-se disfuncional tanto na doença coronariana crônica como em pacientes com SCA (Besler, Heinrich et al. 2011, Patel, Khera et al. 2011). Entretanto, ainda é incerto o impacto clínico dessa HDL disfuncional no contexto do IM. Não há ainda dados que tenham demonstrado a relação entre as mudanças morfológicas ou funcionais da HDL no pós-IM e desfechos clínicos, sejam eles duros ou substitutos. Além disso, não está claro se o conteúdo de radicais oxidados na HDL pode fazer parte desta relação potencial entre HDL e o desfecho clínico.

1.3.2 HDL disfuncional e função endotelial no IM

Apesar dos avanços no estudo da relação entre HDL e disfunção endotelial em doenças crônicas, apenas mais recentemente foi observado que a HDL se torna incapaz de promover vasodilatação também durante o estresse agudo. Besler e colaboradores observaram que a HDL de pacientes nas primeiras 24 horas após SCA é incapaz de estimular a produção de óxido nítrico bem como de ativar a eNOS (Besler, Heinrich et al. 2011). Os mecanismos causais deste fenômeno parecem estar relacionados à redução da atividade da PON1 associada à partícula de HDL. Enquanto a HDL de indivíduos saudáveis contém PON1 que efetivamente inibe a produção de lipídes e lipoproteínas oxidados como o malondialdeído (MDA), a HDL de pacientes pós-SCA exibe reduzida atividade de PON1, que leva ao acúmulo de MDA e ativação

da cascata da *lectin-type oxidized LDL receptor 1* (LOX-1) e da via da proteína quinase C β II (PKC β II) em células endoteliais. O estímulo da PKC β II tanto inibe a ação da Akt sobre a fosforilação (ativadora) em serina 1177 da eNOS, como também promove fosforilação (inativadora) direta da eNOS em treonina 495. Dessa forma, a HDL de pacientes em fases precoces das SCA reduz a produção de óxido nítrico pelo endotélio, um determinante central da adesão leucocitária e reparo endotelial. Em paralelo, a inibição de tais mecanismos endoteliais pela HDL parece depender de uma determinada magnitude de resposta inflamatória que é encontrada apenas em parte dos pacientes com SCA, particularmente naqueles com acentuado incremento de proteína C reativa (quartil superior) após o infarto do miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST (IMCSST) (Gomaraschi, Ossoli et al. 2013).

As ações da HDL de indivíduos saudáveis sobre o endotélio vascular também envolvem a inibição de vias pró-apoptóticas e o estímulo de vias anti-apoptóticas. Em pacientes após SCA, a HDL não foi capaz de inibir a apoptose endotelial, ao apresentar menor potencial em ativar a via da Bcl-xL, e passando a estimular, na verdade, vias pró-apoptóticas como a via de indução das caspases pela proteína tBid, mediada pela p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Riwanto, Rohrer et al. 2013). Estudos *in vitro* também demonstraram que a enzima MPO catalisa modificações oxidativas na HDL que a tornam capaz de ativar a via do NF- κ B e a expressão endotelial de VCAM-1 (Zheng, Nukuna et al. 2004). Além disso, outros processos como glicosilação e carbamilação da HDL ocorrem no diabetes e na doença aterosclerótica *in vivo* (Wang, Nicholls et al. 2007, Undurti, Huang et al. 2009, Nobecourt, Tabet et al. 2010). A HDL glicosilada e/ou carbamilada perde a capacidade de inibir a adesão leucocitária ao endotélio mediada pela LDL oxidada, assim como podem induzir maior expressão de moléculas de adesão como VCAM-1 e ICAM-1 pelo endotélio (Hedrick, Thorpe et al. 2000, Wang, Nicholls et al. 2007, Undurti, Huang et al. 2009)

Recentemente, a HDL foi também descrita como carreadora de micro RNAs (miRNAs) entre distintos tecidos. Os miRNAs são pequenos fragmentos de RNA não codante com função reguladora e sinalizadora, tendo sido descrito efeito de miRNAs como o 92a, 146a, 216a e 217a sobre a expressão gênica no endotélio vascular e controle de funções como angiogênese, regeneração tecidual, envelhecimento celular e produção de óxido nítrico (Bonauer, Carmona et al. 2009, Menghini, Casagrande et al. 2014). Embora ainda inexistassem evidências de que miRNAs carreados pela HDL possam induzir disfunção endotelial, foi demonstrado em

humanos com hipercolesterolemia familiar (HF) que a biblioteca de miRNAs na HDL desses pacientes difere extensamente da HDL de pacientes saudáveis (Vickers, Palmisano et al. 2011). Além disso, a HDL é capaz de transferir miRNAs ativamente para hepatócitos via receptor SR-B1, induzindo modificação na expressão gênica. A incubação do HDL de pacientes com HF com hepatócitos modifica a expressão gênica celular de forma distinta do HDL de indivíduos saudáveis. Entretanto, ainda não há evidências claras de que a HDL tenha um papel direto na disfunção endotelial por meio da transferência de miRNAs.

Dessa forma, apesar do avanço na compreensão molecular da interação entre HDL e disfunção endotelial durante o estresse agudo nos últimos anos, não há evidências da relevância clínica de tais achados. A proposta deste estudo se concentra em avaliar em humanos a relação entre os níveis e função de HDL e marcadores de disfunção endotelial após o *burst* inflamatório relacionado ao IMCSST.

1.4 A *CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN* (CETP) NA FASE AGUDA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO

1.4.1 O papel da CETP na doença arterial coronária

A CETP representa uma enzima central no remodelamento do HDL, participando da transferência de ésteres de colesterol do HDL para lipoproteínas que contêm apoB, como LDL e VLDL, em troca de triglicérides. Consequentemente, o HDL enriquecido por triglicérides após a ação da CETP encontra-se mais suscetível a hidrólise pela lipase hepática, que promove então redução do conteúdo lipídico, do peso e da área de superfície da partícula de HDL (Cazita, Barbeiro et al. 2008). Por este mecanismo, à medida que se aumenta a atividade da CETP, ocorre redução gradual do tamanho do HDL e aumento do catabolismo de apoA-I (Brinton, Eisenberg et al. 1994), ao passo que a inibição da CETP reduz o catabolismo de apoA-I (Brousseau, Diffenderfer et al. 2005).

De forma concordante, estudos em modelos animais e em humanos têm sugerido que a inibição da CETP reduz o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose (Schwartz, Olsson et al. 2009) e a deficiência ou a inibição farmacológica da CETP consistentemente aumentam os níveis de HDL-c e aumentam o efluxo de colesterol de macrófagos (Matsuura, Wang et al. 2006, Yvan-Charvet, Matsuura et al. 2007). Por outro lado, insucessos nos ensaios clínicos com dois inibidores de CETP (torcetrapib e dalcetrapib) têm gerado questionamentos sobre o papel causal da CETP e mesmo da HDL na doença aterosclerótica. O estudo ILLUMINATE foi interrompido precocemente devido a aumento substancial na mortalidade cardiovascular nos pacientes em uso de torcetrapib comparado com placebo (Barter, Gotto et al. 2007). Já no estudo ILLUSTRATE, o torcetrapib não aumentou a mortalidade, mas mostrou não reduzir a progressão da aterosclerose (Nissen, Tardif et al. 2007), exceto no subgrupo de pacientes que apresentou níveis mais elevados de HDL, segundo uma análise posthoc (Nicholls, Tuzcu et al. 2008). Além disso, em ambos os estudos houve aumento da pressão arterial e do sódio sérico e redução do potássio nos pacientes em uso de torcetrapib, compatível com ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Nicholls, Tuzcu et al. 2008).

Nos estudos dal-VESSEL e dal-OUTCOMES com o inibidor de CETP dalcetrapib, apesar do aumento de 30-40% no HDL-c em comparação com o grupo placebo, não houve mudança na evolução do volume de placa carotídea em pacientes com DAC manifesta, tampouco houve redução na incidência de eventos cardiovasculares (Luscher, Taddei et al. 2012, Schwartz, Olsson et al. 2012). Potencialmente, tais estudos contribuem para uma quebra de paradigma sobre a relação causal entre elevação do HDL-c e doença aterosclerótica. Com a elevação atingida dos níveis de HDL-c a expectativa era da redução de 12-15% na incidência de eventos cardiovasculares. Por um lado, o aumento de ‘apenas’ 30-40% nos níveis de HDL-c pode ter sido insuficiente, e o uso de inibidores de CETP mais potentes como anacetrapib e evacetrapib, capazes de elevar em até 100% os níveis de HDL-c poderão atingir resultados mais convincentes (Nicholls, Brewer et al. 2011). Por outro lado, os estudos com dalcetrapib se iniciaram numa fase tardia da doença (4 a 12 semanas após o IM), o que pode representar uma fase onde o impacto do níveis e função do HDL seja apenas marginal. Nesse sentido, é possível que a inibição mais precoce da CETP no pós-IM tenha efeito clinicamente observável.

Num contexto distinto, mas ainda relacionado à resposta de fase aguda, a CETP parece também desempenhar papel protetor durante a sepse em humanos e em modelos animais.

A CETP apresenta elevado grau de homologia estrutural com a *lipopolysaccharide (LPS) binding protein (LBP)*, a mais importante proteína neutralizadora de toxinas bacterianas e um componente da resposta imune inata (Grion, Cardoso et al. 2010). Cazita e colaboradores fizeram a primeira descrição da CETP como um mecanismo de defesa contra a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios em camundongos (Cazita, Barbeiro et al. 2008). A CETP pode se ligar diretamente ao LPS, ou pode mediar a ligação entre LPS e HDL ou LDL (Cazita, Barbeiro et al. 2008). Em concordância, os resultados recentes de Grion e colaboradores sugeriram que baixos níveis de HDL e redução na atividade de CETP determinam risco aumentado para sepse grave e morte em pacientes hospitalizados (Grion, Cardoso et al. 2010). Dessa forma, a CETP pode também exercer papel antiinflamatório. Porém, inexistem evidências de que tal efeito teria alguma relevância no contexto do infarto do miocárdio.

1.4.2 O potencial papel da CETP na fase aguda do IM

Durante o infarto do miocárdio fase aguda (MI), a resposta oxidativo-inflamatória representa um forte determinante de complicações elétricas e mecânicas, bem como de mortalidade em curto e longo prazo (Frangogiannis, Smith et al. 2002). Com isso, é plausível considerar que a relação entre a atividade da CETP e atenuação da resposta inflamatória em modelos de sepse possa ter também algum impacto clinicamente relevante no IM. Em pacientes com angina instável bem como após cirurgia cardíaca e em modelos animais de ligadura coronária, de fato, ocorre redução na expressão leucocitária de CETP horas após o eventos precipitante e parece haver uma relação inversa entre o decréscimo da atividade de CETP e a magnitude da resposta inflamatória sistêmica (Ye, Kraaijeveld et al. 2008, Jahangiri, de Beer et al. 2009). Porém, não está claro se a mudança na atividade da CETP determina a exacerbação da inflamação ou se a flutuação dessa atividade representaria apenas mais um marcador da resposta de fase aguda. Além disso, não há dados disponíveis para verificar essas hipóteses no contexto da fase aguda do infarto do miocárdio.

Dados recentes também revelam uma associação positiva entre a atividade da CETP no plasma e ativação de fatores de coagulação VII e XI (Deguchi, Fernandez et al. 2007); ambos

diretamente implicados na incidência e recorrência de MI (Minnema, Peters et al. 2000, Campo, Valgimigli et al. 2006). Em paralelo, recentemente foi descrita uma associação entre a deficiência genética de CETP em humanos e disfunção endotelial, medida pela menor capacidade da HDL isolada desses pacientes em ativar/fosforilar a eNOS e aumentar a produção de óxido por células endoteliais *in vitro* (Gomaschi, Ossoli et al. 2014). Assim, embora a interação entre CETP e o desfecho após o IM seja plausível, não fica claro se a sua participação teria um impacto positivo ou negativo. Por isso, avaliamos prospectivamente a associação entre a atividade da CETP e desfecho cardiovascular em pacientes com IMCSST. Além disso, exploramos potenciais associações entre a atividade da CETP e função endotelial, tamanho da massa infartada, carga de trombo coronário e resposta oxidativo-inflamatória.

2 REVISÃO DE ASPECTOS RELEVANTES À TESE

2.1 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DO HDL E SEU PAPEL NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

O HDL apresenta ações bem descritas sobre diversos mecanismos protetores contra a aterosclerose. Entre exemplos clássicos encontramos o transporte reverso de colesterol (Rader 2006); a redução da oxidação do LDL (Kontush and Chapman 2010); o carreamento de marcadores do estresse oxidativo, como a prostaglandina 8-iso-PGF2 α (isoprostana-F2 α) (Proudfoot, Barden et al. 2009); efeito antiinflamatório (Natarajan, Ray et al. 2010); vasodilatação (Sorrentino, Besler et al. 2010); e atividade anti-infecciosa (Grion, Cardoso et al. 2010). Tais mecanismos dependem de uma rede intrincada de interações entre proteínas e lipídios que compõem o HDL e fazem parte do processo fisiológico de remodelamento da lipoproteína desde seu nascimento até seu catabolismo. Estes processos e funções do HDL serão detalhados a seguir.

2.1.1 Transporte Reverso de Colesterol e Remodelamento Intravascular do HDL

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são uma família de partículas heterogêneas que variam de tamanho, densidade e composição química. Tal diversidade é resultado de sua síntese e catabolismo, assim como do remodelamento intravascular contínuo pela ação de enzimas e de proteínas de transporte (Lewis and Rader 2005, Navab, Reddy et al. 2009). A função principal da HDL parece ser a remoção do excesso de colesterol livre da periferia, a condução ao fígado e excreção pela bile, o que é conhecido como transporte reverso de colesterol (Lewis and Rader 2005, Khera, Cuchel et al. 2011). O transporte reverso representa um dos eixos centrais para a redução do conteúdo de colesterol de macrófagos e placas ateroscleróticas (Rader

2006). Recentemente, em estudo de Khera et al, a capacidade de efluxo de colesterol por macrófagos apresentou uma forte associação inversa com a espessura médio-intimal da carótida e o risco de doença coronariana, de maneira independente dos níveis plasmáticos de HDL colesterol (Khera, Cuchel et al. 2011).

As partículas de HDL são originadas no fígado e no intestino a partir de um complexo fosfolípido-apolipoproteína conhecido como HDL-nascente. A apolipoproteína A-I (apoA-I) constitui 70% da estrutura do HDL e representa sua principal proteína (Kontush, Chantepie et al. 2003). Enquanto virtualmente todas as partículas de HDL contêm apoA-I, apenas algumas apresentam apoA-II que, quando presente perfaz cerca de 20% do conteúdo protéico da lipoproteína.

Adiante, para se tornar uma partícula madura, o HDL necessitará passar por processos de aquisição extracelular de lipídios, em sua maioria ésteres de colesterol, fosfolípidos e esfingomielina, o que favorece a associação de complexos enzimáticos na estrutura do HDL (Kontush and Chapman 2010). A aquisição seqüencial de lipídios e outros componentes não ocorrem em um único sentido e esse fato determinará a coexistência de partículas de HDL com composições, densidades e tamanhos variados: HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b e HDL3c (Blanche, Gong et al. 1981, Williams, Krauss et al. 1992).

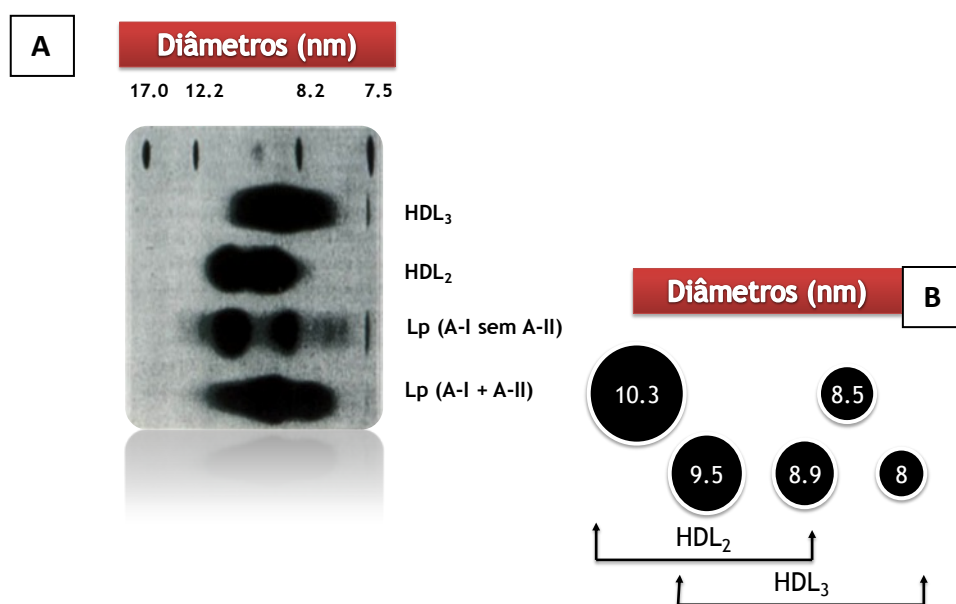


Figura 3. Fenótipos de HDL

A. Caracterização do HDL humano por eletroforese em gel de gradiente; B. Desenho esquemático que representa a heterogeneidade morfológica das partículas de HDL.
Adaptado a partir de: Blanche, P. J. et al. *Biochim Biophys Acta*, v. 665, n.3, Sep 24, p. 408-19. 1981.

Desde que é secretado na corrente sanguínea, o HDL-nascente capta colesterol livre após a ligação entre apoA-I e o receptor *ATP Binding Cassette-A1* (ABC-A1) de células periféricas, permitindo o transporte reverso de colesterol. Este mecanismo permite o retorno ao fígado de excessos de colesterol presentes nas células, incluindo células do endotélio vascular e macrófagos, o que potencialmente afeta a aterogênese. Na verdade, a superexpressão de apoA-I em ratos aumenta os níveis de HDL e promove regressão da aterosclerose (Rubin, Krauss et al. 1991, Tangirala, Tsukamoto et al. 1999, Rader 2006).

Ao mesmo tempo, as partículas de HDL também são enriquecidas com fosfolípidos derivados de outras lipoproteínas, em especial VLDL, por ação da *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP) (Nunes, Quintao et al. 2001, Quintao and Cazita 2009). O aumento do conteúdo de fosfolípidos, e conseqüentemente da relação fosfolípido/esfingomielina, torna a superfície mais fluida e menos rígida (Kontush and Chapman 2010), permitindo um aumento na eficiência do transporte reverso de colesterol (Nunes, Quintao et al. 2001).

O desenvolvimento do HDL maduro depende não apenas da aquisição de colesterol, mas também de sua esterificação e da formação de partículas de HDL com um núcleo lipídico e hidrofílico (Asztalos, Schaefer et al. 2007). Nesse ponto uma das enzimas associadas ao HDL, a lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) catalisa a transferência de ácidos graxos dos fosfolípidos para o colesterol, esterificando-o e promovendo a formação de partículas de HDL ricas em ésteres de colesterol (EC) (Navab, Reddy et al. 2009). A formação dos complexos HDL-EC é um ponto crítico no metabolismo do HDL. A deficiência de LCAT em humanos reduz intensamente os níveis de HDL colesterol e leva a um rápido catabolismo de apoA-I (Asztalos, Schaefer et al. 2007). A ação da LCAT transformará a isoforma HDL3, uma partícula pequena, densa e pobre em ésteres de colesterol, em HDL2, uma isoforma madura, de maior tamanho, com alto conteúdo de ésteres de colesterol (Kontush and Chapman 2006).

O ciclo reverso de colesterol pode se completar quando as partículas de HDL2 são captadas pelos receptores hepáticos *Scavenger Receptor-B1* (SR-B1), que removem seu conteúdo de colesterol e iniciando o processo de excreção dos ésteres de colesterol pela bile (Rader 2006). Por outro lado, os ésteres de colesterol podem também ser transferidos para outras lipoproteínas pela ação da *Cholesteryl Ester Transfer Protein* (CETP). Por ação dessa enzima, o colesterol da

HDL é trocado por triglicerídeos (TG) de lipoproteínas que contêm a apolipoproteína B (apoB), como LDL e VLDL (Lewis and Rader 2005, Rader 2006). Esse processo reduz o conteúdo de colesterol e a área de superfície das HDL e induz ao aumento no catabolismo de apoA-I (Lewis and Rader 2005, Rader 2006). Tanto quanto 70% da variabilidade no catabolismo de apoA-I pode ser atribuído à modificações no tamanho das partículas de HDL durante seu remodelamento intravascular (Brinton, Eisenberg et al. 1994). De maneira consistente, a inibição da CETP aumenta tanto o tamanho das partículas de HDL como reduz o catabolismo de apoA-I (Brousseau, Diffenderfer et al. 2005).

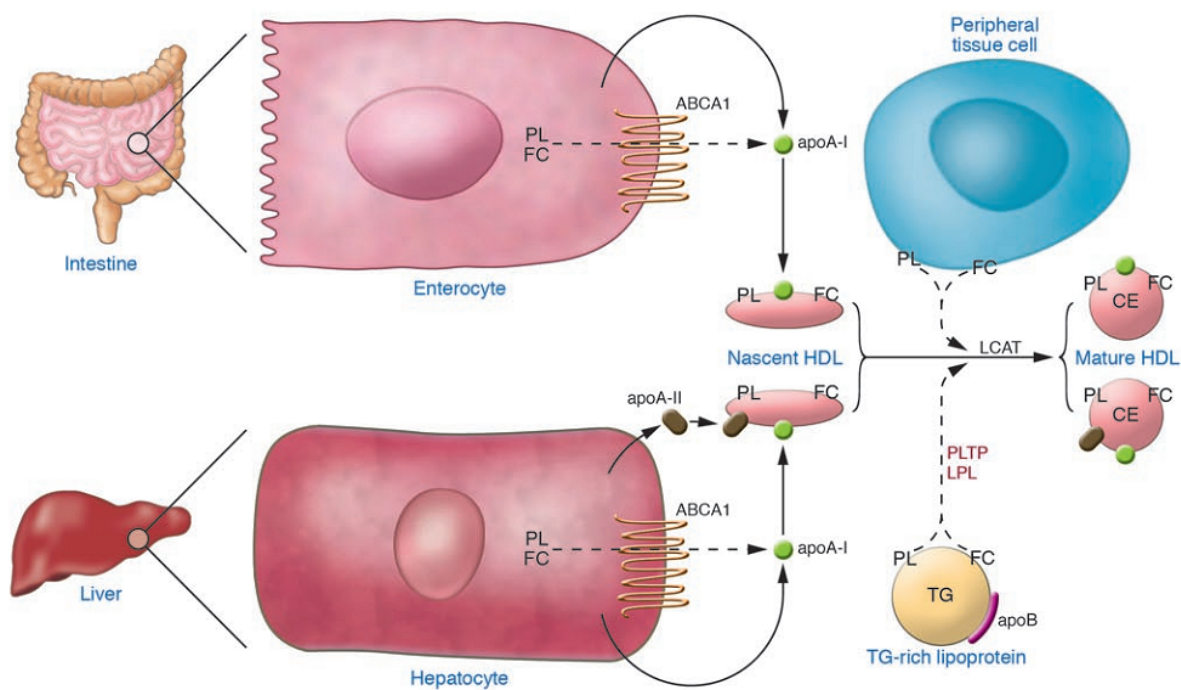


Figura 4. Biossíntese do HDL

Enterócitos e hepatócitos sintetizam apoA-I, que é secretado como partícula pobre em lipídeos e imediatamente recruta fosfolípidos (PL) e colesterol livre (FC) via ABCA1, formando o HDL nascente. O HDL nascente adquire mais lipídeos a partir de tecidos periféricos e de outras lipoproteínas. A LCAT esterifica o colesterol livre, formando o HDL maduro. O fígado também produz apoA-II, que resulta em uma subclasse de HDL contendo tanto apoA-I como apoA-II.

Extraído de: Rader. *J Clin Invest*, v. 116, n.12, Dec, p. 3090-3100. 2006.

Mas a indução do catabolismo de apoA-I não depende apenas da ação da CETP. Um dos mecanismos principais para a transformação de HDL2 novamente em HDL3, mas também para a indução da degradação de apoA-I consiste da ação da lipase hepática (LH) (Lewis and

Rader 2005). A LH se concentra nos sinusóides hepáticos e tem a habilidade de hidrolisar fosfolípidos e triglicérides do HDL, reduzindo o tamanho da partícula e tornando-a mais densa (Cazita, Barbeiro et al. 2008). A ação da LH é fortemente dependente do enriquecimento prévio do HDL com triglicérides, o que é comum em estados de hipertrigliceridemia e resistência à insulina (Rader 2006).

2.1.2 Ações Antioxidantes do HDL

A HDL contribui significativamente para a redução das modificações oxidativas da LDL, que são consideradas o principal evento de iniciação da aterosclerose (Chisolm and Steinberg 2000). A HDL pode inibir a oxidação da LDL quando causada por íons de metais de transição e prevenir a formação de hidroperóxidos lipídicos (Kontush, Chantepie et al. 2003). Ao mesmo tempo, a HDL também permite o transporte de alguns produtos de oxidação da LDL como lisofosfatidilcolina, hidroperóxidos lipídicos (Huang, Huang et al. 1998) e 8-isoprostana (Proudfoot, Barden et al. 2009). De um ponto de vista fisiológico, a capacidade do HDL de transportar produtos do estresse oxidativo contribui para uma eficiente eliminação de lipídios oxidados da circulação pelo fígado (Kontush and Chapman 2010).

Os mecanismos clássicos de inibição da oxidação do LDL pela HDL podem ser atribuídos a três fatores: i) ao seu conteúdo de antioxidante (α -tocoferol, licopeno, estrógenos); ii) às propriedades antioxidantes da apoA-I e apoA-II; iii) à presença de paraoxonase-1 (PON-1), uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos carboxílicos aromáticos e compostos organofosforados (Mackness, Arrol et al. 1993, Durrington, Mackness et al. 2001) e, em especial, a quebra de fosfolípidos oxidados do LDL. Ao se relacionar de maneira tão eficiente com a atenuação da produção de radicais livres e da (per)oxidação lipídica em indivíduos saudáveis, o HDL compõe um potencial redutor do risco cardiovascular também via mecanismos antioxidantes.

O HDL e a modulação do estresse oxidativo. O LDL oxidado (LDLox) acumula-se na íntima arterial, gerando localmente um estado pró-inflamatório e pró-aterogênico. O LDLox contém diversos produtos para peroxidação lipídica induzida por radicais livres, incluindo

hidroperóxidos lipídicos (LOOH) como produtos primários e, secundariamente, fosfolipídios de cadeia curta oxidados (PLOx) – derivados de LOOH – e esteróis oxidados.

A proteção das partículas de LDL contra a oxidação representa um papel central do HDL. Uma ampla variedade de complexos enzimáticos foi apontada como responsável pela atividade antioxidante do HDL, entre as quais se destacam apoA-I, PON-1, LCAT e *platelet-activating factor acetylhydrolase* (PAF-AH). Entretanto, estudos recentes apontam que apenas apoA-I seria hábil em reduzir os componentes primários do LDLox, os LOOH. Enquanto apoA-I é capaz de atenuar a oxidação do LDL via conversão de LOOH em hidróxidos lipídicos sem atividade redox, PON-1, LCAT e PAF-AH atuam apenas sobre PLOx (Draganov, Teiber et al. 2005). Especula-se que apoA-I seria o único complexo enzimático capaz de reduzir LOOH *in vivo* (Kontush and Chapman 2010), porém, ainda há poucos dados para esta conclusão. Na verdade, não está esclarecido se antioxidantes de baixo peso molecular como a glutathione peroxidase, um potente redutor de LOOH *in vivo* (Mashima, Yamamoto et al. 1998), também seriam capazes de atuar sobre as vias do estresse oxidativo, reduzindo a oxidação de LDL e os níveis de LOOH.

Métodos de avaliação do grau de oxidação da HDL. Ao mesmo tempo em que a HDL é capaz de reduzir a oxidação da LDL, os radicais oxidados são transferidos ao *core* da HDL. Tais modificações após um certo limiar podem reduzir a função antioxidante da HDL (Huang, Huang et al. 1998, Ohmura, Watanabe et al. 1999). Desta forma, o grau de oxidação de componentes da HDL e a carga de espécies reativas de oxigênio pode implicar diretamente em prejuízo funcional (Hedrick, Thorpe et al. 2000, Undurti, Huang et al. 2009). Danos oxidativos a lipídios e proteínas são boas estratégias para avaliar indiretamente a produção espécies reativas de oxigênio, uma vez que tais biomoléculas podem ser facilmente afetadas por radicais livres. Diversos métodos já foram descritos para medir a carga de produtos oxidados na HDL, entre os quais a medida da 8-isoprostana e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A presença de 8-isoprostana é mais específica para radicais oxidados, sendo parte da família dos eicosanoides (prostaglandinas) e representa o produto da oxidação não-enzimática de fosfolipídeos por espécies reativas de oxigênio. A 8-isoprostana também apresenta atividade biológica, havendo sido descrito como vasoconstrictor renal e pulmonar (Morrow, Frei et al. 1995). Enquanto isso, os TBARS reagem com um grupo mais amplo e heterogêneo de radicais, todos eles contendo grupos tiol ou carbonila. Diversos aldeídos derivados de lipídeos, como o

malondialdeído e outros lipídeos comuns na composição da HDL são alvos da reação com os TBARS. Porém, os TBARS também reagem com proteínas e lipídeos glicosilados e carbamílicos, o que reduz sua especificidade (Huang, Huang et al. 1998).

2.1.3 Ações Antiinflamatórias do HDL – da Fisiologia ao Estresse Agudo

A importância do HDL na modulação da resposta inflamatória tem sido abordada em importantes publicações. Na aterosclerose existe um aumento na expressão de moléculas de adesão pelo endotélio vascular, o que ocorre de maneira dependente dos níveis de citocinas inflamatórias e de dano vascular (Natarajan, Ray et al. 2010). Em modelos animais foi demonstrado que o HDL inibe a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (Nicholls, Dusting et al. 2005), além de inibir a migração de monócitos para o espaço subendotelial (Ansell, Navab et al. 2003), contribui para inibir também a ativação de células inflamatórias no endotélio (Mineo, Deguchi et al. 2006). Além disso, recentemente Bursill e colaboradores verificaram que a infusão de partículas rHDL em camundongos induz redução dos níveis de diversas citocinas e receptores de citocinas por um mecanismo relacionado à modulação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e do peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) (Bursill, Castro et al. 2010). De maneira concordante, no mesmo estudo foi demonstrado que a incubação de monócitos ou células endoteliais humanos com partículas rHDL produziu redução de marcadores inflamatórios, a exemplo da expressão da subunidade nuclear p65, da atividade da I κ B quinase, e da fosforilação do I κ B α (Bursill, Castro et al. 2010).

A capacidade do HDL em modular a atividade inflamatória pode ser modificada pelo tratamento com niacina (vitamina B3) ou com drogas inibidoras da CETP (Lewis and Rader 2005, Nissen, Tardif et al. 2007, Cazita, Barbeiro et al. 2008, Schwartz, Olsson et al. 2009, Grion, Cardoso et al. 2010). Exemplos de inibidores da CETP são torcetrapib, dalcetrapib e anacetrapib. Um estudo recente sugeriu que o HDL de pacientes tratados com niacina ou anacetrapib apresenta maior capacidade de promover efluxo de colesterol do que previamente ao tratamento (Yvan-Charvet, Kling et al. 2010). Além disso, no mesmo estudo foi observado que, tanto pré- como pós-tratamento, o HDL apresentou potente capacidade de inibir a resposta inflamatória de

macrófagos, através de um processo em parte dependente de ABCA1 e ABCG1 (Yvan-Charvet, Kling et al. 2010). Estes resultados são concordantes com estudos de proteômica do HDL, que revelaram uma alteração profunda na composição protéica da lipoproteína com o tratamento com estatinas e niacina, levando a redução de proteínas pró-aterogênicas como apoE e aumento de proteínas antiaterogênicas como PLTP e apoJ (Green, Vaisar et al. 2008).

2.2 METABOLISMO DO ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma substância lábil e difusível, mediadora do relaxamento dependente do endotélio (Furchgott and Zawadzki 1980), e formada a partir do aminoácido L-arginina, pela enzima NO sintase (NOS). Dois tipos de NOS são conhecidos: duas formas constitutivas (cNOS) e uma forma indutível (iNOS) (Forstermann, Boissel et al. 1998). Na célula endotelial está presente em maior proporção uma NOS constitutiva, a NOS endotelial (eNOS) ou NOS do tipo III. Esta enzima produz o NO em duas etapas de oxidação, utilizando o oxigênio molecular (O_2). Na primeira etapa, ocorre a formação de $N^{(1)}$ -Hidroxi-L-arginina, e na etapa posterior a $N^{(1)}$ -Hidroxi-L-arginina é convertida em NO e L-citrulina, consumindo nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e O_2 .

A ativação da eNOS depende em maior grau da concentração intracelular de íons cálcio nas células endoteliais. Mas também sua ativação depende da via da calmodulina, demandando a presença de NADPH e tetra-hidrobiopterina. A eNOS pode ser inibida de forma competitiva por análogos da L-arginina, como L-NMMA e L-NAME.

Para exercer seu efeito de vasodilatação, o NO difunde-se em direção às células musculares lisas vasculares e promove seu relaxamento pela ativação da enzima citosólica guanilato ciclase. A guanilato ciclase aumenta a disponibilidade intracelular de GMP cíclico, levando à redução do influxo de cálcio para o citoplasma e aumentando a captação do íon pelo retículo sarcoplasmático por meio da enzima Ca^{++} /ATPase (Hirata and Murad 1994, Warner, Mitchell et al. 1994). Adicionalmente, o NO pode causar relaxamento muscular por interação direta com canais de potássio; além de reduzir a produção de endotelina-1 nas células endoteliais (Warner, Mitchell et al. 1994).

A produção de NO é o mais importante mecanismo para o relaxamento dependente do endotélio em grandes artérias isoladas, incluindo coronárias, artérias mesentéricas, pulmonares e cerebrais. A manutenção do tono vascular basal ocorre devido à liberação contínua de NO pelas células endoteliais. Seu significado *in vivo* é sugerido pelas observações de que os inibidores da eNOS causam vasoconstrição em muitos leitos vasculares e um aumento da PA sistêmica em animais e humanos (Dattilo and Makhoul 1997, Zatz and Baylis 1998). Ao mesmo tempo, a liberação de NO é modulada por estímulos físicos e humorais. Entre os estímulos físicos encontram-se a pressão hidrostática transmural, o estiramento circunferencial e as forças de cisalhamento. Os estímulos humorais que estimulam a liberação de NO são: hormônios como catecolaminas e vasopressina; autacóides, como a bradicinina e a histamina; e mediadores liberados pelas plaquetas (serotonina e adenosina difosfato - ADP) ou formados durante a coagulação (trombina) (Kiely, Cybulsky et al. 1995). Desta forma, alguns hormônios e drogas que alteram os níveis intracelulares de cálcio podem interferir na produção e liberação de NO.

2.3 REATIVIDADE BRAQUIAL E DILATAÇÃO ARTERIAL MEDIADA PELO ENDOTÉLIO

A ativação de células endoteliais ocorre essencialmente por meio de três tipos de estímulos mecânicos primários: pressão intravascular hidrostática; tensão circunferencial, pelo estiramento das junções intercelulares endoteliais; e forças de cisalhamento, pelo contato tangencial da coluna sanguínea sobre a superfície endotelial. As forças de cisalhamento compõem o mais potente determinante da produção de NO pelas células endoteliais. (Gimbrone, Nagel et al. 1997, Takahashi, Ishida et al. 1997, Gimbrone, Anderson et al. 1999). A partir deste conceito, a avaliação da função endotelial utiliza como método básico o processo de compressão e descompressão vascular. Após a descompressão vascular, a coluna de sangue promove aumento da força de “cisalhamento” sobre a parede vascular. O conseqüente aumento fluxo é detectado por mecanorreceptores endoteliais, levando à produção e liberação de substâncias vasodilatadoras, incluindo o óxido nítrico (Sinoway, Hendrickson et al. 1989). A seguir, a dilatação da artéria alvo pode ser medida por meio de ultrassonografia (expressa em % de

incremento do diâmetro em relação ao basal). A redução da dilatação arterial, que depende do endotélio e é mediada pela via NO-GMP cíclico pode ser interpretada como disfunção endotelial (Corretti, Anderson et al. 2002).

O posicionamento do manguito proximal ou distal em relação à artéria avaliada parece ter significados fisiológicos diferentes. No caso da avaliação da artéria braquial, quando o manguito é inflado distalmente à artéria, a força de cisalhamento produzida determina uma resposta essencialmente mediada por NO. Por outro lado, com o manguito proximal à artéria, a contribuição do NO à vasodilatação é de apenas cerca de 40%. O restante da medida parece estar relacionado a outras substâncias vasodilatadoras como prostaglandinas e acetilcolina (Pyke and Tschakovsky 2005). Apesar disso, ambos os procedimentos são igualmente preditores precoces de eventos cardiovasculares (Green, Jones et al. 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Examinar a influência do estresse inflamatório agudo e subagudo do IM sobre a relação entre os níveis, função e metabolismo da HDL plasmática vs a função do endotélio vascular.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- a) Capítulo 1: Examinar o impacto do estresse inflamatório agudo sobre a relação entre os níveis de HDL-C e função da HDL vs a função do endotélio vascular
 - a. Estudar a evolução temporal das características físico-químicas da HDL (tamanho da partícula, massa, conteúdo de apoA-I, cholesteryl ester, fosfolípidos e outros) nos primeiros 30 dias após o IM.
 - b. Avaliar a capacidade da HDL extraída dos pacientes em reduzir a oxidação da LDL induzida por sulfato de cobre no primeiro (D1), quinto (D5) e trigésimo (D30) dias após o IM.
 - c. Estimar a oxidação da HDL extraída dos pacientes pela medida de TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) no D1, D5 e D30.
 - d. Aferir a oxidação da HDL induzida por sulfato de cobre no D1, D5 e D30.

- e. Avaliar a capacidade da HDL isolada dos pacientes no D1, D5 e D30 em inibir a secreção de VCAM-1 por células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).
 - f. Investigar a existência de interação entre os níveis plasmáticos e características fenotípicas e funcionais da HDL v.s. marcadores de função endotelial na fase aguda.
- b) Capítulo 2: Estudar o impacto da atividade de CETP sobre a função do endotélio vascular no período após o IM.
- a. Avaliar, por meio de avaliações sequenciais e curvas temporais, a evolução da atividade de CETP nos primeiros 30 dias após o IM.
 - b. Estudar a influência da atividade da CETP sobre estresse oxidativo e atividade inflamatória entre o primeiro e quinto dia após o IM e sua interdependência com a ação modificadora na HDL.
 - c. Estudar a influência da atividade da CETP sobre o estresse oxidativo e atividade inflamatória entre o primeiro e quinto dia após o IM e sua interdependência com a ação modificadora na HDL.
 - d. Analisar a influência da atividade de CETP sobre a função endotelial na evolução do IM.
 - e. Estudar a interação entre o acúmulo de TBARS na HDL e a dilatação vascular da artéria braquial mediada pelo endotélio.
 - f. Avaliar a magnitude da atividade de CETP da fase aguda como marcador de desfechos clínicos em curto e médio prazo após o IM.
 - g. Estudar a relação entre os níveis plasmáticos de HDL-C e a resposta inflamatória após IM no primeiro e quinto dia após o IM.

4 MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

A população de estudo foi representada por dois distintos subgrupos de pacientes admitidos na coorte *Brazilian Heart Study* (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02062554) (Sposito, Carvalho et al. 2009). O estudo consiste em uma coorte prospectiva de pacientes admitidos consecutivamente com IM com supradesnivelamento do segmento ST (IMCSST) no Hospital de Base de Brasília desde junho de 2006 até os dias atuais.

Os critérios de inclusão são: (i) período menor do que 24h entre o início dos sintomas e a admissão; (ii) supradesnivelamento do segmento ST de, no mínimo, 1 mm no plano frontal ou 2 mm no plano horizontal em derivações contíguas, (iii) necrose miocárdica, evidenciada pela presença de ao menos um valor acima do 99º percentil acima da referência para Creatina-Cinase-MB (CK-MB, 25 U/L) e troponina (0,04 ng/mL); e (iv) ausência de incompetência cognitiva que impossibilite a resposta verbal aos questionários médicos ou impossibilidade de retornar às consultas médicas. A razão da escolha desse tipo de IM, IMCSST, foi relacionada à acurácia diagnóstica para a inclusão em menos de 24 horas.

Conforme demonstrado na figura 5, a partir de um grupo de 599 pacientes admitidos consecutivamente desde 2006 (sendo 87 excluídos por causas diversas) com os critérios de admissão listados, foram selecionados dois subgrupos de pacientes para os protocolos: “HDL” e “CETP”. Para o protocolo “HDL” foram selecionados 180 pacientes admitidos consecutivamente entre Junho de 2010 e Fevereiro de 2013, sendo admitidos apenas pacientes com dados completos, incluindo avaliação da dilatação fluxo-mediada (FMD), e plasma colhido e congelado em condições adequadas (volume suficiente e estocagem adequada a -80°C em alíquotas nunca antes descongeladas). Os nove últimos pacientes com IMCSST do protocolo foram incluídos prospectivamente com maior volume de coleta de plasma para avaliação funcional da HDL. Nove indivíduos saudáveis (critérios de inclusão e exclusão a seguir) foram paralelamente admitidos também para realização dos testes funcionais da HDL.

Num estudo piloto para o protocolo “CETP” foram incluídos prospectivamente 60 pacientes consecutivos com avaliação de FMD e plasma colhido e congelado em condições adequadas entre Abril de 2011 e Fevereiro de 2013. Em seguida, a casuística do estudo “CETP” foi projetada para 120 pacientes (justificativa na secção Discussão), entre os quais quatro foram excluídos por não terem realizado avaliação de FMD e/ou perda de contato com a equipe. Os nove últimos pacientes do protocolo foram submetidos a coletas de maior volume de plasma para a medida dos TBARS na HDL isolada por ultracentrifugação.

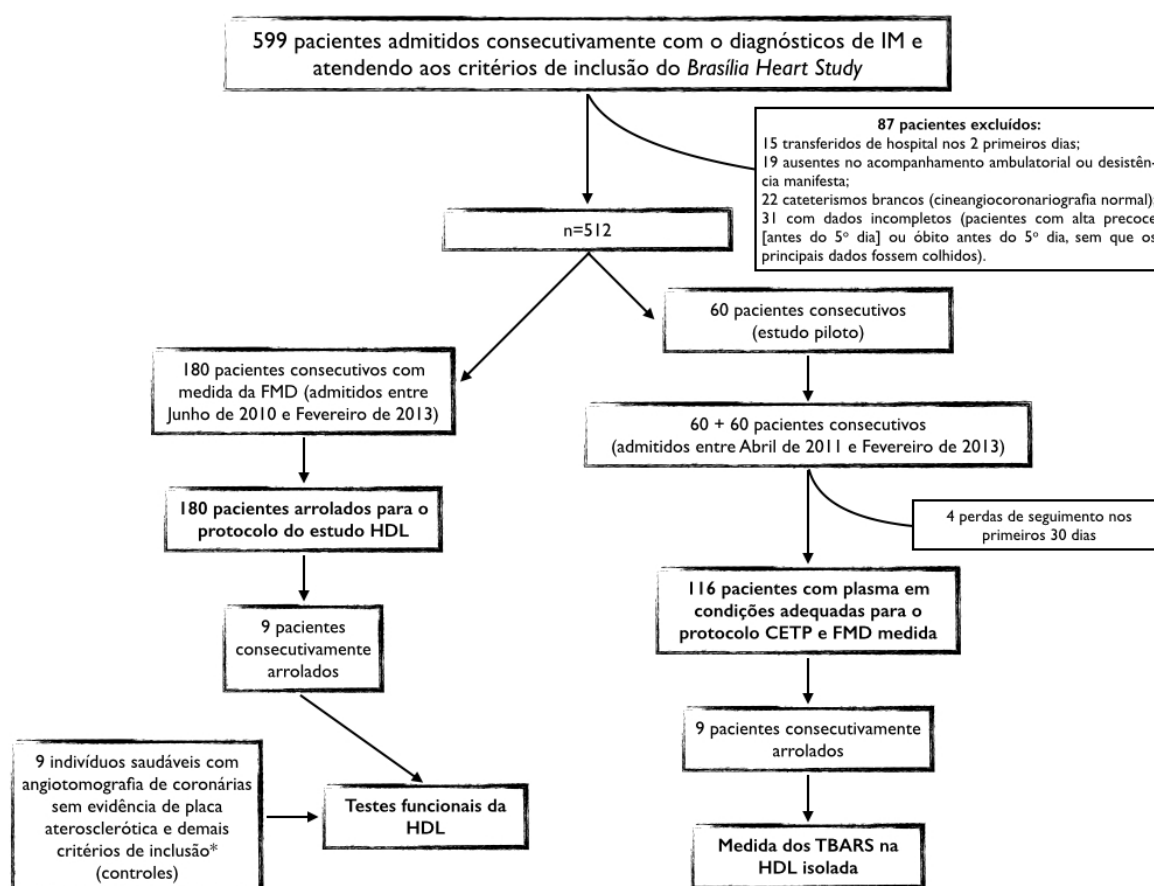


Figura 5. Fluxograma de seleção dos pacientes para o presente estudo

O grupo controle para os testes funcionais da HDL (n=9) foi selecionado com o objetivo de parear os indivíduos para sexo e idade com os nove pacientes infartados. Os indivíduos controle foram escolhidos a partir de uma base de dados com 104 pacientes de uma clínica de radiologia (*Biocárdios*, Brasília, DF) que haviam realizado angiogramas de coronárias entre Janeiro de 2012 e Fevereiro de 2013. Antes do pareamento, foram excluídos 89

pacientes que apresentavam: fatores de risco cardiovascular, anatomia cardíaca anormal, escore de cálcio coronário > zero ou presença de qualquer placa nas artérias coronárias detectáveis à angiotomografia computadorizada cardíaca (tomografia de 64 cortes; Aquilion 64, Toshiba Medical Systems, Otawara, Japão). Os pacientes também foram excluídos do estudo se apresentassem evidências de doenças infecciosas, inflamatórias ou autoimunes, diabetes, insuficiência renal ou hepática avançada, doenças neoplásicas, e história de cirurgia maior ou trauma nos últimos 6 meses.

4.2 COMITÊ DE ÉTICA E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS) da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), sob protocolo número 130/2006 (Anexo A). Todos os pacientes admitidos no estudo foram previamente instruídos sobre os procedimentos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme a Declaração de Helsinque e a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

4.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os participantes do *Brasília Heart Study* são admitidos nas primeiras 24 horas após o início do IM, com média de 181 ± 227 minutos entre o início dos sintomas e a primeira avaliação. Nesta avaliação, são realizados: (i) coleta de sangue e DNA para dosagens e congelamento, (ii) antropometria, (iii) análise da composição alimentar através de questionário recordatório, (iv) histórico médico em geral, e (v) avaliação da presença de sintomas depressivos pelo Inventário de Depressão de Beck 2ª Edição (BDI-II).

Os pacientes são reavaliados diariamente quanto a: quadro clínico, medicações utilizadas e o surgimento de eventos isquêmicos recorrentes. O tratamento dos pacientes é decidido pelo médico assistente, sem a interferência da equipe do estudo. Caso haja óbito antes desta avaliação, a confirmação do evento é feita através de registros do prontuário médico ou atestado de óbito. No 3º, 5º e 30º dias após início do IM, novas coletas de sangue são realizadas para análises bioquímicas e congelamento após 12 horas de jejum.

Ao final do primeiro mês após o IM, a primeira consulta ambulatorial é realizada conjuntamente com a coleta de sangue para análise bioquímica de rotina incluindo perfil lipídico, proteína C reativa (PCR) e demais exames que se tornarem necessários. Além disso, são realizados: teste ergométrico em esteira para avaliar isquemia residual ou recorrente, holter 24 horas para avaliar isquemia silenciosa e ecocardiograma para avaliar a função ventricular sistólica residual após IM e estudo da reatividade da artéria braquial, ultrassonografia de carótidas, tomografia computadorizada cardíaca para avaliar o escore de cálcio coronário e ressonância cardíaca com gadolínio e realce tardio para confirmação e quantificação da massa infartada.

As consultas ambulatoriais se repetem a cada 2 a 4 meses, quando são realizadas dosagens bioquímicas de rotina, avaliação médica para a identificação de recorrência ou complicações do evento inicial, como insuficiência cardíaca congestiva. Na 24ª consulta, além das avaliações acima referidas, avalia-se por teste ergométrico, holter e ecocardiograma, a recorrência de isquemia miocárdica.

4.3.1 Análises Bioquímicas

As seguintes dosagens sanguíneas são realizadas: glicose (Glucose GOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), colesterol total (CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), triglicérides (GPO-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), HDL colesterol (HDL cholesterol without sample pre-treatment, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e HbA1c (Variant II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). O LDL colesterol é calculado pela fórmula de Friedewald.

O pool de óxido nítrico (NO) no plasma foi estimado pelos níveis de nitrato e nitrito (NO_x), que foi medido por meio de quimioluminescência (NOA model, Sievers Instruments, Boulder, CO, USA) após redução com cloreto ácido de vanádio (III). Foram também medidos os níveis plasmáticos de Interleucina-2 (IL-2) (Fluorokine® MAP Human IL-2 Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e fator de necrose tumoral tipo α (TNF- α) (Fluorokine® MAP Human TNF- α Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). O estresse oxidativo foi estimado pela mensuração dos níveis plasmáticos de 8-isoprostano (EIA kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

4.3.2 Medida da atividade da CETP plasmática

A atividade da *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) foi medida por meio de ensaio exógeno (Lagrost 1998). A alíquotas de 67 μ L/mL de plasma total (onde a atividade da *lecithin cholesterol acyltransferase* [LCAT] era inibida por DTNB 9 μ L/mL) foram adicionadas frações de HDL-[¹⁴C]colesteril éster (40 mg de colesterol/dL) com partículas de LDL e VLDL (200 mg de colesterol/dL) preparadas a partir de um *pool* exógeno. Esta mistura era então incubada a 37°C por 2h. As lipoproteínas compostas de Apo-B, presentes na mistura incubada, são então precipitadas com o uso de cloreto de magnésio e sulfato de dextrana (1:1), passando em seguida por incubação a 4°C por 30 minutos e centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, 200 μ L do sobrenadante são coletados e misturados a 2,5 ml de solução contadora, sendo realizada a leitura da radiação emitida por contador beta. A radioatividade emitida pelo [¹⁴C]colesteril éster no sobrenadante representa a taxa de transferência de colesteril éster entre as lipoproteínas, e os valores da atividade de CETP são expressos como o percentual de [¹⁴C]colesteril éster transferido em 2 horas. Estes valores dependem simultaneamente das concentrações plasmáticas de HDL, lipoproteínas ricas em triglicérides e CETP. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

4.3.3 Isolamento das partículas de HDL e detecção de partículas oxidada de HDL

A HDL foi isolada do plasma por meio de ultracentrifugação por gradiente de densidade de acordo com o método descrito por Chapman et al. (Chapman, Goldstein et al. 1981), utilizando brometo de potássio sólido para ajuste da densidade. As lipoproteínas isoladas foram extensivamente dialisadas com PBS livre de EDTA, durante 48 h, a 4°C, no escuro. Todos os ensaios foram realizados em lipoproteínas recentemente isoladas, mantidos a 4°C por um período máximo de 15 dias.

Atividade antioxidante da HDL

A atividade antioxidante da HDL foi medida por co-incubação com LDL durante a oxidação estimulada por sulfato de cobre (CuSO₄ a 1 mmol/L). H₂DCFDA (2',7'-diacetato dicloro-dihidrofluoresceína, Life Technologies, Nova Iorque, EUA) a 2,0 mg/ml, uma forma quimicamente reduzido de fluoresceína utilizada como um indicador de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi incubado com metanol por 30 minutos no escuro. Com isso, o H₂DCFDA (não fluorescente) é convertido para o composto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), e o metanol foi evaporado em nitrogênio. A HDL (concentração final de ApoA-I de 50 µg/ml) foi misturada a PBS-Chelex e LDL (colesterol a 20 mg/dL) para um volume total de 100 µL no mesmo *ependorf* onde foi preparado o DCF. O curso de tempo da oxidação de LDL + HDL foi caracterizado pelo acúmulo de ROS após a adição de 0,5 µM de CuSO₄ a DCF, sendo quantificado como o incremento da fluorescência a partir do início do experimento (*baseline*). A fluorescência foi medida num leitor de microplacas de fluorescência (SpectraMax M5E MultiModo leitor de microplacas, Molecular Devices, CA, EUA) utilizando um comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 540 nm a cada 15 minutos durante 24 horas. A diferença entre a fluorescência de base e 24 horas (delta) e a área sob a curva (AUC) para o acúmulo de ROS foram calculados. Correções para o aumento de fluorescência em si CuSO₄ foram feitas. Um protocolo semelhante foi realizada, na ausência de partículas de LDL a fim de testar a auto-oxidação de HDL.

O grau de modificações oxidativas de HDL foi estimada por meio da medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A absorvância foi medida a 535 nm e os

valores de TBARS foi calculada através de uma curva padrão de 0-100 μM 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

Atividade antiinflamatória da HDL

Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram cultivadas em meio próprio (DMEM, Gibco), suplementado com fatores de crescimento em uma atmosfera umidificada (37°C, 5% CO₂). As HUVECs foram cultivadas até a confluência, sendo mantidas em repouso em meio contendo 0,5% de soro fetal bovino (FBS) até antes dos experimentos. Para os experimentos as células foram re-suspensas em DMEM 6ml e tripsinizadas. Em seguida, a tripsina era neutralizada com 6 mL de DMEM + FBS a 10%, passando-se a centrifugação durante 2 minutos a 1500 rpm. Após a avaliação da viabilidade celular com o azul de tripano (*trypan blue*), 0,1 a 0,3 x 10⁵ células/mL foram dispostos em cada poço (*well*) com DMEM + 10% FBS, com um total de 12 mL/poço e incubadas até confluência (~48h).

Inicialmente, as células foram incubadas com HDL (concentração final de ApoA-I de 50 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora. Depois disso, TNF- α (5 ng/mL) foi adicionado ao meio e as HUVEC foram incubadas durante 3 horas em atmosfera umidificada (37 ° C, 5% CO₂). Ao final, 700 μL do sobrenadante foi retirada para avaliação dos níveis de VCAM-1 por ELISA (VCAM-1 humano kit ELISA, ECM340, Milipore, MA, EUA).

O tamanho e o número de partículas de HDL foram medidos por meio de dispersão de luz laser (*laser light scattering* - LLS) após precipitação das lipoproteínas contendo apo B (LDL e VLDL) com polietileno glicol (PEG) 8000, como descrito por Lima et al. (Lima and Maranhao 2004). O isolamento das HDL para posterior análise LLS foi padronizada como se segue: 0,5 ml de PEG (Merck-Schuchardt) foi adicionado a cada amostra de plasma dos pacientes (0,5 mL) e agitou-se num vórtice-misturador durante 30s. As amostras foram, então, centrifugadas a 1800g durante 10 min a 25°C, e uma porção de 0,5 ml do sobrenadante foi adicionado a 1,5 ml de uma solução a 10 mmol/L de NaCl e passados através de um filtro de 0,22 μm (Millipore Products Division). O diâmetro da HDL foi medido por um Analisador de Potencial Zeta ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation), que utiliza um laser de hélio-néon 29 mW a 658 nm para excitar as amostras. A luz dispersa é refletida a um ângulo de 90° para um tubo fotomultiplicador e contador de *photons*, sendo então dirigida para um dispositivo de leitura.

4.3.4 Angiografia coronária

A coronariografia foi realizada sistematicamente em todos os pacientes inscritos de acordo com técnicas convencionais. Um estreitamento luminal >70% foi considerado estenose significativa. Todas as angiografias coronárias também foram classificadas pelos escore de Gensini e Friesinger (Ringqvist, Fisher et al. 1983). Trombo foi definido como a presença de um defeito de enchimento central, endoluminal ou luscência rodeado por contraste visto em várias projeções e persistência do contraste dentro do lúmen (Mabin, Holmes et al. 1985). Todos os dados angiográficos foram obtidas por consenso de dois cardiologistas intervencionistas experientes que foram cegados a todos os dados do estudo.

4.3.5 Dilatação fluxo-mediada

A avaliação da reatividade da artéria braquial foi realizada sistematicamente 30 dias após o IAM para avaliar a disfunção endotelial que persistiu após o estresse da fase aguda. No momento em que a análise foi realizada, todos os pacientes estavam sob terapia de prevenção secundária por pelo menos 3 semanas, incluindo com sinvastatina 20 mg/dia. Os pacientes foram convidados a participar do exame após jejum de 12 horas e suspensão dos medicamentos vasoativos por 24 horas antes do estudo. Após 10 minutos de repouso em uma sala silenciosa com a temperatura controlada em torno de 22°C, a artéria braquial foi localizado acima do cotovelo, sendo adquirida uma imagem longitudinal de 6 a 8 cm e que correspondeu ao *scan* de repouso. Um manguito de pressão arterial foi colocada no antebraço e inflado a 50 mmHg acima da pressão arterial sistólica por 5 min. O manguito foi esvaziado, e a dilatação mediada pelo fluxo (FMD) pelo *scan* foi obtida durante 2 minutos. A percentagem de alteração de diâmetro para a FMD foi calculada em relação à sua respectiva medida em repouso. A reatividade da artéria braquial foi analisada por um médico experiente (S.N.S.) que desconhecia a todos os dados do estudo. A reprodutibilidade intra-observador foi de 95%.

4.3.6 Ressonância Nuclear Magnética Cardíaca (RNMC)

A RNMC foi realizada em um aparelho de 1,5-T GE CV / i (Wakeusha, Wisconsin) em todos os pacientes inscritos 15 dias após o IM. Um eco-gradiente de inversão-recuperação foi utilizado para a estimativa da massa infartada por realce tardio miocárdico (10 a 20 minutos após bolus endovenoso de 0,2 mmol/kg de contraste à base de gadolínio). A RNMC foi analisada por um radiologista certificado (J.M.A.), que desconhecia a todos os dados do estudo.

4.3.7 Seguimento ambulatorial

Antes da alta hospitalar, os pacientes receberam aconselhamento sobre dieta, tabagismo, atividade física regular e perda de peso, bem como prescrição médica orientada pelas diretrizes da AHA/ACC. Depois disso, os pacientes foram acompanhados no ambulatório do *Brasília Heart Study* com consultas médicas a cada 30 a 45 dias. Prescrições para acompanhamento incluíram estatinas com a adição de ezetimiba quando necessário (meta de LDL-C de 70 mg/dL); inibidores da enzima conversora de angiotensina ou bloqueadores dos receptores da angiotensina para a hipertensão ou para pacientes com fração de ejeção reduzida (<40%); controle glicêmico (HbA1c <7%); clopidogrel 75 mg/dia; aspirina 100 mg/dia; e terapia anti-isquêmica conforme necessário (propranolol e dinitrato de isossorbida, isoladamente ou em combinação). Os médicos envolvidos no acompanhamento clínico foram cegados para todas as análises realizadas no estudo.

4.3.8 Desfechos clínicos

Os desfechos clínicos foram avaliados nas visitas ambulatoriais a cada 30 a 120 dias. Os pacientes que não puderam comparecer para visitas ou familiares de pacientes falecidos foram

contatados por telefone. As informações sobre as causas da morte e eventos clínicos foram obtido a partir de certidão de óbito ou registros médicos. Eventos cardíacos adversos maiores (MACE) foram definidos como: morte súbita cardíaca e IM recorrente. A morte súbita cardíaca foi definida como um evento não-traumático, inesperado e que tenha ocorrido dentro de seis horas do início dos sintomas. IM fatal refere-se a qualquer morte precedida por infarto agudo do miocárdio. Novo IM foi definido como uma internação hospitalar documentado com sintomas compatíveis com infarto agudo do miocárdio e elevação de elevação da CK-MB e troponina I para pelo menos um valor acima do percentil 99 acima do limite de referência em um padrão temporal compatível com lesão aguda do miocárdio. Quando um paciente experimentou mais de um evento, o primeiro a ter ocorrido foi selecionado. Os pacientes que morreram de causas não-cardíacas foram censurados no dia de suas mortes.

4.4 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho da amostra foi estimado para o primeiro trabalho (Capítulo 1) com base em um poder beta de 80% e alfa de 5% bicaudal. Para o cálculo do tamanho amostral do primeiro estudo da Tese nos baseamos nos dados do estudo publicado por Kuvin et al (Kuvin, Patel et al. 2003) no qual indivíduos saudáveis com valores de HDL-C plasmático abaixo de 40 mg/dL apresentaram uma FMD de 7,4%, comparado com 11,0% em indivíduos com HDL-C igual ou superior 40 mg/dL. Considerando, portanto, que a diferença entre os grupos foi de 3,6% e desvio padrão de 5,2%, foi calculado que seriam necessários para este estudo ao menos 38 pacientes em cada braço (cada tercil). Entretanto, devido à natureza exploratória desta análise e contando ainda com as perdas no seguimento, o tamanho amostral foi estabelecido em 180 pacientes, sendo cerca de 60 pacientes em cada tercil.

Para embasar o cálculo do tamanho amostral para o segundo trabalho (Capítulo 2), não foi encontrada nenhuma referência publicada cuja análise envolvesse a relação entre atividade ou massa de CETP e os níveis de proteína C reativa, interleucinas, óxido nítrico ou FMD em humanos. Desta forma, decidimos realizar um estudo piloto inicialmente com 30 pacientes em cada braço (abaixo e acima da mediana para a atividade de CETP). No estudo piloto

foi encontrada relação entre atividade de CETP e FMD, bem como CETP e óxido nítrico. A diferença entre os grupos no estudo piloto para a FMD foi de 3,6% (9,2% vs. 5,6%, respectivamente para o grupo abaixo e acima da mediana), com desvio padrão de 6%; de forma que, para um alfa de 0,05, o poder estatístico (1- beta) seria de 64%. Assim, com o objetivo de confirmar tais achados mas com um poder estatístico maior, o tamanho amostral foi ampliado para o dobro, sendo que ocorreram 2 perdas em cada grupo. Com os presentes resultados, para a diferença observada entre os grupos de 3,7%, desvio padrão de 6%, alfa de 0,05, obtivemos um poder estatístico de 91%.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises gerais do primeiro trabalho da Tese, os pacientes foram divididos em tercios de HDL-C no D1 (<33 mg/dL, 33-42 mg/dL e >42 mg/dL). As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste do qui-quadrado para variáveis categóricas e análises de covariância (ANCOVA) ajustadas para idade, sexo e outras variáveis possíveis para variáveis contínuas. Pressupostos dos modelos ANCOVA (linearidade, normalidade da distribuição e variância igual) foram verificados usando histogramas, gráficos de probabilidade normal e de dispersão residual. Os valores da dilatação fluxo-mediada (FMD) foram transformados em log, a fim de normalizar a distribuição e permitir a análise ANCOVA. Análises de regressão logística binária foram realizadas utilizando como variável dependente FMD abaixo do valor mediano (6,5%). Estes resultados são apresentados como *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC), sendo que, primeiramente, foi realizada uma análise de regressão não ajustada. Num segundo modelo foram incluídos sexo e idade como co-variáveis e, no terceiro modelo foram incluídas variáveis com $p < 0,2$ na análise univariada para a FMD abaixo ou acima do valor médio. Para a análise de características antioxidante e anti-inflamatórias da HDL em pacientes com IMCSST no D1, D5 e D30, bem como com os controles saudáveis, foram realizados testes de Kruskal Wallis, seguido de Mann-Whitney e Dunn-Sidak. Em seguida, foi realizada a regressão linear entre as variáveis qualitativas de HDL e várias co-variáveis independentes.

No segundo estudo da presente Tese, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com os valores plasmáticos da atividade de CETP à admissão acima ou abaixo da mediana (12%). Os indivíduos com atividade de CETP acima da mediana foram classificados como tendo atividade de CETP elevada e aqueles abaixo da mediana foram classificados como tendo atividade CETP baixa. O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar dados categóricos e foram utilizados os testes *t* de Student ou Wilcoxon para comparar os dados de paramétricos e não paramétricos, respectivamente. A análise de covariância (ANCOVA), ajustada para o sexo, idade, dose de estatina, HDL-C e LDL-C no D1 foi utilizada para avaliar o efeito da CETP na variação (delta) dos níveis plasmáticos de IL-2, TNF- α , CRP e 8-isoprostano. Pressupostos dos modelos ANCOVA (linearidade, normalidade da distribuição e variância igual) foram verificados usando histogramas, gráficos de probabilidade normal e de dispersão residual. FMD foi também transformada em log, a fim de normalizar a distribuição e permitir a análise ANCOVA. Análises de regressão logística binária foram realizadas utilizando como variáveis dependentes FMD abaixo do valor médio e a presença de MACE. Estes resultados são apresentados como OR e IC de 95%. As curvas de sobrevida foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank Mantel-Cox. O modelo de Cox foi usado para examinar a associação entre a atividade da CETP e tempo até a incidência de MACE, onde foram utilizados dois modelos pré-definidos [modelo 1: não ajustado; Modelo 2: ajustado para sexo e idade]. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão para as variáveis com distribuição normal e como mediana (percentil 25-75) para dados não paramétricos. Um valor de *p* bicaudal de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS para Mac versão 20.0.



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

HDL levels and oxidizability during myocardial infarction are associated with reduced endothelial-mediated vasodilation and nitric oxide bioavailability



Luiz Sergio F. Carvalho^a, Natália Panzoldo^a, Simone N. Santos^a, Rodrigo Modolo^a, Breno Almeida^a, Jose C. Quinaglia e Silva^b, Wilson Nadrusz-Jr^a, Eliana C. de Faria^c, Andrei C. Sposito^{a,*}, on behalf of the Brasilia Heart Study Group

^a Cardiology Division, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

^b Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS), Brasília, DF, Brazil

^c Lipids Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2014

Received in revised form

22 October 2014

Accepted 28 October 2014

Available online 4 November 2014

Keywords:

High-density lipoprotein

Anti-oxidant

Anti-inflammatory

Myocardial infarction

Endothelial dysfunction

Flow-mediated dilation

ABSTRACT

Objective: Acute phase response modifies high-density lipoprotein (HDL) into a dysfunctional particle that may favor oxidative/inflammatory stress and eNOS dysfunction. The present study investigated the impact of this phenomenon on patients presenting ST-elevation myocardial infarction (STEMI).

Methods: Plasma was obtained from 180 consecutive patients within the first 24-h of onset of STEMI symptoms (D1) and after 5 days (D5). Nitrate/nitrite (NO_x) and lipoproteins were isolated by gradient ultracentrifugation. The oxidizability of low-density lipoprotein incubated with HDL (HDL_{aoxLDL}) and the HDL self-oxidizability (HDL_{autox}) were measured after CuSO₄ co-incubation. Anti-inflammatory activity of HDL was estimated by VCAM-1 secretion by human umbilical vein endothelial cells after incubation with TNF- α . Flow-mediated dilation (FMD) was assessed at the 30th day (D30) after STEMI.

Results: Among patients in the first tertile of admission HDL-Cholesterol (<33 mg/dL), the increment of NO_x from D1 to D5 [6.7(2; 13) vs. 3.2(–3; 10) vs. 3.5(–3; 12); $p = 0.001$] and the FMD adjusted for multiple covariates [8.4(5; 11) vs 6.1(3; 10) vs. 5.2(3; 10); $p = 0.001$] were higher than in those in the second (33–42 mg/dL) or third (>42 mg/dL) tertiles, respectively. From D1 to D5, there was a decrease in HDL size ($-6.3 \pm 0.3\%$; $p < 0.001$) and particle number ($-22.0 \pm 0.6\%$; $p < 0.001$) as well as an increase in both HDL_{aoxLDL} (33%(23); $p < 0.001$) and HDL_{autox} (65%(25); $p < 0.001$). VCAM-1 secretion after TNF- α stimulation was reduced after co-incubation with HDL from healthy volunteers (-24% (33); $p = 0.009$), from MI patients at D1 (-23% (37); $p = 0.015$) and at D30 (-22% (24); $p = 0.042$) but not at D5 ($p = 0.28$).

Conclusion: During STEMI, high HDL-cholesterol is associated with a greater decline in endothelial function. In parallel, structural and functional changes in HDL occur reducing its anti-inflammatory and anti-oxidant properties.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In healthy individuals and patients with low-grade inflammation, high-density lipoprotein (HDL) has been considered an important player for protecting functional and structural changes in the artery wall mainly by attenuating oxidative and inflammatory burden, endothelial protection and reparation, and the reverse cholesterol transport [1,2]. The role of HDL on the arterial function

during myocardial infarction (MI), in which there is a strong oxidative and inflammatory response, is less clear.

Phenotypic changes in HDL have been observed during the first 24 h after symptom onset in acute coronary syndromes (ACS) [3,4]. It is possible that these changes may persist and even intensify during the following days after MI where there is a substantial increase in the systemic inflammatory activity [5]. From a mechanistic point of view, these changes can mitigate a wide range of potentially protective actions of HDL such as paraoxonase-1 (PON-1) activity [3,4], apolipoprotein A-I (apoA-I)-mediated cholesterol efflux [6,7], and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity [3,4]. Hypothetically, these aforementioned effects may favor the

* Corresponding author. Cardiology Division, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), 13084-971 Campinas, Sao Paulo, Brazil.

E-mail address: andreisposito@gmail.com (A.C. Sposito).

decline in nitric oxide (NO) bioavailability and endothelial vasomotor function in MI patients and lead to an unfavorable cardiovascular prognosis independently of other known risk factors [8]. However, this assumption has yet to be verified.

In this context, we evaluated the degree of qualitative and quantitative changes in HDL during the first days after ST-elevation MI (STEMI) and its impact over NO bioavailability and endothelial vasomotor function.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The study population was composed of 180 consecutive STEMI patients STEMI admitted to the prospective *Brazilian Heart Study*, which is registered at ClinicalTrials.gov as an observational prospective cohort study by the Identifier NCT02062554. A more detailed description is published elsewhere [9]. Briefly, the admission criteria included: (i) less than 24 h from the onset of symptoms of MI, (ii) ST-segment elevation of at least 1 mm (frontal plane) or 2 mm (horizontal) in contiguous leads, and (iii) myocardial necrosis, as evidenced by an increase to at least one value above the 99th percentile above the reference limit of CK-MB (25 U/L) and troponin I (0.04 ng/mL), followed by a decline of both.

A complete medical evaluation was performed upon hospital admission (D1) and blood samples were drawn 15 ± 6 h after MI

symptoms and with a mean fasting time of 13 ± 6 h. The second and third samples were collected after a 12-h overnight fast at the fifth (D5) and 30th day (D30) after MI. The attending physicians solely decided on medical treatment, including the type of reperfusion therapy, without the interference of the study investigators.

A subset of consecutive non-diabetic STEMI patients ($n = 9$) underwent larger blood sample draws for the HDL functional assays. In addition, age- and sex-matched healthy volunteers ($n = 9$) were selected as positive controls for these assays. Subjects were excluded from the control group if they presented the following: cardiovascular risk factors, abnormal cardiac anatomy, calcium score > zero, or coronary artery plaques detectable at cardiac computed tomography (64-slice tomography; Aquilion 64, Toshiba Medical Systems, Otawara, Japan). Patients were also excluded from the study if there was evidence for accompanying infectious, inflammatory or autoimmune disorders, diabetes, advanced kidney or liver failure, neoplastic disorders, and a history of major surgery or trauma within the previous 6 months. The institutional research ethics committee approved the study and each patient signed an informed consent.

2.2. Biochemical analysis

The following measurements were performed: glucose, cholesterol, triglycerides, HDL-C, high-sensitivity CRP, and

Table 1
Characteristics of studied patients according to HDL-C tertiles.

	1st Tertile	2nd Tertile	3rd Tertile	<i>p</i>
<i>n</i>	60	61	59	
Age, years	59.6 ± 10	61.2 ± 11	63.9 ± 11	0.01
Male, %	83	77	67	0.01
Body mass index, Kg/m ²	28.0 ± 5	27.9 ± 4	27.0 ± 4	0.22
Waist circumference, cm	97 ± 12	96 ± 14	96 ± 11	0.30
Diabetes mellitus, %	21	20	19	0.85
HbA1c, %	6.7 ± 2.0	6.5 ± 1.8	6.4 ± 1.8	0.25
Blood glucose at admission, mg/dL	142 ± 55	145 ± 70	149 ± 76	0.20
HOMA2S, %	62 ± 61	60 ± 67	60 ± 63	0.37
Smoking habit, %	45	38	30	0.044
Sedentary, %	57	59	52	0.49
Hypertension, %	67	56	57	0.13
Prior MI, %	16	12	10	0.29
SBP at admission, mmHg	136 ± 33	134 ± 34	136 ± 30	0.91
DBP at admission, mmHg	87 ± 21	83 ± 22	86 ± 19	0.91
Heart rate at admission, bpm	77 ± 16	79 ± 15	73 ± 19	0.28
GFR, mL/min/1.73 m ²	70 (61–88)	71 (57–83)	70 (60–84)	0.69
Killip class I, %	96	91	96	0.42
TIMI risk score, points	3 ± 2	4 ± 2	4 ± 2	0.52
CK-MB peak, u/L	212 ± 182	227 ± 199	249 ± 216	0.22
Troponin I peak, ng/dL	19 ± 19	20 ± 22	19 ± 22	0.36
Mean simvastatin dose during hospitalization, mg	42 ± 28	44 ± 27	33 ± 27	0.065
Mean nitroglycerin dose in the first 24 h, mg	2.1 ± 3	2.6 ± 3	2.3 ± 3	0.80
Chemical thrombolysis, %	70	75	62	0.28
PCI, %	14	10	14.5	0.72
Infarction Mass by CMRI, g	10.0 (7.8–15)	11.0 (4.0–20)	10.5 (9.0–19)	0.72
LV diastolic diameter, mm	55.5 ± 6	57.8 ± 8	53.0 ± 9	0.77
LV ejection fraction, %	50 ± 10	42 ± 14	46 ± 12	0.13
CRP D1, mg/L	0.65 (0.4–1.2)	0.56 (0.3–1.5)	0.40 (0.1–1.2)	0.66
CRP D5, mg/L	2.57 (1.5–4.2)	3.46 (2.1–7.7)	3.84 (2.6–7.4)	0.010
Delta CRP, mg/L	1.45 (0.4–3.2)	2.94 (0.4–7.0)	3.03 (0.9–6.9)	0.001
NO _x D1, μMol/L	18.6 ± 7	20.8 ± 9	19.7 ± 9	0.36
NO _x D5, μMol/L	29.4 ± 14	23.6 ± 12	24.3 ± 10	0.023
Delta NO _x , μMol/L	6.7 (2.0–13)	3.2 (–3.0–12)	3.5 (–3.0–12)	<0.001
FMD, %	8.4 (4.6–11.4)	6.1 (3.4–10.2)	5.2 (3.1–10.2)	0.001
Log FMD, %	0.92 (0.7–1.1)	0.78 (0.5–1.0)	0.74 (0.5–1.0)	<0.001

Data presented as mean ± standard deviation for normally distributed variables and as median (25th – 75th percentile) for nonparametric data. MI: myocardial infarction; HbA1c: Glycosylated hemoglobin; GFR: Glomerular filtration rate; CMRI: Cardiac Magnetic Resonance imaging; CK-MB: creatine kinase isoenzyme MB; LV: left ventricular; PCI: percutaneous coronary intervention; NO_x: nitric oxide; FMD: flow-mediated vasodilation. Statistical analysis: Chi-Square for categorical data; ANOVA or Kruskal Wallis for continuous variables; for FMD, additional adjustments were made for use of reperfusion therapy, infarction mass by CMRI, statin treatment and smoking habit.

nitrite + nitrate (NO_x). LDL-C was calculated using the Friedewald formula. Additional data is available at the [Supplements section](#).

2.3. HDL functional assays

Blood samples were obtained after a 12-h fasting period from a subset of non-diabetic STEMI patients enrolled in the study at D1, D5 and D30 as well as from age- and sex-matched healthy volunteers. HDL was isolated from plasma by density gradient ultracentrifugation according to the method described by Chapman et al. [10] using solid potassium bromide for density adjustment. Anti-oxidant and anti-inflammatory tests are described at the [Supplements section](#). We also estimated the degree of HDL oxidative modifications by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), a method that quantifies lipid-derived aldehydes, including malondialdehyde [11]. This assay indicates the magnitude of reactive oxygen species production in HDL since the particle-derived lipids are easily injured by free radicals.

2.4. Brachial artery reactivity

Patients were studied at D30 in the fasting state and vasoactive medications were withdrawn 24 h before the study. Additional data is available at the [Supplements section](#).

2.5. Cardiac magnetic resonance imaging

CMRI was performed on a 1.5-T GE CV/i System (Wakeusha, Wisconsin) in all the enrolled patients at D30. Additional data is available at the [Supplements section](#).

2.6. Statistical methods

Data are presented as mean \pm standard deviation for normally distributed variables and as median (25th – 75th percentile) for data without normal distribution. For the general analyses, patients were divided into tertiles of HDL-C at D1 (<33 mg/dL, 33–42 mg/dL, and >42 mg/dL). Comparisons between groups were performed using the chi-square test for categorical variables and continuous variables were analyzed by Kruskal Wallis test for non-normally distributed data or analysis of variance (ANOVA) followed by analysis of covariance (ANCOVA) adjusted by age, gender, and other potential covariates for normally distributed variables. Assumptions of the ANCOVA models (linearity, normality of distribution, and equal variance) were checked using histograms, normal probability plots, and residual scatter plots. FMD was log-transformed in order to normalize the distribution and allow ANCOVA analysis. Binary logistic regression analyses were performed using as dependent variable FMD below the median value (6.5%). These results are presented as odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI). Firstly, we performed unadjusted regression analysis. In the second model we included gender and age and in the third model we added variables with $p < 0.2$ in the univariate comparison for FMD below or above the median value. We based this p -value cut-off point on previous demonstration of the superiority of this approach in comparison to more traditional levels such as 0.05 [12,13].

For comparing HDL characteristics, anti-oxidant and anti-inflammatory properties of STEMI patients among D1, D5 and D30, as well as with control subjects, we performed Kruskal Wallis tests, followed by Dunn-Sidak and Mann–Whitney tests. A p value of 0.05 or less was considered significant. SPSS v20 for MAC was used for the analyses.

3. Results

3.1. HDL vs. plasma pool of NO_x and FMD

According to [Table 1](#), there was no difference between tertiles of admission HDL-C for demographic data except that patients with high admission HDL-C levels (third tertile) were significantly older ($p = 0.01$), more frequently women ($p = 0.01$) and had a lower prevalence of smoking habit ($p = 0.044$) when comparing to first and second tertiles. For continuous variables with normal distribution (body mass index, waist circumference, HbA1c, blood glucose at admission, HOMA2S, SBP and DBP at admission, heart rate, CK-MB and troponin I peak, mean simvastatin dose during hospitalization, LV diastolic diameter, and LV ejection fraction) we performed both an ANOVA model and a sex- and age-adjusted ANCOVA model, but there was no difference among HDL-C tertiles for these variables in both models. Plasma CRP at admission was not different between groups, although at D5 patients with low HDL-C presented lower CRP levels as compared with the other tertiles ($p = 0.010$). Also, the increment in CRP from D1 to D5 was higher among patients in the first tertile ($p = 0.001$) as compared to those with higher admission HDL-C levels.

Plasma NO_x at D1 was not significantly different between groups, but at D5 patients in the first HDL-C tertile presented higher plasma NO_x levels as compared with the other tertiles ($p = 0.023$). Indeed, the increase in NO_x from D1 to D5 was greater among patients in the first tertile ($p < 0.001$) as compared to those with higher admission HDL-C levels ([Table 1](#)). These findings remained significant even after adjustment for age, gender, statin use, reperfusion therapy, MI mass, sedentarity, and plasma CRP.

FMD was higher among patients in the first tertile for HDL-C as compared with second and third tertiles in an unadjusted analysis and even after adjustment for age, gender, statin use, reperfusion therapy, MI mass, sedentarity, and plasma CRP in ANCOVA models ([Table 1](#)). In order to increase statistical power we pooled the second and third tertiles and classified them as high HDL-C group. High HDL-C was positively associated with endothelial dysfunction ([Table 2](#)), defined as FMD below the median value, in an unadjusted binary logistic regression model (OR = 2.06; 95% CI 1.11–3.85; $p = 0.023$) and in a model adjusted for age and gender (OR = 2.01; 95% CI 1.04–3.86; $p = 0.037$). In a third model we added statin use, smoking habit, plasma CRP and sedentarity, and high HDL-C levels remained independently associated with endothelial dysfunction (OR = 2.42; 95% CI 1.07–5.50; $p = 0.034$). In order to address the potential mechanisms by which HDL-c levels at admission are negatively associated to endothelial function, we investigated the dynamic functional and phenotypic changes of HDL elicited by MI.

3.2. Functional and phenotypic changes of HDL throughout MI

As shown in [Table 3](#), healthy controls and MI patients were successfully matched for age and gender. However, the frequencies

Table 2
Binary logistic regression with FMD lower than median (<6.5%) as dependent variable.

Models	Odds ratio	95% C.I. for odds		p
		Lower	Upper	
Non-adjusted	2.06	1.11	3.85	0.023
Age and gender adjusted	2.01	1.06	3.86	0.037
Fully ^a adjusted	2.42	1.07	5.50	0.034

^a Statistically adjusted to age, gender statin use, smoking habit, plasma CRP and sedentarity.

Table 3
Characteristics of patients in HDL anti-oxidative and anti-inflammatory protocols.

	STEMI patients	Healthy controls	<i>p</i>
<i>n</i>	9	9	
Age, years	64.5 ± 10	60.5 ± 5	0.24
Male, %	78	67	0.58
Body mass index, Kg/m ²	25.1 ± 3	24.0 ± 2	0.27
Waist circumference, cm	96.0 ± 10	92.3 ± 9	0.10
Diabetes mellitus, %	0	0	1.00
HbA1c, %	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.1	0.98
Smoking habit, %	33	22	0.75
Sedentary, %	67	44	0.19
Hypertension, %	89	0	0.003
Prior MI, %	22	0	0.10
SBP at admission, mm Hg	135 ± 38	128 ± 10	0.34
DBP at admission, mm Hg	95 ± 20	82 ± 8	0.20
Heart rate at admission, bpm	67 ± 14	56 ± 11	0.15
GFR, mL/min/1.73 m ²	73 ± 22	82 ± 11	0.26
Killip class I, %	100	—	—
Mean simvastatin dose	41 ± 44	0	0.001
Baseline glycaemia, mg/dL	117 ± 21	97 ± 5	0.01
Baseline HDL-C, mg/dL	37.5 ± 13	41.8 ± 13	0.41
Baseline LDL-C, mg/dL	152 ± 48	80 ± 42	0.001
Baseline Triglycerides, mg/dL	112 ± 105	69 ± 31	0.01
Baseline CRP, mg/dL	0.56 ± 0.5	0.16 ± 0.1	0.10

Data presented as mean ± standard deviation for normally distributed variables and as median (25th – 75th percentile) for nonparametric data. MI: myocardial infarction; HbA1c: Glycosylated hemoglobin; SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure; GFR: Glomerular filtration rate; CRP: C-reactive protein.

of hypertension, use of statin, glycaemia, LDL-C, triglycerides and CRP levels were higher in the MI patients group.

Compared to healthy controls, MI patients presented at D1 smaller HDL particles size, fewer particle number, and lower content of free cholesterol, cholesteryl ester and ApoA-I (Table 4). From D1 to D5, HDL particle number, total mass, and size decreased. There was also a decreased in its content of cholesteryl ester and ApoA-I (Table 4). From D5 to D30, HDL particles recovered its total number per mL, mass, size, and its content of cholesteryl ester and ApoA-I.

As a control for the assessment of HDL anti-inflammatory activity, we first estimated TNF- α capacity of increasing VCAM-1 secretion by HUVEC cells without adding HDL. As expected, following the addition of TNF- α to the medium, HUVECs significantly increased VCAM-1 secretion by 2-fold as compared to baseline level (278 ± 29 vs. 538 ± 38 pg/mL; *p* < 0.001). In the presence of HDL from healthy individuals (409 ± 209 pg/mL),

however, we observed a 33% decrease of TNF- α -induced VCAM-1 production, which was comparable to the HDL obtained from MI patients at D1 (414 ± 170 pg/mL) and at D30 (430 ± 157 pg/mL) (Fig. 1). At D5, the inhibition of TNF- α -induced VCAM-1 production by HDL was significantly reduced (491 ± 133 pg/mL, *p* = 0.001) when compared to the HDL at D1, D30 and from controls.

According to Fig. 2, area under the curve (AUC) for fluorescence of CuSO₄-induced LDL oxidation was significantly attenuated by the co-incubation of HDL obtained either from healthy controls or from MI patients at D1, D5, and D30. AUC analysis was used as a measure of the cumulative increase in fluorescence throughout 24 h during incubation of isolated HDL and copper sulfate (with or without LDL), indicating a higher accumulation of dienes and oxidized radicals. At D1, HDL_{oxLDL} and HDL_{autox} were similar in controls and MI patients. At D5 both HDL_{oxLDL} and HDL_{autox} AUCs were significantly higher in comparison to controls, D1, and D30. There was no significant difference in HDL_{oxLDL} and HDL_{autox} AUCs between D30 and D1 or controls. The increment in HDL_{autox} from D1 to D5 was inversely correlated with FMD (*r* = -0.83; *p* = 0.004). The TBARS measured in HDL fraction at D1 (0.077 ± 0.07 vs. 0.127 ± 0.10 nmol/mL) and at D5 (0.105 ± 0.08 vs. 0.177 ± 0.17 nmol/mL) were higher in individuals with higher plasma levels of HDL-C.

4. Discussion

The findings of the present study indicated that during the acute phase of STEMI HDL particles undergo phenotypic and functional changes that reduce its anti-oxidant and anti-inflammatory properties. This decline of anti-oxidant activity and the gathering of oxidative stress products in HDL are both associated with the decrease in endothelial vasomotor function. Consistently, patients with higher HDL-C levels presented a lower increase in plasma NO_x levels during acute phase and lower FMD 30 days after STEMI.

In accordance to prior evidence, we found that HDL composition is altered and its anti-oxidant capacity is significantly impaired after STEMI. Indeed, during the first days after onset of STEMI symptoms we observed that HDL particle number, mass and size decrease along with its content of cholesteryl ester and apoA-I. Such uncoupling of apo A-I from HDL has been observed during acute stress and is consistent with accelerated catabolism [14,15]. During MI, the accelerated catabolism has been shown to occur as a product of increased cytokine levels, which inhibit apo A-I expression in the liver and promotes apo A-I replacement in HDL particles by serum amyloid A (SAA) [15]. Furthermore, apo A-I is highly susceptible to glycation and oxidative modifications that

Table 4
Physicochemical characteristics of HDL particles of patients in the first, 5th and 30th day after myocardial infarction and healthy controls.

	Healthy controls	MI day 1	MI day 5	MI day 30	<i>P</i>
Size (nm)	8.1 ± 0.2	7.62 ± 0.4	7.37 ± 0.4	7.50 ± 0.4	<0.001 ^{a,b,c,d,e}
Particle number (nmol/mL)	2.5 ± 0.4	2.04 ± 0.6	1.56 ± 1.4	2.04 ± 0.4	<0.05 ^{a,b,c,d,e}
Triglycerides (mg/dL)	7.9 ± 7.0	6.4 ± 3.2	7.1 ± 2.7	7.7 ± 3.1	0.62
Total cholesterol (mg/dL)	27.2 ± 9.0	17.6 ± 6.5	13.6 ± 5.0	15.1 ± 4.7	<0.05 ^{a,b,c}
Free cholesterol (mg/dL)	7.0 ± 1.9	3.6 ± 1.5	3.8 ± 2.9	2.7 ± 1.1	<0.001 ^{a,b,c}
Cholesteryl ester (mg/dL)	33.7 ± 16.2	23.5 ± 9.0	16.5 ± 8.5	20.7 ± 7.0	<0.01 ^{b,c}
Phospholipids (mg/dL)	16.4 ± 4.5	19.8 ± 4.5	16.0 ± 4.7	19.2 ± 4.7	0.15
ApoA-I (mg/dL)	63.7 ± 9.9	53.6 ± 21.1	38.8 ± 10.8	56.6 ± 9.2	<0.01 ^{b,d,e}
Total HDL mass (mg/dL)	128.7 ± 22.7	106.9 ± 31.9	82.1 ± 20.0	107.0 ± 20.7	<0.05 ^{b,c,d,e}

Data presented as mean ± standard deviation. Statistical analysis by Kruskal Wallis followed by Dunn-Sidak and Mann–Whitney. Particle number (nmol/mL) = total mass (ug/mL)/molecular mass (ug/mol). Lipid Mass = TG + FC + PL + CE and Total Mass = Lipid Mass + apoA-I.

^a Comparison between Control and MI Day 1;

^b Comparison between Control and MI Day 5;

^c Comparison between Control and MI Day 30;

^d Comparison between MI Day 1 and MI Day 5;

^e Comparison between MI Day 5 and MI Day 30.

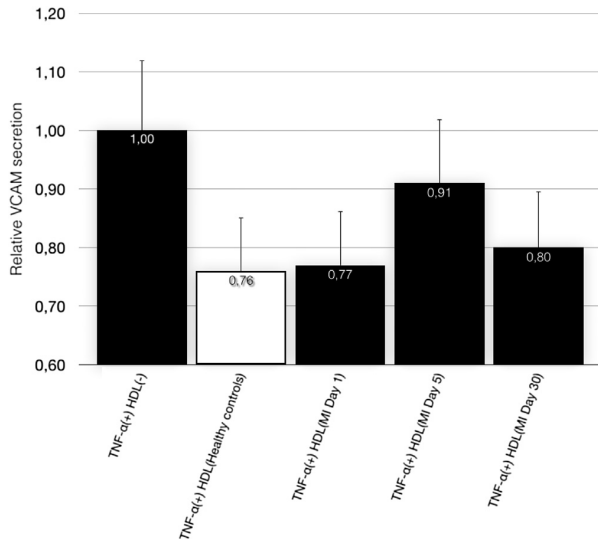


Fig. 1. HDL-induced inhibition (%) of VCAM-1 expression in HUVEC cells relative to positive controls [TNF α (+) HDL(-)], normalized to viable cell counts. Data are expressed as mean relative VCAM-1 expression \pm standard deviation. HDL from STEMI patients at D5 showed a significantly decreased capacity of preventing TNF α -induced VCAM-1 expression in comparison to HDL at D1 ($p = 0.001$). No statistic difference was observed between HDL from healthy subjects, from MI patients at D1 and at D30.

accelerate its clearance from the bloodstream and impair its functionality [5,16]. In parallel, the acute inflammatory burst has also been implicated in the induction of endothelial lipase, group II phospholipases and decrease of lecithin-cholesterol acyltransferase activity [14], thus leading to a decline of cholesteryl ester content in HDL. These catabolic changes may also explain the reduction of HDL size and particle number, which are usually accompanied by functional decline of HDL [7].

Still, we found that HDL becomes less protective against LDL oxidation and more prone to autooxidation during acute phase of STEMI and partially restores these properties 30 days after the coronary event. In another study, HDL from both patients with chronic coronary artery disease (CAD) and patients at <24 h after ACS were shown to display reduced PON-1 activity [3], as compared to healthy subjects. In our population, however, the HDL from patients at the first 24 h after STEMI showed a similar capacity of preventing LDL oxidation compared to healthy subjects, and a significant impairment of such function was found only at D5. In the first day after STEMI, inflammatory activity, as estimated by plasma CRP levels, is still comparable to that in healthy individuals; this may explain the equivalent HDL function in these two groups of individuals at that point. Furthermore, HDL anti-inflammatory activity is only impaired early after ACS when there are high levels of CRP levels [4].

Consistent to our observations, Patel et al. [17] showed that the anti-oxidative capacity of HDL is also reduced after ACS when compared to patients with chronic CAD and healthy individuals. In addition and also in line with our results, HDL₃ isolated from MI patients was more sensible to copper-mediated oxidation than the HDL₃ from CAD controls, suggesting the HDL auto-buffer system is weakened during MI [18]. Such intensified sensitivity to oxidation after STEMI has probably contributed to the amplified levels of TBARS into HDL from D1 to D5 we observed, increasing the formation of oxidized HDL particles in the bloodstream since TBARS estimates the degree of free radicals production and the intensity of lipid oxidation in HDL.

Although the magnitude of generation of oxidized HDL particles has been associated with systemic oxidative stress [2,19], prior to the present study there was no data associating plasma levels of HDL-C to oxidized HDL after acute phase inflammatory response. Indeed, according to our results, higher levels of HDL-C at the first 24 h after STEMI were associated with more intense gathering of TBARS into HDL. As a limitation, TBARS characterizes not only the presence of oxidation metabolites but also glycation and nitrosylation products [20]. However, all of these negative processes have been described as drivers of HDL dysfunction during acute phase responses [11]. Therefore, although TBARS are not specific for oxidative modifications of HDL, it may also measure a combination of metabolites that are associated with impaired HDL function.

Since HDL shows a high susceptibility to lipid peroxidative modifications after oxidative stimuli [19,21,22], it becomes plausible that higher volume of HDL particles and enhanced cholesterol content contribute to increased availability of substrates to oxidative changes. Oxidized HDL particles accumulate not only phospholipid hydroperoxides but also F₂-isoprostane and cholesteryl ester hydroperoxides [19,21,22]. In fact, the F₂-isoprostane content in each HDL subfraction has been shown to be very proportional to its total cholesterol content [19]. With this, we can hypothesize that higher HDL-C levels during STEMI may favor the generation of enhanced oxidized and dysfunctional HDL particles that can further contribute to endothelial dysfunction.

We observed that high HDL-C levels at D1 were associated with lower FMD and lower plasma NO bioavailability after STEMI, even adjusting for multiple covariates. Although nitroglycerin administered during the first hours of STEMI treatment would influence plasma NO_x levels measurement at D1, the doses of such drugs were not different across HDL-C tertiles. Of note, at D5 when more than 48 h had passed since the nitroglycerin withdrawal, NO_x was inversely associated to HDL-C. FMD was measured at D30 to avoid endothelial stunning [23,24], but equally to eliminate potential confounders such as acute phase treatments and to assess the residual endothelial dysfunction after STEMI. The study indicates that the bioavailability of HDL particles in the acute phase and the degree of modification, as estimated by TBARS, favor the persistence of endothelial vasomotor dysfunction after STEMI. Consistently, the increment in HDL vulnerability to autooxidation was inversely correlated with FMD.

While the negative relation between HDL during STEMI and endothelial dysfunction is somehow unexpected, they are in line with others and ours *in vitro* observations. Besler et al. [3] demonstrated that HDL from patients in the first 24 h after ACS presented lower PON-1 activity and contributed to increased endothelial VCAM-1 expression and decreased NO production by means of an oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)-dependent pathway. Indeed, we observed that VCAM-1 secretion by HUVECs is also inhibited when co-cultured with HDL from healthy individuals, but this capacity is impaired at D5 after STEMI. Increased VCAM-1 secretion by endothelial cells is strongly correlated with VCAM-1 expression in cell cultures [25,26], and its levels increase more rapidly during acute inflammatory response [26].

The findings of the present study are coherent with recent evidence that demonstrated heterogeneity of the predictive value of HDL-C between healthy individuals and those with chronic CAD or ACS. In fact, HDL-C is a predictor of long-term mortality in healthy individuals but not in individuals presenting with ACS [27]. In addition, among patients with elevated CRP levels after MI, those with higher HDL-C are at the highest risk for recurrent cardiovascular events [28].

Some limitations must be considered in our study. First of all, upstream inflammatory markers, such as plasma interleukin-6, were not measured during STEMI, which may lead to

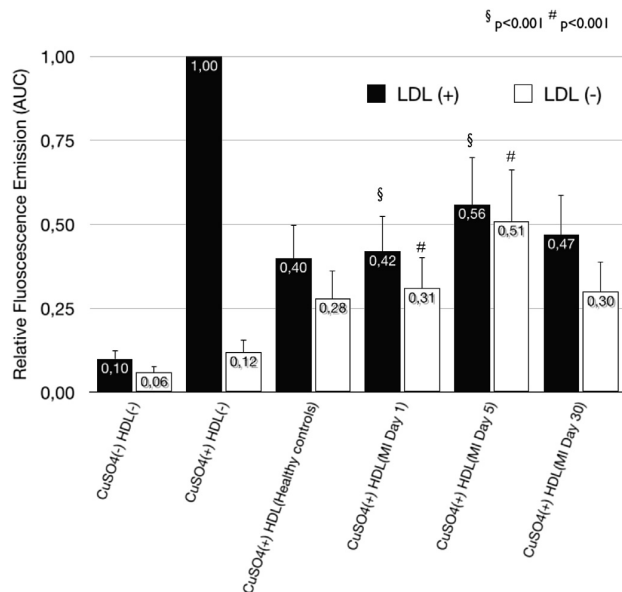


Fig. 2. Area under the curve (AUC) for copper sulfate (CuSO₄)-induced LDL oxidation in the presence of isolated HDL (LDL+) and CuSO₄-induced HDL oxidation (LDL-), relative to positive control curve (LDL + CuSO₄). Data are expressed as mean relative fluorescence emission during 24 h after incubation \pm standard deviation. The AUC for cumulative fluorescence emission was reduced after co-incubation with HDL from healthy volunteers (-24% ; $p = 0.009$), from MI patients at D1 (-23% ; $p = 0.015$) and D30 (-22% ; $p = 0.042$), but not from patients at D5 ($p = 0.28$).

underestimating peak inflammatory activity. Secondly, the time delay between symptoms onset and the first blood draw (≈ 15 h) could possibly favor alterations in CRP levels and HDL features and consequently reduce the change between D1 and D5. Nevertheless, HDL-C levels and CRP levels are not expected to be significantly modified up to 48 h after MI symptoms onset [15].

In conclusion, our results suggest that HDL-C levels at admission after STEMI is associated with impaired FMD and NO_x bioavailability. In addition, this study indicates that STEMI elicits dynamic structural and functional changes in HDL that may underlie the positive association between HDL-C with endothelial dysfunction. These changes include decreased apo A-I content, impaired antioxidant and anti-inflammatory capacity as well as enhanced sensitivity of oxidation and increased gathering of TBARS. Such modifications critically contributed to increased HDL oxidation, which correlated with decreased endothelial function. These findings suggest that higher HDL-C levels during STEMI may favor the generation of a higher number of dysfunctional HDL particles and, thus, induce remote endothelial dysfunction in the brachial artery. In addition, these findings support the concept that in conditions such as STEMI the increase of HDL concentration in the bloodstream may not be sufficient to protect and may even aggravate cardiovascular disease if the particles bear dysfunctional phenotypes.

Author contributions

L.S.F.C conducted data analyses and prepared the manuscript. N.B.P. and L.S.F.C. performed biochemical analysis and *in vitro* experiments. S.N.S. performed brachial artery ultrasound tests. J.M.A. conducted data analyses regarding CMRI. R.G.P.M., J.C.Q.S., E.C.F. and A.C.S. reviewed the manuscript. A.C.S. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and

takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Source of funding

L. S. F. Carvalho was supported by a doctoral grant from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes). A. C. Sposito, W. Nadruz-Jr and Eliana C. Faria were supported by a fellowship grant of productivity in research from the Brazilian National Research Council (CNPq).

Disclosures

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors had full access to the data and take responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.103>.

References

- [1] D.J. Rader, Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies, *J. Clin. Invest* 116 (12) (2006) 3090–3100.
- [2] A. Kontush, M.J. Chapman, Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities, *Curr. Opin. Lipidol.* 21 (4) (2010) 312–318.
- [3] C. Besler, K. Heinrich, L. Rohrer, C. Doerries, M. Riwanoto, D.M. Shih, A. Chroni, K. Yonekawa, S. Stein, N. Schaefer, M. Mueller, A. Akhmedov, G. Daniil, C. Manes, C. Templin, C. Wyss, W. Maier, F.C. Tanner, C.M. Matter, R. Corti, C. Furlong, A.J. Lusis, A. von Eckardstein, A.M. Fogelman, T.F. Luscher, U. Landmesser, Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease, *J. Clin. Invest* 121 (7) (2011) 2693–2708.
- [4] M. Gomasarshi, A. Ossoli, E. Favari, M.P. Adorni, G. Sinagra, L. Cattin, F. Veglia, F. Bernini, G. Franceschini, L. Calabresi, Inflammation impairs eNOS activation by HDL in patients with acute coronary syndrome, *Cardiovasc. Res.* 100 (1) (2013) 36–43.
- [5] L. Zheng, B. Nukuna, M.L. Brennan, M. Sun, M. Goormastic, M. Settle, D. Schmitt, X. Fu, L. Thomson, P.L. Fox, H. Ischiropoulos, J.D. Smith, M. Kinter, S.L. Hazen, Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease, *J. Clin. Invest* 114 (4) (2004) 529–541.
- [6] A. Artl, G. Marsche, S. Lestavel, W. Sattler, E. Malle, Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (3) (2000) 763–772.
- [7] A. Kontush, M.J. Chapman, Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis, *Pharmacol. Rev.* 58 (3) (2006) 342–374.
- [8] A.J. Flammer, T. Anderson, D.S. Celermaier, M.A. Creager, J. Deanfield, P. Ganz, N.M. Hamburg, T.F. Luscher, M. Shechter, S. Taddei, J.A. Vita, A. Lerman, The assessment of endothelial function: from research into clinical practice, *Circulation* 126 (6) (2012) 753–767.
- [9] J.C. Quinaglia e Silva, D.B. Munhoz, T.N. Morato, A. Gurgel, A.C. Macedo, P. Sever, A.C. Sposito, Brasilia Heart Study G, Effect of beta blockers (metoprolol or propranolol) on effect of simvastatin in lowering C-reactive protein in acute myocardial infarction, *Am. J. Cardiol.* 103 (4) (2009) 461–463.
- [10] M.J. Chapman, S. Goldstein, D. Lagrange, P.M. Laplaud, A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum, *J. Lipid Res.* 22 (2) (1981) 339–358.
- [11] J.M. Huang, Z.X. Huang, W. Zhu, Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein, *Clin. Biochem.* 31 (7) (1998) 537–543.
- [12] R.B. Bendel, A. Afifi, Comparison of stopping rules in forward regression, *J. Am. Stat. Assoc.* 72 (1977) 46–53.
- [13] J. Mickey, S. Greenland, A study of the impact of confounder-selection criteria on effect estimation, *Am. J. Epidemiol.* 129 (1989) 125–137.
- [14] A. Jahangiri, M.C. de Beer, V. Noffsinger, L.R. Tannock, C. Ramaiah, N.R. Webb, D.R. van der Westhuyzen, F.C. de Beer, HDL remodeling during the acute phase response, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2) (2009) 261–267.

- [15] W. Khovidhunkit, M.S. Kim, R.A. Memon, J.K. Shigenaga, A.H. Moser, K.R. Feingold, C. Grunfeld, Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host, *J. Lipid Res.* 45 (7) (2004) 1169–1196.
- [16] A. Undurti, Y. Huang, J.A. Lupica, J.D. Smith, J.A. DiDonato, S.L. Hazen, Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle, *J. Biol. Chem.* 284 (45) (2009) 30825–30835.
- [17] P.J. Patel, A.V. Khera, K. Jafri, R.L. Wilensky, D.J. Rader, The anti-oxidative capacity of high-density lipoprotein is reduced in acute coronary syndrome but not in stable coronary artery disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 58 (20) (2011) 2068–2075.
- [18] K.H. Cho, D.G. Shin, S.H. Baek, J.R. Kim, Myocardial infarction patients show altered lipoprotein properties and functions when compared with stable angina pectoris patients, *Exp. Mol. Med.* 41 (2) (2009) 67–76.
- [19] J.M. Proudfoot, A.E. Barden, W.M. Loke, K.D. Croft, I.B. Puddey, T.A. Mori, HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes, *J. Lipid Res.* 50 (4) (2009) 716–722.
- [20] E.A. Meagher, G.A. FitzGerald, Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (12) (2000) 1745–1750.
- [21] V.W. Bowry, K.K. Stanley, R. Stocker, High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89 (21) (1992) 10316–10320.
- [22] T. Matsunaga, S. Hokari, I. Koyama, T. Harada, T. Komoda, NF-kappa B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 (1) (2003) 313–319.
- [23] K. Bhagat, Endothelial function and myocardial infarction, *Cardiovasc Res.* 39 (2) (1998) 312–317.
- [24] A. Mizuno, R. Baretta, G.D. Buckberg, H.H. Young, J. Vinten-Johansen, X.L. Ma, L.J. Ignarro, Endothelial stunning and myocyte recovery after reperfusion of jeopardized muscle: a role of L-arginine blood cardioplegia, *J. Thorac. Cardiovasc Surg.* 113 (2) (1997) 379–389.
- [25] A.M. Schmidt, O. Hori, J.X. Chen, J.F. Li, J. Crandall, J. Zhang, R. Cao, S.D. Yan, J. Brett, D. Stern, Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes, *J. Clin. Invest* 96 (3) (1995) 1395–1403.
- [26] M. Otsuki, K. Hashimoto, Y. Morimoto, T. Kishimoto, S. Kasayama, Circulating vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in atherosclerotic NIDDM patients, *Diabetes* 46 (12) (1997) 2096–2101.
- [27] G. Silbernagel, B. Schottker, S. Appelbaum, H. Scharnagl, M.E. Kleber, T.B. Grammer, A. Ritsch, U. Mons, B. Holleczeck, G. Goliash, A. Niessner, B.O. Boehm, R.B. Schnabel, H. Brenner, S. Blankenberg, U. Landmesser, W. März, High-density lipoprotein cholesterol, coronary artery disease, and cardiovascular mortality, *Eur. Heart J.* (2013).
- [28] J.P. Corsetti, D. Ryan, D.L. Rainwater, A.J. Moss, W. Zareba, C.E. Sparks, Cholesteryl ester transfer protein polymorphism (Ta1B) associates with risk in postinfarction patients with high C-reactive protein and high-density lipoprotein cholesterol levels, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (8) (2010) 1657–1664.



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Elevated CETP activity during acute phase of myocardial infarction is independently associated with endothelial dysfunction and adverse clinical outcome

Luiz Sergio F. Carvalho^a, Vitor W.M. Virginio^{a, b}, Natalia B. Panzoldo^{a, b}, Valeria N. Figueiredo^a, Simone N. Santos^a, Rodrigo G.P. Modolo^a, Joalbo M. Andrade^c, Jose C. Quinaglia e Silva^d, Wilson Nadruz-Junior^a, Eliana C. de Faria^b, Andrei C. Sposito^{a, *}, on behalf of the Brasilia Heart Study Group

^a Cardiology Division, State University of Campinas School of Medicine (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

^b Lipids Laboratory, State University of Campinas School of Medicine (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

^c University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^d Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS), Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2014

Received in revised form

13 October 2014

Accepted 28 October 2014

Available online 4 November 2014

Keywords:

CETP

Myocardial infarction

Endothelial dysfunction

Inflammation

Oxidized HDL

ABSTRACT

Objective: Recent data suggests that cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity may interact with acute stress conditions via inflammatory-oxidative response and thrombogenesis. We investigated this assumption in patients with ST-elevation myocardial infarction (STEMI). **Methods:** Consecutive patients with STEMI ($n = 116$) were enrolled <24-h of symptoms onset and were followed for 180 days. Plasma levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor (TNF α), 8-isoprostane, nitric oxide (NO $_x$) and CETP activity were measured at enrollment (D1) and at fifth day (D5). Flow-mediated dilation (FMD) was assessed by ultrasound and coronary thrombus burden (CTB) was evaluated by angiography. **Results:** Neither baseline nor the change of CETP activity from D1 to D5 was associated with CRP, IL-2, TNF α , 8-isoprostane levels or CTB. The rise in NO $_x$ from D1 to D5 was inferior [3.5(−1; 10) vs. 5.5(−1; 12); $p < 0.001$] and FMD was lower [5.9(5.5) vs. 9.6(6.6); $p = 0.047$] in patients with baseline CETP activity above the median value than in their counterparts. Oxidized HDL was measured by thio-barbituric acid reactive substances (TBARS) in isolated HDL particles and increased from D1 to D5, and remaining elevated at D30. The change in TBARS content in HDL was associated with CETP activity ($r = 0.72$; $p = 0.014$) and FMD ($r = -0.61$; $p = 0.046$). High CETP activity at admission was associated with the incidence of sudden death and recurrent MI at 30 days (OR 12.8; 95% CI 1.25–132; $p = 0.032$) and 180 days (OR 3.3; 95% CI 1.03–10.7; $p = 0.044$). **Conclusions:** An enhanced CETP activity during acute phase of STEMI is independently associated with endothelial dysfunction and adverse clinical outcome.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The cholesteryl ester transfer protein (CETP) has as its most explored role on cardiovascular disease the mediation of cholesteryl esters exchange for triglycerides between high-density lipoproteins (HDL) and lipoproteins containing apolipoprotein (apo) B. Recently, novel direct involvement of CETP in acute phase

inflammatory response [1] and thrombogenesis [2] have been revealed as other potential mechanisms to influence clinical outcomes.

In severe sepsis, in-hospital mortality was reported to be inversely related to CETP activity [3]. In transgenic animal models of sepsis, CETP mediates the transfer of circulating endotoxins to HDL, increasing their hepatic uptake and attenuating the systemic inflammatory response [1]. Hypothetically, such an effect may also be beneficial during acute phase myocardial infarction (MI), when oxidative-inflammatory response is a strong determinant of short and long-term mortality [4]. So far, however, data is unavailable to verify this assumption. In parallel, recent data also reveal a positive association between plasma CETP activity and activation of

* Corresponding author. Cardiology Division, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), 13084-971 Campinas, Sao Paulo, Brazil.
E-mail address: andreisposito@gmail.com (A.C. Sposito).

coagulation factors VII and XI [2]; both directly implicated in the incidence and recurrence of MI [5,6].

Thus, although an interaction between CETP and outcome after MI is plausible, it remains unclear whether its participation has a positive or negative impact. Hence, we prospectively evaluated the association between CETP activity and cardiovascular outcome in patients with ST-elevation MI (STEMI). In addition, we explored potential links between CETP activity and endothelial function, MI size, coronary thrombus burden and oxidative-inflammatory response.

2. Methods

2.1. Patients

Consecutive subjects ($n = 116$) who were enrolled into the ongoing *Brazilian Heart Study* (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02062554) [7] were selected for this investigation. Briefly, this is a prospective cohort with consecutive patients admitted with ST-segment elevation MI (STEMI). Inclusion criteria for the BHS are as follows: (i) less than 24 h after the onset of MI symptoms, (ii) ST-segment elevation of a least 1 mm (frontal plane) or 2 mm (horizontal plane) in two contiguous leads, and (iii) myocardial necrosis, as evidenced by an increase to at least one value above the 99th percentile above the reference limit of CK-MB (25 U/L) and troponin I (0.04 ng/mL) and followed by a decline of both.

A complete medical evaluation was performed upon hospital admission (D1) followed by an initial blood sample collection with a mean fasting time of 504 ± 231 min. A second, third and fourth samples were collected after a 12-h overnight fast at the third day (D3), fifth day (D5) of hospitalization and at the 30th day after MI (D30). The attending physicians decided medical treatment, including the type of reperfusion therapy, without the influence of the investigators team. In this context, patients underwent primary percutaneous coronary intervention (PCI) or tenecteplase treatment followed by PCI according to the current guidelines. The Institutional Ethics Committee approved the study, and all patients signed an informed consent.

2.2. Biochemical analysis

The following measurements were performed: glucose, cholesterol, triglycerides, HDL-C, high-sensitivity CRP and nitrate + nitrite (NO_x). LDL-C was calculated using the Friedewald formula. Additional data is available at the [Supplements section](#).

2.3. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity assay

The CETP activity was measured by an exogenous assay [8], using both exogenous HDL and LDL-VLDL particles. Additional data is available at the [Supplements section](#).

2.4. HDL isolation from plasma and detection of oxidized HDL particles

HDL was isolated from plasma collected at D1, D5 and D30 by density gradient ultra-centrifugation according to the method described by Chapman et al. [9] using solid potassium bromide for density adjustment. The degree of oxidation of HDL was estimated by the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The absorbance was measured at 535 nm and the TBARS content was estimated by a standard curve of 0–100 μM 1,1,3,3-tetramethoxypropane.

2.5. Coronary angiography

Coronary angiography was systematically performed in all enrolled patients. Additional data is available at the [Supplements section](#).

2.6. Brachial artery reactivity

All patients were studied at D30 (except in 6 who died and 2 who had non-fatal MI recurrence beforehand) in the fasting state, and vasoactive medications were withdrawn 24 h before the study. Additional data is available at the [Supplements section](#).

2.7. Cardiac magnetic resonance imaging

CMRI was performed on a 1.5-T GE CV/i System (Wakeusha, Wisconsin) in all the enrolled patients at D30. Additional data is available at the [Supplements section](#).

2.8. Follow-up

Before hospital discharge, patients received lifestyle counseling for diet, smoking cessation, regular physical activity and weight loss and a guideline-based medical prescription. After that, patients were followed-up in the BHS outpatient clinic with medical appointments every 30–45 days. Follow-up prescriptions included statins with the addition of ezetimibe when necessary (LDL-C goal of 70 mg/dL), angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for hypertension or reduced ejection fraction (<40%); glycemic control (HbA1c < 7%); clopidogrel 75 mg/day; aspirin 100 mg/day; and anti-ischemic therapy as required (propranolol and isosorbide dinitrate, alone or in combination). The physicians involved in the clinical follow-up were blinded to all analyses performed in the study.

2.9. Clinical endpoints

Clinical outcome was assessed at the outpatient clinic visit every 30 days. Patients who could not come for visits or relatives of deceased patients were contacted by telephone. Information about the causes of death and clinical events was obtained from death certificate or medical records. Major adverse cardiac events (MACE) were defined as: sudden cardiac death and recurrent MI. Sudden cardiac death was defined as a non-traumatic, unexpected event occurred within 6 h of symptom onset. Fatal MI refers to any death preceded by acute MI. New MI was defined as a documented hospital admission with symptoms consistent with acute MI and elevation of serum CK-MB and troponin I to at least one value above the 99th percentile above the reference limit in a temporal pattern consistent with acute myocardial injury. When a patient experienced >1 event, the first event was selected. Patients who died from non-cardiac causes were censored on the day of their deaths.

2.10. Statistical methods

Data are presented as mean \pm standard deviation for normally distributed data and as median (interquartile range) for non-parametric data. Patients were divided into two groups according to admission values of plasma CETP activity \leq or $>$ the median value (12%). Those with CETP activity above the median were classified as having higher CETP activity and those below the median were classified as having lower CETP activity. Chi-Square was used to compare categorical data and Student T or Wilcoxon rank sum test were used to compare baseline parametric and

nonparametric data, respectively. Analysis of covariance (ANCOVA) adjusted for sex, age, statin dose and plasma HDL-C and LDL-C at D1 was used to assess the effect of CETP on the variation of IL-2, TNF- α , CRP and 8-isoprostane plasma levels. Assumptions of the ANCOVA models (linearity, normality of distribution and equal variance) were checked using histograms, normal probability plots and residual scatter plots. FMD was log transformed in order to normalize the distribution and allow ANCOVA analysis. Binary logistic regression analyses were performed using as dependent variables FMD below the median value and the presence of MACE. These results are presented as odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI). Actuarial survival curves were analyzed by the Kaplan–Meier method and compared by the Log-Rank Mantel–Cox test. The Cox proportional hazards model was used to examine the association between CETP activity and time to MACE, where two pre-defined

Table 1
Clinical characteristics of enrolled patients.

	CETP activity at admission		p
	Below median	Above median	
Sample size	58	58	
Age, years	63.3 \pm 10	63.6 \pm 10	0.8
Male, %	80	66	0.12
BMI, Kg/m ²	26.7 \pm 4	26.3 \pm 3	0.6
Waist circumference, cm	96.8 \pm 11	94.0 \pm 11	0.2
DM, %	26	19	0.4
HbA1c, %	5.9(1.0)	5.9(0.5)	0.8
Hypertension, %	63	60	0.7
Prior MI or stroke, %	18	19	0.9
Smoking habit, %	51	49	0.7
Killip–Kimball class I, %	84	89	0.5
Killip–Kimball class III/IV, %	2	4	0.5
Symptom to door time, min	90(102)	87(95)	0.8
Door to needle time, min	39(55)	38(42)	0.8
Door to balloon time, min	61(89)	63(91)	0.9
Prevalence of cardio-pulmonary resuscitation, %	0	0	1.0
Culprit lesion (main artery or branches)			
LAD, %	44	37	0.19
RCA, %	25	35	
CxA, %	31	28	
Success rate of thrombolysis or coronary intervention, %	97	97	1.0
Pre-PCI Tenecteplase, %	65	60	0.6
Primary PCI, %	13	15	0.7
Success rate of thrombolysis or coronary intervention, %	97	97	1.0
Gensini angiographic score	123 \pm 74	110 \pm 48	0.17
Friensinger angiographic score	8.0 \pm 3.3	8.4 \pm 3.4	0.5
Thrombus at culprit coronary artery, %	25	29	0.69
Coronary thrombus grade \geq 3, %	22	24	0.46
Prior simvastatin use, %	8	4	0.3
In-hospital medications			
ARBs or ACEi, %	65	60	0.6
Beta-blocker use, %	51	52	0.9
Simvastatin use during hospitalization, %	86	76	0.2
Mean simvastatin dose during hospital stay, mg	43.3 \pm 27	37.6 \pm 28	0.3
Mean nitroglycerin dose in the first 24 h, mg	2.0 \pm 3	2.3 \pm 2	0.7
Discharge medications			
ARBs or ACEi, %	95	92	0.7
Beta-blockers, %	83	79	0.6
Calcium channel blockers, %	17	19	0.8
Nitrates, %	21	21	0.9
Simvastatin, %	100	100	1.0

CETP: cholesteryl ester transfer protein; BMI: body mass index; DM: diabetes mellitus; HbA1c: glycosylated hemoglobin; CKMB: creatine kinase-MB; ARBs: angiotensin receptor blockers; ACEi: angiotensin-converting enzyme inhibitors; PCI: percutaneous coronary intervention.

models were used [model 1: unadjusted; model 2: adjusted for sex, age]. Logistic regressions with the incidence of MACE in 30 days as dependent variable were adjusted for the following variable: admission killip class III/IV, presence of cardio-pulmonary resuscitation, culprit lesion and success rate of thrombolysis or coronary intervention. A two-sided *p*-value of 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS for Mac version 20.0.

Table 2
Laboratorial data of all included patients stratified by CETP activity.

	CETP activity at admission		p
	Below median	Above median	
CETP activity, %			
D1	6.8 \pm 3	17.4 \pm 4	<0.001
D3	7.0 \pm 4	12.5 \pm 4	0.017
D5	7.6 \pm 5	12.1 \pm 5	0.001
D30	9.9 \pm 4	16.9 \pm 5	0.011
Delta D1–D5	0.2(3)	–6.3(8)	<0.001
Non-HDL-C, mg/dL			
D1	157(54)	152(72)	0.63
D5	113(47)	122(41)	0.12
Delta	–38(41)	–32(53)	0.88
LDL-C, mg/dL			
D1	129(43)	136(60)	0.86
D5	91(39)	92(35)	0.78
Delta	–40(42)	–39(57)	0.92
HDL-C, mg/dL			
D1	38.5(14)	38.0(11)	0.61
D5	35.0(11)	33.0(9)	0.27
Delta	–4.0(7)	–5.0(13)	0.64
HDL size, nm			
D1	7.43 \pm 0.6	7.41 \pm 0.6	0.88
D5	7.97 \pm 0.8	7.95 \pm 0.9	0.95
D30	7.63 \pm 0.3	7.78 \pm 0.2	0.53
Triglycerides, mg/dL			
D1	134(108)	113(91)	0.13
D5	150(82)	134(64)	0.047
Delta	2.5(138)	12(61)	0.85
Glucose, mg/dL			
D1	122(44)	121(32)	0.61
D5	114(44)	103(45)	0.27
Delta, %	–4.5(37)	–11.0(34)	0.64
IL-2, ng/L			
D1	0.9(1.5)	0.5(1.7)	0.29
D5	4.7(4.0)	5.0(2)	0.56
Delta	3.8(5.4)	4.5(3.2)	0.78
TNF- α , ng/L			
D1	7.9(18)	3.0(13)	0.14
D5	21.2(25)	11.2(21)	0.078
Delta	8.6(22)	6.7(10)	0.51
CRP, mg/dL			
D1	0.81(1.6)	0.59(1.0)	0.16
D5	3.6(6.7)	3.8(7.3)	0.70
D30	1.03(1.2)	0.91(1.4)	0.75
Delta (D1–D5)	2.0(0.8)	2.9(5.6)	0.54
Delta (D1–D30)	0.2(0.8)	0.3(1.0)	0.94
8-isoprostane, pg/mL			
D1	31.5(29)	31.5(23)	0.67
D5	27.0(15)	26.0(14)	0.84
Delta	–3.0(35)	–2.0(33)	0.70
NO _x , μ Mol/L			
D1	17.2 (7)	18.2 (11)	0.52
D5	23.0 (14)	22.8 (10)	0.36
Delta	5.46 (12)	3.57 (13)	<0.001

ANCOVA, adjusted for sex, age and baseline levels; Data expressed as mean \pm SEM for parametric variables and expressed as median (Interquartile range) for non-parametric variables; CETP: Cholesteryl ester transfer protein; LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein; IL-2: interleukin-2; IL-10: interleukin-10; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; CRP: C-reactive protein; 8-isoprostane: 8-iso-F_{2x} prostaglandin; NO_x: Nitrate + Nitrite; D1: first 24 h; D3: third day; D5: fifth day; D30: thirtieth day after MI.

3. Results

3.1. Clinical and metabolic characteristics

As shown in Table 1, there was no significant difference between groups regarding clinical, anthropometric and treatment characteristics. No significant differences were found between groups at D1 or D5 for plasma glucose, triglycerides, HDL-C, LDL-C and non-HDL-C. Statin treatment was initiated at admission in 81% of the enrolled patients and at hospital discharge in 19%. There was no significant difference in statin dose or use of statins prior to the index STEMI.

3.2. CETP activity dynamics and changes in HDL-C size

CETP activity at D1 showed a weak but significant correlation to HDL-C levels ($R = -0.211$; $p = 0.014$). Mean plasma CETP activity decreased progressively from D1 ($15 \pm 9\%$) to D3 ($11 \pm 5\%$) and to D5 ($10 \pm 8\%$) and returned to baseline levels at D30 ($15 \pm 5\%$). Repeated measures analysis of variance showed a significant difference between days ($p = 0.037$), but at the Bonferroni post-hoc multiple comparison analysis the difference reached significance only between D1 and D5 ($p = 0.044$). Consistently with the changes in CETP activity, Mean HDL size increased from D1 (7.7 ± 0.4 nm) to D5 (8.8 ± 0.9 nm) and then returned to baseline value at the D30 after STEMI (7.8 ± 0.3 nm). Analysis of variance demonstrated a statistically significant difference between all days ($p = 0.0001$) and Bonferroni post-hoc test confirmed the significance of all pairwise comparisons ($p < 0.01$).

Patients with higher CETP activity at D1 experienced a decrease in CETP activity between D1 and D5, but they also stood with higher CETP activity in D5 when compared to low CETP group at D1. That has been a major reason for dichotomization of CETP activity, but CETP activity was also treated as a continuous variable to reinforce its relationship with FMD and TBARS in HDL by multiple approaches.

Table 3
MRI, Brachial reactivity and laboratorial data in patients who survived after 30 day.

	CETP activity at admission		<i>p</i>
	Below median	Above median	
Sample size	57	52	
Infarction mass by CMRI, g	12.0 ± 5.5	11.5 ± 5.3	0.8
LV diastolic diameter by CMRI, mm	50 ± 11	53 ± 13	0.76
LV ejection fraction by CMRI, %	52 ± 11	55 ± 17	0.46
FMD, %	9.6(5.6)	5.9(5.5)	0.047
IL-2, ng/L			
D1	0.92(1.7)	0.76(2.0)	0.92
D5	4.62(4.7)	5.83(2.6)	0.006
Delta	3.74(5.0)	4.50(3.5)	0.39
TNF- α , ng/L			
D1	7.53(19)	2.39(16)	0.010
D5	21.22(24)	18.33(28)	0.001
Delta	8.65(21)	8.56(16)	0.57
CRP, mg/dL			
D1	0.80(1.4)	0.78(1.2)	0.63
D5	3.30(5.4)	2.84(5.6)	0.25
D30	1.02(1.1)	0.95(1.0)	0.85
Delta (D1–D5)	1.86(6.0)	1.71(5.1)	0.37
Delta (D1–D30)	0.32(0.9)	0.22(1.2)	0.94
8-isoprostane, pg/mL			
D1	31.0(25)	30.1(27)	0.80
D5	26.8(20)	27.0(19)	0.90
Delta	-4.0(38)	-3.2(35)	0.61

CETP: cholesteryl ester transfer protein; CMRI: cardiac magnetic resonance imaging; FMD: flow-mediated dilation; LV: left ventricle; IL-2: interleukin-2; IL-10: interleukin-10; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; CRP: C-reactive protein; 8-isoprostane: 8-iso-F_{2 α} prostaglandin; D5: fifth day; D30: thirtieth day after MI.

3.3. Systemic inflammatory and oxidative stress biomarkers

As shown in Table 2, there was no difference in plasma CRP, IL-2, TNF- α or 8-isoprostane at D1 or D5 between patients with admission CETP activity above or below the median value. Likewise, the change in plasma CETP activity from D1 to D5 (Delta CETP) was not significantly associated with changes on these inflammatory or oxidative stress biomarkers between D1 to D5. These findings were confirmed when we compared only the patients who survived the in-hospital period and undergo the FMD and CMRI at D30 (Table 3).

3.4. Plasma pool of NO_x and flow-mediated dilation

Plasma NO_x at D1 was not significantly different between groups. However, the increment in NO_x from D1 to D5 was lower among patients with higher baseline CETP activity as compared to those with lower CETP activity (Table 2).

After the peak of inflammatory activity at D5, CRP returned to baseline levels at D30, when FMD was measured. FMD was lower among patients with enhanced admission CETP activity as compared with their counterpart even after adjustment for age, gender, statin use, sedentarity and plasma CRP (Table 2). Higher CETP activity was independently and inversely associated with endothelial function, as considered by categorical classification of FMD as lower or higher than the median value (6.5%) in a logistic regression model adjusting for age and gender (OR 3.08; 95% CI 1.01–9.37; $p = 0.048$). In a second model, statin use, plasma CRP and sedentarity were included, and CETP activity above the median remained independently associated with low FMD (OR 4.35; 95% CI 1.11–14.19; $p = 0.015$).

3.5. HDL oxidation

As shown in Fig. 1, TBARS levels of isolated HDL particles increased by 26% from admission to D5 and remained unaltered until the D30 (0.102 ± 0.03 ; 0.129 ± 0.03 and 0.131 ± 0.03 , respectively; $p = 0.006$). Indeed, the magnitude of change in TBARS levels between D1 and D5 was strongly correlated with both CETP

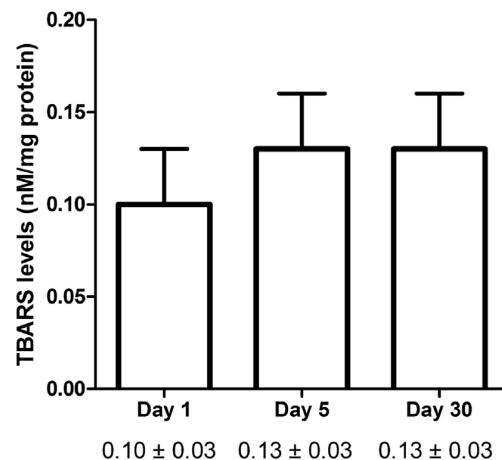


Fig. 1. TBARS accumulation in HDL particles, indicating HDL oxidation following STEMI. TBARS measured in triplicates in isolated HDL particles at D1, D5 and D30. Data are expressed as mean \pm standard deviation. There was a significant difference between D1 and D5 ($p = 0.025$) and between D1 and D30 ($p = 0.023$), but not between D5 and D30 ($p = 0.96$).

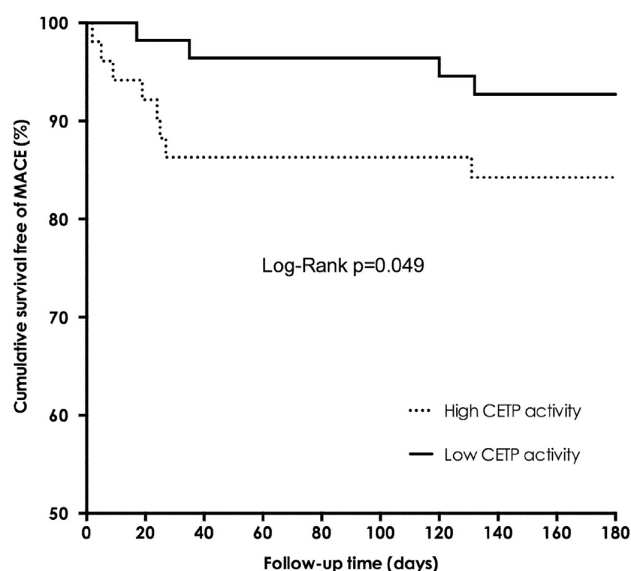


Fig. 2. Cumulative survival free from cardiovascular events in the first 180 days following STEMI. Kaplan–Meier curves for the incidence of MACE (sudden death and recurrent MI) in patients with CETP activity at admission below (low CETP activity) and above (high CETP activity) the median value.

activity at admission ($r = 0.72$; $p = 0.014$) and FMD ($r = -0.61$; $p = 0.046$).

3.6. CMRI and coronary angiography

As shown in Table 3, the MI size, diastolic diameter and ejection fraction of the left ventricle, as measured by CMRI, were equivalent in both groups. There was no difference in the severity of coronary artery disease, as estimated by the Friensinger or Gensini scores, between the groups. The presence and the grade of thrombus at the culprit coronary artery were similarly detected in both groups (Table 1).

3.7. Clinical outcomes

There was a mean follow-up time of 156 ± 53 days. During the first 30 days after STEMI there were 8 MACE, 6 cardiovascular deaths and 1 non-fatal recurrent MI occurred in patients with high CETP activity and 1 non-fatal MI in patients with low CETP activity. Both chi-square and actuarial analysis of time to MACE in 30 days demonstrated worse outcome for individuals with high CETP activity ($p = 0.036$ and $p = 0.036$, respectively). In a third model, adjusted to admission killip class III/IV, presence of cardio-pulmonary resuscitation, culprit lesion and success rate of thrombolysis or coronary intervention, high CETP group presented a higher risk for MACE with an odds ratio of 14.0 (95% CI 1.37–143; $p = 0.026$).

Fig. 2 depicts the Kaplan–Meier curve for survival free of MACE at 180 days after the STEMI for patients with CETP activity below or above the median value. At 180 days, there were 8 cardiovascular deaths and 2 non-fatal recurrent MI in patients with high CETP activity versus 1 cardiovascular death and 2 non-fatal MI in those with low CETP activity. In both follow-up periods of 90 and 180 days we found independent association between enhanced CETP activity and the incidence of MACE (OR 5.2; 95% CI 1.07–24.8; $p = 0.041$; and OR 3.3; 95% CI 1.03–10.7; $p = 0.044$), respectively (see Table 4).

Table 4

Cox-regression considering the incidence of cardiovascular events in 30, 90 and 180 days as dependent variables.

	Odds ratio	95% C.I. for odds		p
		Lower	Upper	
CETP higher than median vs MACE in 30 days				
Unadjusted	9.0	1.07	76	0.036
Sex and age adjusted	12.6	1.25	132	0.032
Fully adjusted model	14.0	1.37	143	0.026
CETP higher than median vs MACE in 90 days				
Unadjusted	4.7	1.01	22.2	0.049
Sex and age adjusted	5.2	1.07	24.8	0.041
CETP higher than median vs MACE in 180 days				
Unadjusted	3.0	1.01	9.5	0.049
Sex and age adjusted	3.3	1.03	10.7	0.044

MACE: major adverse cardiac events include sudden cardiac death, fatal and non-fatal myocardial infarction. Fully adjusted model included as covariates: admission Killip class III/IV, presence of cardio-pulmonary resuscitation, culprit lesion and success rate of thrombolysis or coronary intervention.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate in humans the course of CETP activity during MI and its clinical implications. Our main findings are: (i) there is a transient decline in CETP activity that is reversed in 30 days, (ii) high CETP activity at the first 24 h of MI onset is associated with enhanced levels of oxidized HDL, which persist up to D30 and is associated with endothelial dysfunction, and (iii) high CETP activity is associated with a higher incidence of MACE in 30, 90 and 180 days.

The decrease of CETP mass and activity has been shown as a product of acute phase response in animal models of sepsis [1] and of coronary artery ligation [10] and in humans after cardiac surgery [11]. This is the first description of the decline in CETP activity in patients during acute phase of MI. Although the precise mechanisms for this reduction in plasma CETP activity are not fully understood, some evidence indicates that liver production of CETP is reduced due to cytokine-induced decrease in hepatic LXR expression and activity [12,13]. LXR stimulation induces hepatic CETP and CRP synthesis and, by this way, increases plasma pool of both proteins [12,14]. In our study, however, CETP activity did not associate with plasma CRP or with the magnitude of the acute inflammatory response estimated either by plasma IL-2 or TNF- α . This may indicate the existence of other mechanisms for modulating CETP activity during acute stress.

It is noteworthy that the generation of oxidized HDL was higher in individuals bearing a high CETP activity. This finding suggests that although CETP activity may not be directly implicated in the generation of reactive oxygen species it may be involved in the transfer of oxidized lipids into HDL. This mechanism was in fact reported *in vitro*, where CETP, beyond its classical actions of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL or LDL, also mediated the transfer of both oxidized and non-oxidized forms of cholesteryl linoleate (Ch18:2) from LDL to HDL [15]. Throughout that, it becomes plausible that CETP activity can prolong the exposition of endothelial cells to oxidation products by transferring these acute stress oxidized lipids into HDL particles [16,17]. In line with this concept, while plasma 8-isoprostane was substantially reduced at D5, there was an increase of TBARS content on HDL particles from D1 to D5 that was persistently high at D30.

The retention in the bloodstream of oxidative stress products gathered into HDL may underlie the persistent endothelial dysfunction observed in our study at D30 in individuals with enhanced CETP activity. Indeed, CETP activity was directly associated with the accumulation of oxidative products in HDL and inversely associated with FMD. Consistently, it has been shown that

oxidized HDL activates Lecitin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor 1 (LOX-1) in the endothelial cells triggering Protein Kinase C β II and, by this way, inhibits Nitric Oxide Synthase activation and NO production [16,18].

In agreement with our findings, in a recent clinical trial, inhibition of CETP activity by dalcetrapib did not change systemic inflammatory activity in patients with chronic coronary disease or high cardiovascular risk [19]. In contrast with our study, however, they did not find any change in endothelial function. Although a low inhibitory effect of dalcetrapib on CETP cannot be excluded as an explanation, the availability of oxidized lipids to be transferred to HDL differs substantially between patients with MI and those with chronic stable coronary disease [20]. Finally, one cannot exclude the possibility that some of CETP's actions occur independently of lipids exchange, as CETP is expressed in several tissues including endothelial cells [21]. So far, however, there is no data indicating whether CETP arouses a direct endothelial pathway for triggering endothelial dysfunction after MI. It is also noteworthy that, in the dal-ACUTE [22] trial, dalcetrapib increased HDL cholesterol and apo A-I levels but did not reduce the risk of recurrent cardiovascular events in patients with recent acute coronary syndrome and had minor impact over cholesterol efflux. Furthermore, dal-ACUTE did not measure HDL anti-inflammatory or antioxidant functions and recruited patients at a late stage of the acute phase of ACS (after 7 days). Since HDL function after ACS is highly dependent on inflammatory activity [23] and inflammatory response as measured by CRP falls after the second/third day following MI [24], it is unlikely that CETP inhibition after 7 days would change HDL function.

As commented above, there is a growing body of evidence indicating CETP pro-thrombogenic effect [2]. In full contrast, we could not identify any excess intracoronary thrombus formation in high CETP group. Such divergence may be related to the reduced sensitivity of coronary angiography in detecting intravascular thrombus or may be due to chance. Further studies are required to verify more deeply this potential association.

The study was not designed and therefore sized to test hard clinical endpoints. In spite of that we observed a significant association between CETP activity and the incidence of MACE in 30, 90 and 180 days after STEMI. Even though the undersized sample size may both overestimate and underestimate the true magnitude of this interaction, this finding deserves credit by its consistency with biological processes potentially involved in post-MI outcome. Previous studies in MI patients have demonstrated the strong association between FMD obtained after MI and short and long-term incidence of MACE [25,26]. Thus, enhanced CETP activity during acute phase of MI may be considered among the players that favor such persistent endothelial dysfunction after MI.

In conclusion, this is the first study to describe the dynamic change in CETP activity during acute phase of STEMI in humans and its effects on HDL size and phenotype. Furthermore, to the best of our knowledge, this is also the first evidence that enhanced CETP activity is independently associated with endothelial dysfunction and recurrence of coronary events after MI. Conceivably, the decrease in CETP activity during acute stress may represent a short-term adaptive response, which may have a role in mitigating the damage resulting therefrom.

Author contributions

L.S.F.C collected outpatient data, conducted data analyses and prepared the manuscript. V.W.M.V. and N.B.P. performed biochemical analysis. S.N.S. performed brachial artery ultrasound experiments. R.G.P.M. researched data regarding angiographic analysis. J.M.A. conducted data analyses regarding CMRI. V.N.F.,

R.G.P.M., J.C.Q.S., W.N.J., E.C.F. and A.C.S. reviewed the manuscript. A.C.S. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Source of funding

L. S. F. Carvalho was supported by a doctoral grant from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes). A. C. Sposito, W. Nadruz-Jr and Eliana C. Faria were supported by a fellowship grant of productivity in research from the Brazilian National Research Council (CNPq).

Disclosures

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

L. S. F. Carvalho was supported by a doctoral grant from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes). V. N. Figueiredo was supported by a postdoctoral fellowship grant (no. 2012/18044-1) from the Foundation for Research Support of the State of São Paulo (Fapesp). A. C. Sposito was supported by a fellowship grant of productivity in research from the Brazilian National Research Council (CNPq) 308550/2010-2. The authors had full access to the data and take responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.104>.

References

- [1] P.M. Cazita, D.F. Barbeiro, A.I. Moretti, E.C. Quintao, F.G. Soriano, Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP, *Shock* 30 (5) (2008) 590–595.
- [2] H. Deguchi, J.A. Fernandez, J.H. Griffin, Plasma cholesteryl ester transfer protein and blood coagulability, *Thromb. Haemost.* 98 (6) (2007) 1160–1164.
- [3] C.M. Grion, L.T. Cardoso, T.F. Perazolo, A.S. Garcia, D.S. Barbosa, H.K. Morimoto, et al., Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients, *Eur. J. Clin. Invest.* 40 (4) (2010) 330–338.
- [4] N.G. Frangogiannis, C.W. Smith, M.L. Entman, The inflammatory response in myocardial infarction, *Cardiovasc. Res.* 53 (1) (2002) 31–47.
- [5] G. Campo, M. Valgimigli, P. Ferraresi, P. Malagutti, M. Baroni, C. Arcozzi, et al., Tissue factor and coagulation factor VII levels during acute myocardial infarction: association with genotype and adverse events, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (12) (2006) 2800–2806.
- [6] M.C. Minnema, R.J. Peters, R. de Winter, Y.P. Lubbers, S. Barzegar, K.A. Bauer, et al., Activation of clotting factors XI and IX in patients with acute myocardial infarction, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (11) (2000) 2489–2493.
- [7] A.C. Sposito, L.S. Carvalho, R.M. Cintra, A.L. Araujo, A.H. Ono, J.M. Andrade, et al., Rebound inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction after simvastatin withdrawal, *Atherosclerosis* 207 (1) (2009) 191–194.
- [8] L. Lagrost, Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP), *Methods Mol. Biol.* 110 (1998) 231–241.
- [9] M.J. Chapman, S. Goldstein, D. Lagrange, P.M. Laplaud, A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum, *J. Lipid Res.* 22 (2) (1981) 339–358.
- [10] D. Ye, A.O. Kraaijeveld, R.W. Grauss, S.M. Willems, L.C. van Vark-van der Zee, S.C. de Jager, et al., Reduced leucocyte cholesteryl ester transfer protein expression in acute coronary syndromes, *J. Intern. Med.* 264 (6) (2008) 571–585.
- [11] A. Jahangiri, M.C. de Beer, V. Noffsinger, L.R. Tannock, C. Ramaiah, N.R. Webb, et al., HDL remodeling during the acute phase response, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2) (2009) 261–267.

- [12] F. Blaschke, Y. Takata, E. Caglayan, A. Collins, P. Tontonoz, W.A. Hsueh, et al., A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor, *Circ. Res.* 99 (12) (2006) e88–99.
- [13] C. Fang, S. Yoon, N. Tindberg, H.A. Jarvelainen, K.O. Lindros, M. Ingelman-Sundberg, Hepatic expression of multiple acute phase proteins and down-regulation of nuclear receptors after acute endotoxin exposure, *Biochem. Pharmacol.* 67 (7) (2004) 1389–1397.
- [14] Y. Luo, A.R. Tall, Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element, *J. Clin. Investig.* 105 (4) (2000) 513–520.
- [15] J.K. Christison, K.A. Rye, R. Stocker, Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein, *J. Lipid Res.* 36 (9) (1995) 2017–2026.
- [16] T. Matsunaga, S. Hokari, I. Koyama, T. Harada, T. Komoda, NF-kappa B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 (1) (2003) 313–319.
- [17] H. Ohmura, Y. Watanabe, C. Hatsumi, H. Sato, H. Daida, H. Mokuno, et al., Possible role of high susceptibility of high-density lipoprotein to lipid peroxidative modification and oxidized high-density lipoprotein in genesis of coronary artery spasm, *Atherosclerosis* 142 (1) (1999) 179–184.
- [18] C. Besler, K. Heinrich, L. Rohrer, C. Doerries, M. Riwanto, D.M. Shih, et al., Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease, *J. Clin. Investig.* 121 (7) (2011) 2693–2708.
- [19] T.F. Luscher, S. Taddei, J.C. Kaski, J.W. Jukema, D. Kallend, T. Munzel, et al., Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: the dal-VESSEL randomized clinical trial, *Eur. Heart J.* 33 (7) (2012) 857–865.
- [20] S. Ehara, M. Ueda, T. Naruko, K. Haze, A. Itoh, M. Otsuka, et al., Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes, *Circulation* 103 (15) (2001) 1955–1960.
- [21] G.D. Norata, M. Ongari, P. Uboldi, F. Pellegatta, A.L. Catapano, Liver X receptor and retinoic X receptor agonists modulate the expression of genes involved in lipid metabolism in human endothelial cells, *Int. J. Mol. Med.* 16 (4) (2005) 717–722.
- [22] K.K. Ray, M. Ditmarsch, D. Kallend, E.J. Niesor, G. Suchankova, R. Upmanyu, et al., The effect of cholesteryl ester transfer protein inhibition on lipids, lipoproteins, and markers of HDL function after an acute coronary syndrome: the dal-ACUTE randomized trial, *Eur. Heart J.* 35 (27) (2014) 1792–1800.
- [23] M. Gomarachi, A. Ossoli, E. Favari, M.P. Adorni, G. Sinagra, L. Cattin, et al., Inflammation impairs eNOS activation by HDL in patients with acute coronary syndrome, *Cardiovasc. Res.* 100 (1) (2013) 36–43.
- [24] A.C. Sposito, S.N. Santos, E.C. de Faria, D.S. Abdalla, L.P. da Silva, A.A. Soares, et al., Timing and dose of statin therapy define its impact on inflammatory and endothelial responses during myocardial infarction, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (5) (2011) 1240–1246.
- [25] M. Guazzi, G. Reina, P. Gripari, G. Tumminello, M. Vicenzi, R. Arena, Prognostic value of flow-mediated dilatation following myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.* 132 (1) (2009) 45–50.
- [26] E.N. Karatzis, I. Ikonomidis, G.D. Vamvakou, T.G. Papaioannou, A.D. Protogerou, I. Andreadou, et al., Long-term prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery after acute coronary syndromes without ST elevation, *Am. J. Cardiol.* 98 (11) (2006) 1424–1428.

7 RESULTADOS COMPLEMENTARES E DISCUSSÃO

A disfunção endotelial que precede o infarto do miocárdio já foi largamente estudada, consistindo um importante fator prognóstico em curto e médio prazo (Karatzis, Ikonomidis et al. 2006, Guazzi, Reina et al. 2009). O impacto do estresse inflamatório e oxidativo do IM sobre o endotélio é suficientemente intenso e pode persistir até o sexto mês pós-IM, num fenômeno conhecido como “endotélio atordoado” (“*endothelial stunning*”) (Uren, Crake et al. 1994, Bhagat 1998), justificando ao menos em parte a maior taxa de progressão do volume de placas ateroscleróticas e a elevada recorrência de eventos nos primeiros meses após o IM índice. Entretanto, ainda persistem muitas lacunas entre os determinantes e os mecanismos da disfunção endotelial no IM.

As mudanças no metabolismo intravascular e funcionalidade da HDL compõem um eixo em evidência para compreensão da fisiopatologia do estresse inflamatório agudo e disfunção endotelial durante a fase aguda do infarto do miocárdio. No presente trabalho, foram estudados em humanos o impacto sobre a função endotelial de dois aspectos inéditos no metabolismo do HDL no pós-infarto do miocárdio: (i) as alterações morfológicas e funcionais da HDL; (ii) a atividade da CETP.

7.1 HDL DISFUNCIONAL E FUNÇÃO ENDOTELIAL NO IMCSST

As modificações estruturais e funcionais da HDL no estresse agudo já haviam sido descritas em modelos animais de isquemia-reperfusão miocárdica e em humanos pós-sepse e cirurgia cardíaca (Van Lenten, Hama et al. 1995, Pruzanski, Stefanski et al. 2000, Khovidhunkit, Kim et al. 2004). Em humanos nas primeiras 24 horas após síndromes coronarianas agudas, também já foram descritas mudanças na HDL que se relacionaram com mudanças na sinalização ativadora da eNOS em células endoteliais, induzindo redução na produção celular de óxido nítrico (Besler, Heinrich et al. 2011). O presente trabalho adiciona ainda que a perda funcional da HDL em termos de atividade anti-oxidante e anti-inflamatória pode ser mais tardia, e se reverte

ao menos parcialmente na evolução do IM. As mudanças funcionais observadas acompanharam também mudanças pronunciadas na composição química da HDL. O conteúdo de colesterol ester e de apo A-I, bem como massa total, tamanho e número de partículas de HDL diminuíram nos primeiros dias pós-IM. O desacoplamento de apo A-I das HDL já foi observado durante a reação de fase aguda e sugere que haja aumento no catabolismo da lipoproteína (Khovidhunkit, Kim et al. 2004, Jahangiri, de Beer et al. 2009). Durante o IM, o acelerado catabolismo foi demonstrado como produto do aumento no níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, às quais inibem a expressão de apo A-I no fígado e promove a troca entre apo A-I e amiloide sérico A (SAA) na HDL (Khovidhunkit, Kim et al. 2004). Além disso, apo A-I é altamente suscetível a glicosilação e modificações oxidativas que aceleram sua depuração do plasma e prejudicam sua função (Zheng, Nukuna et al. 2004, Undurti, Huang et al. 2009).

Em paralelo, o conteúdo de colesterol ester, o tamanho e o número de partículas de HDL se reduzem também como efeito da indução da lipase endotelial e de fosfolipases do grupo II, cuja atividade é diretamente proporcional à atividade inflamatória e contribuem para redução na atividade anti-oxidante da HDL (Kontush and Chapman 2006, Jahangiri, de Beer et al. 2009). A atividade da CETP também poderia influenciar os níveis plasmáticos e a composição de HDL uma vez que sua ação em coronariopatas crônicos enriquece a HDL em triglicérides e lípidos oxidados. Dados publicados no segundo artigo da presente Tese mostraram que uma maior atividade de CETP na fase aguda do IM se correlaciona diretamente aumento dos níveis de TBARS na HDL ($r=0.72$; $p=0.014$). Sabendo-se que a atividade de CETP pode aumentar indistintamente frações oxidadas e não oxidadas de colesterol ester na HDL (Christison, Rye et al. 1995), o presente achado sugere que uma exacerbada ação da CETP deve contribuir para uma partícula de HDL com maior conteúdo de lípidos oxidados durante o estresse agudo.

Acompanhando tais mudanças, a HDL se torna menos capaz de proteger a LDL contra a oxidação e mais sujeita a auto-oxidação no quinto dia após o IM, recuperando ao menos parcialmente tais funções no trigésimo dia. No primeiro dia do IM, entretanto, não apenas a atividade antioxidante mas também a atividade antiinflamatória da HDL foi semelhante aos indivíduos saudáveis. Esse dado é compatível o conceito derivado de resultados prévios do nosso laboratório e de outros grupos. A atividade inflamatória, medida pela proteína C reativa (PCR), IL-2 e TNF- α , atinge seu pico após 48-72h dos sintomas do IM, de forma que nas primeiras 24h os níveis de citocinas e PCR são comparáveis a pacientes com doenças crônicas. No quinto dia,

como verificado no Anexo B, a atividade inflamatória ainda encontra-se próxima ao seu pico. Recentemente, Gomaschi et al. (Gomaschi, Ossoli et al. 2013) demonstrou que a perda funcional da HDL medida pela sua atividade antiinflamatória e sua capacidade de ativar eNOS somente está presente nos primeiros dias após síndromes coronarianas agudas em pacientes com elevada atividade inflamatória. Desta forma, é provável que a elevada sensibilidade a oxidação da HDL que observamos após o pico de atividade inflamatória no IMCSST tenha contribuído para níveis os níveis crescentes de TBARS na HDL entre o D1 e o D5, o que deve se traduzir em aumento na formação de partículas de HDL oxidadas no plasma.

Observamos ainda que os pacientes com maiores níveis de HDL-C no plasma nas primeiras 24h após o IMCSST apresentaram maior concentração de TBARS na HDL. Como a HDL apresenta maior suscetibilidade a peroxidação lipídica após estímulo pró-oxidante, torna-se plausível que um maior volume de partículas de HDL e maior conteúdo de colesterol contribuam para uma maior disponibilidade de substratos para oxidação. Na verdade, já foi corroborado que a concentração de isoprostana (prostaglandina 8-iso-F_{2α}) está proporcionalmente relacionada ao conteúdo de colesterol na HDL (Proudfoot, Barden et al. 2009). Embora o presente trabalho não tenha desenho com as características necessárias para confirmar, a hipótese é de que níveis mais elevados de HDL-C durante o IMCSST favoreçam a formação de um HDL mais oxidados e disfuncional, o que deve contribuir para o achado de disfunção endotelial nos pacientes com elevado HDL-C.

De fato, a biodisponibilidade de óxido nítrico, que habitualmente se eleva entre o D1 e o D5, apresentou maior elevação nos pacientes com HDL-c no primeiro tercil em comparação com os pacientes com maiores níveis de HDL-c. Ao mesmo tempo a dilatação fluxo-mediada (FMD), um marcador de disfunção endotelial vasomotora, apresentou-se menor nos pacientes no segundo e terceiro tercis de HDL-C. A FMD foi medida no D30 com o objetivo de eliminar potenciais fatores de confusão como o tratamento da fase aguda (incluindo o uso de nitratos, nitroglicerina, beta-bloqueadores e outros) e para avaliar o grau de disfunção endotelial residual após o IMCSST. Suportando a hipótese do presente estudo, observamos que o aumento na vulnerabilidade da HDL à auto-oxidação foi inversamente correlacionada com a FMD, com $r=-0.83$ e $p=0.004$ (Anexo C). Por outro lado, a maior crítica a tal achado situa-se no pequeno tamanho amostral para esta análise, de sorte que estudos ulteriores serão necessário para confirmar os presentes resultados.

Para as análises que levaram em conta o HDL-C e a atividade de CETP como variáveis categóricas, os pacientes foram divididos em tercios ou pela mediana com o objetivo de evitar testes para variáveis de distribuição não-paramétrica, mas mantendo uma relação ordinal entre os grupos. Após as análises de histogramas, boxplots e os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, concluímos que HDL-C e atividade de CETP no D1 são variáveis não paramétricas (Anexo D). Embora tal análise possa incorrer em erros sistemáticos, uma vez que os pontos de corte ideal não se encontram necessariamente no centro da distribuição, os grupos tendem a ter tamanhos semelhantes e cada um deles conta com mais de 50 indivíduos. O tamanho da amostra foi estimado em ao menos 38 pacientes em cada braço (cada tercil). Entretanto, devido à natureza exploratória desta análise e contando ainda com as perdas no seguimento, o tamanho amostral foi estabelecido em 180 pacientes, sendo cerca de 60 pacientes em cada tercil. Apesar do estudo de referência ter incluído pacientes saudáveis, este foi o trabalho com maior tamanho amostral encontrado que envolveu a relação entre HDL-C e FMD. No que diz respeito ao tamanho amostral dos estudos funcionais da HDL, utilizamos como base o estudo de Besler et al (Besler, Heinrich et al. 2011).

Apesar da relação negativa entre HDL e disfunção endotelial no IMCSST ser de alguma forma inesperada, elas estão de acordo com nossos resultados *in vitro*, bem como apontam na mesma direção de outros autores. Besler et al demonstrou que a HDL de pacientes nas primeiras 24 horas após SCA apresentam menor atividade de PON-1, o que contribui para uma maior expressão de VCAM-1 e menor produção de óxido nítrico (Besler, Heinrich et al. 2011). No presente estudo, a secreção de VCAM-1 foi inibida na presença de HDL de indivíduos saudáveis, mas esta habilidade foi perdida no D5 após o IMCSST. Nas primeiras 24 horas, entretanto, e diferentemente dos resultados reportados por Besler et al, a HDL apresentou capacidade de inibir a secreção de VCAM-1 semelhante aos indivíduos saudáveis. A similaridade entre as respostas da HDL de indivíduos saudáveis e de pacientes no D1 após o IMCSST provavelmente se deve a atividade inflamatória ainda em níveis comparáveis entre os dois grupos (vide tabela 2 do artigo correspondente).

Em conclusão, os presentes resultados sugerem que os níveis de HDL-C na admissão após o IMCSST está associado a menor FMD e biodisponibilidade de óxido nítrico. Além disso, o estudo aponta que o IMCSST induz mudanças estruturais e funcionais dinâmicas na HDL que podem explicar a associação positiva entre HDL-C e disfunção endotelial nesse grupo de

pacientes. Tais mudanças incluíram redução no conteúdo de apo A-I, menor capacidade antioxidante e antiinflamatória, bem como aumento em sua sensibilidade à oxidação e aumento do conteúdo de TBARS. Essa transformação contribuiu para o aumento na oxidação da HDL, o que se correlacionou com uma pior função endotelial vasomotora. Em conjunto, tais achados sugerem que níveis elevados de HDL-C durante o IMCSST favorece a produção de uma maior quantidade de partículas de HDL disfuncionais.

7.2 ATIVIDADE DA CETP E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NO IMCSST

No segundo artigo da presente Tese estudamos a relação entre a atividade de CETP, uma importante via modificadora das propriedades da HDL, e a evolução clínica pós IMCSST. Em paralelo, investigamos a associação entre atividade de CETP e disfunção endotelial, um potencial mecanismo para justificar a associação entre CETP e incidência de eventos cardiovasculares. Desta forma, nossos principais achados foram: (i) ocorre queda transitória na atividade da CETP nos primeiros dias do IM, o que é revertido em 30 dias; (ii) elevada atividade de CETP nas primeiras 24 horas do IM está associada a maiores níveis de HDL oxidada, que persiste até o D30 e se associa a disfunção endotelial; (iii) elevada atividade de CETP está associada a maior incidência de MACE em 30, 90 e 180 dias.

A queda da massa e da atividade de CETP já foi descrita como produto da reação de fase aguda em modelos animais de sepse (Cazita, Barbeiro et al. 2008) e ligadura de artéria coronária (Ye, Kraaijeveld et al. 2008) e, em humanos, ocorre após cirurgia cardíaca (Jahangiri, de Beer et al. 2009). Esta é a primeira descrição do declínio da atividade de CETP na fase aguda do IM em humanos, conforme demonstrado na tabela 2 do artigo correspondente. Nas primeiras 24h, existe uma dispersão muito maior da atividade de CETP, enquanto no 3º e 5º dias a dispersão é consideravelmente menor (Anexo E). Numa análise complementar, verificamos que os pacientes com menor tempo entre os sintomas e a coleta de plasma (<10 horas) no dia da admissão apresentavam atividade de CETP mais elevada comparado com aqueles com tempo entre 10 e 23h ($16.32 \pm 4.5\%$ vs $11.04 \pm 6.0\%$; $p=0.008$). Dessa forma é possível que haja uma queda abrupta da atividade de CETP nas primeiras 10 horas do IM, que se intensifica nos dias

seguintes. Apesar disso, o tempo entre os sintomas e a terapia de reperfusão não foi diferente entre os grupos segregados pela mediana da atividade de CETP à admissão.

No Anexo F, mostramos que os pacientes com maior atividade de CETP nas primeiras 24 horas são aqueles que apresentam maior redução da atividade entre D1 e D5, com $r=-0.52$ ($p<0.001$), porém a maioria dos pacientes com atividade de CETP acima da mediana permanece com atividade mais elevada no D5. Noutra regressão linear, observamos que existe forte correlação entre a atividade de CETP no D1 e a média da CETP entre o D1 e o D5, com $r=0.88$ ($p<0.001$) (Anexo G). Assim, os pacientes com elevada atividade de CETP no D1 apresentaram também maior atividade no D3 e no D5. Embora as análises do presente trabalho pudessem ter também usado a variação da atividade de CETP entre D1 e D5 (delta CETP D1/5) como variável dependente para análises de desfechos, haveria sobreposição de grupos (grupo com maior atividade de CETP no D1 e aquele com maior redução de CETP entre D1 e D5) e estaria sujeita a uma quantidade maior de determinantes desconhecidos. Como o objetivo essencial foi de avaliar o impacto da atividade de CETP, o delta CETP D1/5 se mostraria pouco relevante.

O mecanismo preciso para a redução da atividade de CETP como produto da reação de fase aguda, entretanto, não está estabelecido. Escassas evidências apontam para o papel do *liver X receptor* (LXR) como indutor da síntese tanto da CETP como de PCR em hepatócitos (Fang, Yoon et al. 2004, Blaschke, Takata et al. 2006). Em havendo também descrição da inibição da expressão hepática e atividade do LXR induzida pela elevação dos níveis de citocinas (Luo and Tall 2000, Blaschke, Takata et al. 2006), a hipótese da relação entre CETP e inflamação torna-se ainda mais plausível. Por outro lado e ao contrário do esperado, os resultados deste trabalho sugerem não haver associação entre a atividade de CETP e a magnitude da resposta inflamatória estimada pela PCR, IL-2 e TNF- α . Tais achados indicam que potencialmente outros mecanismos de modulação da CETP devem atuar durante o estresse agudo do IM.

Nesse contexto, estudamos a contribuição da atividade de CETP para a oxidação da HDL em distintos momentos no pós-IM. Apesar da atividade de CETP não ter se associado diretamente à geração de espécies reativas de oxigênio no plasma, a CETP pode estar envolvida na transferência de lípides oxidados para a HDL. Tal mecanismo foi demonstrado *in vitro*, onde a CETP foi responsável pela transferência de formas oxidadas e não-oxidadas de cholesteryl ester das LDL para as HDL (Christison, Rye et al. 1995). Dessa forma, a exacerbada atividade de

CETP pode prolongar a exposição de células endoteliais a produtos de oxidação durante o estresse agudo, pela transferência de lípidos oxidados para as partículas de HDL (Ohmura, Watanabe et al. 1999, Matsunaga, Hokari et al. 2003). Ao encontro desse conceito, enquanto a 8-isoprostana se reduz progressivamente até o D5, ocorre aumento no conteúdo de TBARS nas partículas HDL entre o D1 e o D5 com persistência até o D30.

O permanente acúmulo de produtos do estresse oxidativo nas partículas de HDL nos primeiros 30 dias devem justificar a persistente disfunção endotelial observada no presente estudo em pacientes com elevada atividade de CETP à admissão. Assim, a atividade de CETP foi diretamente associada ao acúmulo de produtos oxidados na HDL e inversamente associados com a dilatação fluxo-mediada (Anexo H). De forma consistente, a HDL oxidada pode ativar o receptor LOX-1 (*lecitin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1*) em células endoteliais, acionando a proteína quinase C BII e, por esta via, inibindo a eNOS e a produção de óxido nítrico (Matsunaga, Hokari et al. 2003, Besler, Heinrich et al. 2011).

Ao encontro dos presentes achados, em ensaios clínicos com inibidores de CETP, o uso de dalcetrapib não mudou a atividade inflamatória em pacientes com doença coronariana e elevado risco cardiovascular (Luscher, Taddei et al. 2012). Em contraposição ao presente estudo, contudo, o estudo Dal-VESSEL não observou melhora na função endotelial com o uso de dalcetrapib. Apesar de não se poder excluir a hipótese de uma baixa capacidade inibitória da CETP (30-40%) pelo dalcetrapib, a quantidade de lípidos oxidados disponíveis a transferência para a HDL difere substancialmente entre pacientes com IM e aqueles com doença coronariana estável (Ehara, Ueda et al. 2001). Além disso, não é possível excluir a possibilidade de que algumas das ações da CETP se deem de maneira independente da transferência de lípidos; vez que a CETP é expressa em diversos tecidos, incluindo no endotélio (Norata, Ongari et al. 2005). Entretanto, é desconhecida a função fisiológica da CETP no endotélio e se a CETP de expressão endotelial poderia contribuir para disfunção endotelial no pós-MI. Como uma pista inicial para uma potencial implicação da CETP sobre a função endotelial, Gomaschi et al (Gomaschi, Ossoli et al. 2014) recentemente descreveu pacientes com deficiência genética de CETP que apresentam HDL com menor potencial ativador da eNOS e da produção de óxido nítrico, explicado por uma menor expressão de esfingosina-1 fosfato (S1P). Sugere-se, portanto, que a CETP em concentrações fisiológicas exerça um papel na manutenção da função endotelial uma vez que sua deficiência leva menor atividade da eNOS. Tal modelo, entretanto, não é capaz de

demonstrar o efeito da expressão ou atividade suprafisiológicas de CETP. Mais estudos serão necessário para comprovar esta hipótese.

No ensaio clínico dal-OUTCOMES (Schwartz, Olsson et al. 2012), apesar de o dalcetrapib ter aumentado os níveis de HDL-c, não houve redução no risco de eventos cardiovasculares recorrentes em pacientes com SCA recente. Entretanto, os pacientes foram incluídos apenas 4 a 12 semanas após a SCA índice, o que pode ter contribuído para a ausência benefício em termos de desfechos clínicos. Desta forma, torna-se digno de nota o efeito de inibidores de CETP no contexto da fase aguda do IM ou outras SCA ainda merece investigação.

Apesar da existência de dados que indicam um papel pró-trombótico da ação de CETP (Deguchi, Fernandez et al. 2007), o presente estudo não foi capaz de identificar qualquer diferença na presença de trombo intracoronário nos pacientes com atividade de CETP exacerbada. Essa divergência pode estar relacionada a uma baixa sensibilidade do método utilizado (angiografia coronária) em detectar trombo intracoronário ou talvez apenas ao acaso. Estudos com métodos mais precisos de avaliação de trombo serão necessário para desnudar essa relação potencial.

No presente estudo verificamos que a atividade de CETP se relacionou de forma independente a disfunção endotelial e à incidência de eventos cardiovasculares recorrentes, mas algumas limitações devem ser mencionadas: (i) medida de TBARS em HDL isolada por ultracentrifugação; (ii) medida do NOx plasmático pode ser influenciada pelo tratamento com nitratos e nitroglicerina da fase aguda do IM; (iii) avaliação de trombo intracoronário; (iv) estudo de natureza observacional, portanto gerador de hipótese; (v) os resultados não deve ser extrapolados para outras populações que não sejam de pacientes com IMCSST; (vi) tamanho amostral reduzido para as análises de sobrevida.

O tamanho amostral para as análises relacionadas a função endotelial foi suficiente, como mostra a seção “Cálculo do Tamanho Amostral”. Para as análises de sobrevida, entretanto, uma vez que o estudo não foi inicialmente desenhado para sua realização, o tamanho amostral pode ter sido insuficiente. Entretanto, por inexistir estudos que tenham examinado a relação entre atividade de CETP e incidência de eventos em pacientes com síndromes coronarianas agudas, o presente estudo neste interim serve como um piloto e estudo ulteriores serão necessários para confirma-lo. Com base nos presentes resultados, para um alfa de 5%, com tamanho amostral de 58 pacientes em cada braço e uma diferença na incidência de eventos cardiovasculares em 30 dias

(desfecho primário) de 12% (1,7 vs. 13,7%), o poder estatístico foi de 65,22%. Para que o poder estatístico seja de 80% e a mesma diferença na proporção de eventos entre os grupos, necessitaríamos de um tamanho amostral total de 163 pacientes.

Apesar disso, observamos uma associação significativa entre a atividade de CETP e a incidência de eventos cardiovasculares (MACE) em 30, 90 e 180 dias após o IMCSST. Estes achados merecem crédito pela consistência com processos biológicos potencialmente envolvidos no desfecho após o IM. Estudos anteriores demonstraram uma forte associação entre FMD medida após o IM e a incidência de MACE em curto e longo prazo (Karatzis, Ikonomidis et al. 2006, Guazzi, Reina et al. 2009). Assim, uma exacerbada atividade de CETP durante a fase aguda do IM deve ser considerada entre os fatores relacionados a disfunção endotelial persistente após o IM.

8 CONCLUSÕES

Em conjunto, os dois estudos sugerem que o IMCSST induz transformações na composição química e função da HDL, bem como mudanças na atividade enzimática da CETP que contribuem, em paralelo, para uma maior oxidação das partículas de HDL. A presença de um volume exagerado de partículas de HDL oxidadas nos pacientes com HDL-C mais elevado ou naqueles com atividade de CETP exacerbada na fase aguda do IMCSST parece ser a explicação para a presença da disfunção endotelial vasomotora e da menor biodisponibilidade de óxido nítrico verificada nesses indivíduos.

9 PERSPECTIVAS

No futuro, com ambiente propício a novos ensaios clínicos, o uso dos novos inibidores de CETP como anacetrapib e evacetrapib na fase hiperaguda do infarto do miocárdio poderá potencialmente amenizar a disfunção endotelial. Apesar de ser tratar de um cenário ainda essencialmente especulativo, o uso dos inibidores de CETP poderia levar a uma redução precoce na transferência de lípidos oxidados para a HDL, bem como poderia induzir mudanças funcionais positivas na HDL. O uso de dalcetrapib, ao contrário do anacetrapib e evacetrapib, demonstrou incapacidade em melhorar a atividade antioxidante da HDL bem como sua capacidade de transporte reverso de colesterol em pacientes com doença aterosclerótica (Yvan-Charvet, Kling et al. 2010, Ray, Ditmarsch et al. 2014). Se a capacidade dos novos inibidores de CETP em melhorar a atividade antioxidante da HDL também for mantida em pacientes na fase hiperaguda do IM, o impacto do tratamento poderia se traduzir em atenuação da disfunção endotelial.

Outras estratégias de reversão ou bloqueio das mudanças funcionais da HDL no pós-IM também devem ser buscadas. A administração de apoA-I Milano, uma isoforma mais potente de apo A-I que a *wild type*, apresentou resultados convincentes com a reversão do volume de ateroma coronário em pacientes com SCA (Nissen, Tsunoda et al. 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre a composição proteica e lipídica da HDL que poderia contribuir para melhores resultados funcionais, tampouco se conhece como alterar a composição da HDL. Desta forma, sob posse dos resultados do presente trabalho abre-se a perspectiva de explorar em detalhes os determinantes fisiopatológicos específicos da HDL disfuncional com o objetivo de alcançar alvos terapêuticos para uma HDL com menor grau de modificações oxidativas na fase aguda do IM.

REFERÊNCIAS

- Ajani, U. A. and E. S. Ford (2006). "Has the risk for coronary heart disease changed among U.S. adults?" J Am Coll Cardiol **48**(6): 1177-1182.
- Alexander, R. W. (1995). "Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective." Hypertension **25**(2): 155-161.
- Ansell, B. J., M. Navab, S. Hama, N. Kamranpour, G. Fonarow, G. Hough, S. Rahmani, R. Mottahedeh, R. Dave, S. T. Reddy and A. M. Fogelman (2003). "Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment." Circulation **108**(22): 2751-2756.
- Arstall, M. A., J. Yang, I. Stafford, W. H. Betts and J. D. Horowitz (1995). "N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects." Circulation **92**(10): 2855-2862.
- Artl, A., G. Marsche, S. Lestavel, W. Sattler and E. Malle (2000). "Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(3): 763-772.
- Asztalos, B. F., L. A. Cupples, S. Demissie, K. V. Horvath, C. E. Cox, M. C. Batista and E. J. Schaefer (2004). "High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 2181-2187.
- Asztalos, B. F., E. J. Schaefer, K. V. Horvath, S. Yamashita, M. Miller, G. Franceschini and L. Calabresi (2007). "Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states." J Lipid Res **48**(3): 592-599.
- Azambuja, M. I., M. Foppa, M. F. Maranhao and A. C. Achutti (2008). "Economic burden of severe cardiovascular diseases in Brazil: an estimate based on secondary data." Arq Bras Cardiol **91**(3): 148-155, 163-171.
- Baigent, C., L. Blackwell, J. Emberson, L. E. Holland, C. Reith, N. Bhala, R. Peto, E. H. Barnes, A. Keech, J. Simes and R. Collins (2010). "Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials." Lancet **376**(9753): 1670-1681.
- Barlage, S., C. Gnewuch, G. Liebisch, Z. Wolf, F. X. Audebert, T. Gluck, D. Frohlich, B. K. Kramer, G. Rothe and G. Schmitz (2009). "Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation." Intensive Care Med **35**(11): 1877-1885.

Barr, D. P., E. M. Russ and H. A. Eder (1951). "Protein-lipid relationships in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions." Am J Med **11**(4): 480-493.

Barter, P., A. M. Gotto, J. C. LaRosa, J. Maroni, M. Szarek, S. M. Grundy, J. J. Kastelein, V. Bittner and J. C. Fruchart (2007). "HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events." N Engl J Med **357**(13): 1301-1310.

Barter, P. J., H. B. Brewer, Jr., M. J. Chapman, C. H. Hennekens, D. J. Rader and A. R. Tall (2003). "Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): 160-167.

Barter, P. J., M. Caulfield, M. Eriksson, S. M. Grundy, J. J. Kastelein, M. Komajda, J. Lopez-Sendon, L. Mosca, J. C. Tardif, D. D. Waters, C. L. Shear, J. H. Revkin, K. A. Buhr, M. R. Fisher, A. R. Tall and B. Brewer (2007). "Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events." N Engl J Med **357**(21): 2109-2122.

Besler, C., K. Heinrich, L. Rohrer, C. Doerries, M. Riwanto, D. M. Shih, A. Chroni, K. Yonekawa, S. Stein, N. Schaefer, M. Mueller, A. Akhmedov, G. Daniil, C. Manes, C. Templin, C. Wyss, W. Maier, F. C. Tanner, C. M. Matter, R. Corti, C. Furlong, A. J. Lusis, A. von Eckardstein, A. M. Fogelman, T. F. Luscher and U. Landmesser (2011). "Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease." J Clin Invest **121**(7): 2693-2708.

Bhagat, K. (1998). "Endothelial function and myocardial infarction." Cardiovasc Res **39**(2): 312-317.

Blanche, P. J., E. L. Gong, T. M. Forte and A. V. Nichols (1981). "Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis." Biochim Biophys Acta **665**(3): 408-419.

Blaschke, F., Y. Takata, E. Caglayan, A. Collins, P. Tontonoz, W. A. Hsueh and R. K. Tangirala (2006). "A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor." Circ Res **99**(12): e88-99.

Boden, W. E., R. A. O'Rourke, K. K. Teo, P. M. Hartigan, D. J. Maron, W. J. Kostuk, M. Knudtson, M. Dada, P. Casperson, C. L. Harris, B. R. Chaitman, L. Shaw, G. Gosselin, S. Nawaz, L. M. Title, G. Gau, A. S. Blaustein, D. C. Booth, E. R. Bates, J. A. Spertus, D. S. Berman, G. B. Mancini, W. S. Weintraub and C. T. R. Group (2007). "Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease." N Engl J Med **356**(15): 1503-1516.

Bonauer, A., G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, E. Chavakis, M. Potente, M. Tjwa, C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2009). "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice." Science **324**(5935): 1710-1713.

Brinton, E. A., S. Eisenberg and J. L. Breslow (1994). "Human HDL cholesterol levels are determined by apoA-I fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates of HDL particle size. Effects of

gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution." Arterioscler Thromb **14**(5): 707-720.

Brousseau, M. E., M. R. Diffenderfer, J. S. Millar, C. Nartsupha, B. F. Asztalos, F. K. Welty, M. L. Wolfe, M. Rudling, I. Bjorkhem, B. Angelin, J. P. Mancuso, A. G. Digenio, D. J. Rader and E. J. Schaefer (2005). "Effects of cholesteryl ester transfer protein inhibition on high-density lipoprotein subspecies, apolipoprotein A-I metabolism, and fecal sterol excretion." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 1057-1064.

Bursill, C. A., M. L. Castro, D. T. Beattie, S. Nakhla, E. van der Vorst, A. K. Heather, P. J. Barter and K. A. Rye (2010). "High-density lipoproteins suppress chemokines and chemokine receptors in vitro and in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(9): 1773-1778.

Campo, G., M. Valgimigli, P. Ferraresi, P. Malagutti, M. Baroni, C. Arcozzi, D. Gemmati, G. Percoco, G. Parrinello, R. Ferrari and F. Bernardi (2006). "Tissue factor and coagulation factor VII levels during acute myocardial infarction: association with genotype and adverse events." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2800-2806.

Cazita, P. M., D. F. Barbeiro, A. I. Moretti, E. C. Quintao and F. G. Soriano (2008). "Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP." Shock **30**(5): 590-595.

Chapman, M. J., S. Goldstein, D. Lagrange and P. M. Laplaud (1981). "A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum." J Lipid Res **22**(2): 339-358.

Chisolm, G. M. and D. Steinberg (2000). "The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview." Free Radic Biol Med **28**(12): 1815-1826.

Cho, K. H., D. G. Shin, S. H. Baek and J. R. Kim (2009). "Myocardial infarction patients show altered lipoprotein properties and functions when compared with stable angina pectoris patients." Exp Mol Med **41**(2): 67-76.

Christison, J. K., K. A. Rye and R. Stocker (1995). "Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein." J Lipid Res **36**(9): 2017-2026.

Coppieters, Y., P. Collart and A. Leveque (2011). "Gender differences in acute myocardial infarction, twenty-five years registration." Int J Cardiol.

Corretti, M. C., T. J. Anderson, E. J. Benjamin, D. Celermajer, F. Charbonneau, M. A. Creager, J. Deanfield, H. Drexler, M. Gerhard-Herman, D. Herrington, P. Vallance, J. Vita and R. Vogel (2002). "Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force." J Am Coll Cardiol **39**(2): 257-265.

Corsetti, J. P., D. Ryan, D. L. Rainwater, A. J. Moss, W. Zareba and C. E. Sparks (2010). "Cholesteryl ester transfer protein polymorphism (TaqIB) associates with risk in postinfarction patients with high C-reactive protein and high-density lipoprotein cholesterol levels." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(8): 1657-1664.

DATASUS (2014). "Ministério da Saúde. Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS). Informações sobre mortalidade e informações demográficas." Disponível em URL: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi>.

Dattilo, J. B. and R. G. Makhoul (1997). "The role of nitric oxide in vascular biology and pathobiology." *Ann Vasc Surg* **11**(3): 307-314.

Davidson, W. S., R. A. Silva, S. Chantepie, W. R. Lagor, M. J. Chapman and A. Kontush (2009). "Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(6): 870-876.

De Mattia, G., M. C. Bravi, O. Laurenti, M. Cassone-Faldetta, A. Proietti, O. De Luca, A. Armiento and C. Ferri (1998). "Reduction of oxidative stress by oral N-acetyl-L-cysteine treatment decreases plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in non-obese, non-dyslipidaemic, normotensive, patients with non-insulin-dependent diabetes." *Diabetologia* **41**(11): 1392-1396.

Deguchi, H., J. A. Fernandez and J. H. Griffin (2007). "Plasma cholesteryl ester transfer protein and blood coagulability." *Thromb Haemost* **98**(6): 1160-1164.

Delanty, N., M. P. Reilly, D. Pratico, J. A. Lawson, J. F. McCarthy, A. E. Wood, S. T. Ohnishi, D. J. Fitzgerald and G. A. FitzGerald (1997). "8-epi PGF2 alpha generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo." *Circulation* **95**(11): 2492-2499.

Draganov, D. I., J. F. Teiber, A. Speelman, Y. Osawa, R. Sunahara and B. N. La Du (2005). "Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities." *J Lipid Res* **46**(6): 1239-1247.

Durrington, P. N., B. Mackness and M. I. Mackness (2001). "Paraoxonase and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(4): 473-480.

Ehara, S., M. Ueda, T. Naruko, K. Haze, A. Itoh, M. Otsuka, R. Komatsu, T. Matsuo, H. Itabe, T. Takano, Y. Tsukamoto, M. Yoshiyama, K. Takeuchi, J. Yoshikawa and A. E. Becker (2001). "Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes." *Circulation* **103**(15): 1955-1960.

Fang, C., S. Yoon, N. Tindberg, H. A. Jarvelainen, K. O. Lindros and M. Ingelman-Sundberg (2004). "Hepatic expression of multiple acute phase proteins and down-regulation of nuclear receptors after acute endotoxin exposure." *Biochem Pharmacol* **67**(7): 1389-1397.

Forstermann, U., J. P. Boissel and H. Kleinert (1998). "Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)." *FASEB J* **12**(10): 773-790.

Frangogiannis, N. G., C. W. Smith and M. L. Entman (2002). "The inflammatory response in myocardial infarction." *Cardiovasc Res* **53**(1): 31-47.

Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* **288**(5789): 373-376.

Gimbrone, M. A., Jr., K. R. Anderson, J. N. Topper, B. L. Langille, A. W. Clowes, S. Berceles, M. G. Davies, K. R. Stenmark, M. G. Frid, M. C. Weiser-Evans, A. A. Aldashev, R. A. Nemenoff, M. W. Majesky, T. E. Landerholm, J. Lu, W. D. Ito, M. Arras, D. Scholz, B. Imhof, M. Aurrand-Lions, W. Schaper, T. E. Nagel, N. Resnick, C. F. Dewey, M. A. Gimbrone and P. F. Davies (1999). "Special communication the critical role of mechanical forces in blood vessel development, physiology and pathology." *J Vasc Surg* **29**(6): 1104-1151.

Gimbrone, M. A., Jr., T. Nagel and J. N. Topper (1997). "Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology." *J Clin Invest* **100**(11 Suppl): S61-65.

Gomaschi, M., A. Ossoli, E. Favari, M. P. Adorni, G. Sinagra, L. Cattin, F. Veglia, F. Bernini, G. Franceschini and L. Calabresi (2013). "Inflammation impairs eNOS activation by HDL in patients with acute coronary syndrome." *Cardiovasc Res*.

Gomaschi, M., A. Ossoli, S. Pozzi, P. Nilsson, A. B. Cefalu, M. Averna, J. A. Kuivenhoven, G. K. Hovingh, F. Veglia, G. Franceschini and L. Calabresi (2014). "eNOS activation by HDL is impaired in genetic CETP deficiency." *PLoS One* **9**(5): e95925.

Gotto, A. M., Jr. and E. A. Brinton (2004). "Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update." *J Am Coll Cardiol* **43**(5): 717-724.

Green, D. J., H. Jones, D. Thijssen, N. T. Cable and G. Atkinson (2011). "Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter?" *Hypertension* **57**(3): 363-369.

Green, P. S., T. Vaisar, S. Pennathur, J. J. Kulstad, A. B. Moore, S. Marcovina, J. Brunzell, R. H. Knopp, X. Q. Zhao and J. W. Heinecke (2008). "Combined statin and niacin therapy remodels the high-density lipoprotein proteome." *Circulation* **118**(12): 1259-1267.

Grion, C. M., L. T. Cardoso, T. F. Perazolo, A. S. Garcia, D. S. Barbosa, H. K. Morimoto, T. Matsuo and A. J. Carrilho (2010). "Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients." *Eur J Clin Invest* **40**(4): 330-338.

Guazzi, M., G. Reina, P. Gripari, G. Tumminello, M. Vicenzi and R. Arena (2009). "Prognostic value of flow-mediated dilatation following myocardial infarction." *Int J Cardiol* **132**(1): 45-50.

- Hedrick, C. C., S. R. Thorpe, M. X. Fu, C. M. Harper, J. Yoo, S. M. Kim, H. Wong and A. L. Peters (2000). "Glycation impairs high-density lipoprotein function." Diabetologia **43**(3): 312-320.
- Hirata, M. and F. Murad (1994). "Interrelationships of cyclic GMP, inositol phosphates, and calcium." Adv Pharmacol **26**: 195-216.
- Huang, J. M., Z. X. Huang and W. Zhu (1998). "Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein." Clin Biochem **31**(7): 537-543.
- Huang, Y., Z. Wu, M. Riwanto, S. Gao, B. S. Levison, X. Gu, X. Fu, M. A. Wagner, C. Besler, G. Gerstenecker, R. Zhang, X. M. Li, A. J. DiDonato, V. Gogonea, W. H. Tang, J. D. Smith, E. F. Plow, P. L. Fox, D. M. Shih, A. J. Lusis, E. A. Fisher, J. A. DiDonato, U. Landmesser and S. L. Hazen (2013). "Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex." J Clin Invest **123**(9): 3815-3828.
- Jahangiri, A., M. C. de Beer, V. Noffsinger, L. R. Tannock, C. Ramaiah, N. R. Webb, D. R. van der Westhuyzen and F. C. de Beer (2009). "HDL remodeling during the acute phase response." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(2): 261-267.
- James, S. K., M. T. Roe, C. P. Cannon, J. H. Cornel, J. Horrow, S. Husted, H. Katus, J. Morais, P. G. Steg, R. F. Storey, S. Stevens, L. Wallentin and R. A. Harrington (2011). "Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes intended for non-invasive management: substudy from prospective randomised PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial." Bmj **342**: d3527.
- Karatzis, E. N., I. Ikonomidis, G. D. Vamvakou, T. G. Papaioannou, A. D. Protogerou, I. Andreadou, P. T. Voidonikola, K. N. Karatzi, C. M. Papamichael and J. P. Lekakis (2006). "Long-term prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery after acute coronary syndromes without ST elevation." Am J Cardiol **98**(11): 1424-1428.
- Khera, A. V., M. Cuchel, M. de la Llera-Moya, A. Rodrigues, M. F. Burke, K. Jafri, B. C. French, J. A. Phillips, M. L. Mucksavage, R. L. Wilensky, E. R. Mohler, G. H. Rothblat and D. J. Rader (2011). "Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis." N Engl J Med **364**(2): 127-135.
- Khovidhunkit, W., M. S. Kim, R. A. Memon, J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold and C. Grunfeld (2004). "Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host." J Lipid Res **45**(7): 1169-1196.
- Kiely, J. M., M. I. Cybulsky, F. W. Lusinskas and M. A. Gimbrone, Jr. (1995). "Immunoselective targeting of an anti-thrombin agent to the surface of cytokine-activated vascular endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(8): 1211-1218.

Kinlay, S., G. G. Schwartz, A. G. Olsson, N. Rifai, S. J. Leslie, W. J. Sasiela, M. Szarek, P. Libby and P. Ganz (2003). "High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study." Circulation **108**(13): 1560-1566.

Kontush, A., S. Chantepie and M. J. Chapman (2003). "Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(10): 1881-1888.

Kontush, A. and M. J. Chapman (2006). "Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall?" Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3**(3): 144-153.

Kontush, A. and M. J. Chapman (2006). "Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis." Pharmacol Rev **58**(3): 342-374.

Kontush, A. and M. J. Chapman (2010). "Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities." Curr Opin Lipidol **21**(4): 312-318.

Kuvin, J. T., A. R. Patel, M. Sidhu, W. M. Rand, K. A. Sliney, N. G. Pandian and R. H. Karas (2003). "Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function." Am J Cardiol **92**(3): 275-279.

Lagrost, L. (1998). "Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP)." Methods Mol Biol **110**: 231-241.

Lewis, G. F. and D. J. Rader (2005). "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport." Circ Res **96**(12): 1221-1232.

Li, Y., J. B. Dong and M. P. Wu (2008). "Human ApoA-I overexpression diminishes LPS-induced systemic inflammation and multiple organ damage in mice." Eur J Pharmacol **590**(1-3): 417-422.

Lima, E. S. and R. C. Maranhao (2004). "Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma." Clin Chem **50**(6): 1086-1088.

Luo, Y. and A. R. Tall (2000). "Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element." J Clin Invest **105**(4): 513-520.

Luscher, T. F., S. Taddei, J. C. Kaski, J. W. Jukema, D. Kallend, T. Munzel, J. J. Kastelein, J. E. Deanfield and V. I. dal (2012). "Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: the dal-VESEL randomized clinical trial." Eur Heart J **33**(7): 857-865.

Mabin, T. A., D. R. Holmes, Jr., H. C. Smith, R. E. Vlietstra, A. A. Bove, G. S. Reeder, J. H. Chesebro, J. F. Bresnahan and T. A. Orszulak (1985). "Intracoronary thrombus: role in coronary occlusion complicating percutaneous transluminal coronary angioplasty." J Am Coll Cardiol **5**(2 Pt 1): 198-202.

Mackness, M. I., S. Arrol, C. Abbott and P. N. Durrington (1993). "Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase." Atherosclerosis **104**(1-2): 129-135.

Maron, D. J. (2000). "The epidemiology of low levels of high-density lipoprotein cholesterol in patients with and without coronary artery disease." Am J Cardiol **86**(12A): 11L-14L.

Mashima, R., Y. Yamamoto and S. Yoshimura (1998). "Reduction of phosphatidylcholine hydroperoxide by apolipoprotein A-I: purification of the hydroperoxide-reducing proteins from human blood plasma." J Lipid Res **39**(6): 1133-1140.

Matsunaga, T., S. Hokari, I. Koyama, T. Harada and T. Komoda (2003). "NF-kappa B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein." Biochem Biophys Res Commun **303**(1): 313-319.

Matsuura, F., N. Wang, W. Chen, X. C. Jiang and A. R. Tall (2006). "HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway." J Clin Invest **116**(5): 1435-1442.

Menghini, R., V. Casagrande, A. Marino, V. Marchetti, M. Cardellini, R. Stoehr, S. Rizza, E. Martelli, S. Greco, A. Mauriello, A. Ippoliti, F. Martelli, R. Lauro and M. Federici (2014). "MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy." Cell Death Dis **5**: e1029.

Miller, N. E. and G. J. Miller (1975). "Letter: High-density lipoprotein and atherosclerosis." Lancet **1**(7914): 1033.

Mineo, C., H. Deguchi, J. H. Griffin and P. W. Shaul (2006). "Endothelial and antithrombotic actions of HDL." Circ Res **98**(11): 1352-1364.

Minnema, M. C., R. J. Peters, R. de Winter, Y. P. Lubbers, S. Barzegar, K. A. Bauer, R. D. Rosenberg, C. E. Hack and H. ten Cate (2000). "Activation of clotting factors XI and IX in patients with acute myocardial infarction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(11): 2489-2493.

Morrow, J. D., B. Frei, A. W. Longmire, J. M. Gaziano, S. M. Lynch, Y. Shyr, W. E. Strauss, J. A. Oates and L. J. Roberts, 2nd (1995). "Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage." N Engl J Med **332**(18): 1198-1203.

Natarajan, P., K. K. Ray and C. P. Cannon (2010). "High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies." J Am Coll Cardiol **55**(13): 1283-1299.

Navab, M., S. T. Reddy, B. J. Van Lenten, G. M. Anantharamaiah and A. M. Fogelman (2009). "The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis." J Lipid Res **50 Suppl**: S145-149.

Nian, M., P. Lee, N. Khaper and P. Liu (2004). "Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling." Circ Res **94**(12): 1543-1553.

Nicholls, S. J., H. B. Brewer, J. J. Kastelein, K. A. Krueger, M. D. Wang, M. Shao, B. Hu, E. McErlean and S. E. Nissen (2011). "Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial." JAMA **306**(19): 2099-2109.

Nicholls, S. J., G. J. Dusting, B. Cutri, S. Bao, G. R. Drummond, K. A. Rye and P. J. Barter (2005). "Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits." *Circulation* **111**(12): 1543-1550.

Nicholls, S. J. and S. E. Nissen (2005). "Strategies to promote HDL-C: an emerging therapeutic target." *Eur Heart J* **26**(9): 853-855.

Nicholls, S. J., E. M. Tuzcu, D. M. Brennan, J. C. Tardif and S. E. Nissen (2008). "Cholesteryl ester transfer protein inhibition, high-density lipoprotein raising, and progression of coronary atherosclerosis: insights from ILLUSTRATE (Investigation of Lipid Level Management Using Coronary Ultrasound to Assess Reduction of Atherosclerosis by CETP Inhibition and HDL Elevation)." *Circulation* **118**(24): 2506-2514.

Nissen, S. E., J. C. Tardif, S. J. Nicholls, J. H. Revkin, C. L. Shear, W. T. Duggan, W. Ruzylo, W. B. Bachinsky, G. P. Lasala and E. M. Tuzcu (2007). "Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis." *N Engl J Med* **356**(13): 1304-1316.

Nissen, S. E., T. Tsunoda, E. M. Tuzcu, P. Schoenhagen, C. J. Cooper, M. Yasin, G. M. Eaton, M. A. Lauer, W. S. Sheldon, C. L. Grines, S. Halpern, T. Crowe, J. C. Blankenship and R. Kerensky (2003). "Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial." *Jama* **290**(17): 2292-2300.

Nobecourt, E., F. Tabet, G. Lambert, R. Puranik, S. Bao, L. Yan, M. J. Davies, B. E. Brown, A. J. Jenkins, G. J. Dusting, D. J. Bonnet, L. K. Curtiss, P. J. Barter and K. A. Rye (2010). "Nonenzymatic glycation impairs the antiinflammatory properties of apolipoprotein A-I." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(4): 766-772.

Norata, G. D., M. Ongari, P. Uboldi, F. Pellegatta and A. L. Catapano (2005). "Liver X receptor and retinoic X receptor agonists modulate the expression of genes involved in lipid metabolism in human endothelial cells." *Int J Mol Med* **16**(4): 717-722.

Nunes, V. S., E. C. Quintao, P. M. Cazita, L. M. Harada, E. C. de Faria and H. C. Oliveira (2001). "Plasma lipases and lipid transfer proteins increase phospholipid but not free cholesterol transfer from lipid emulsion to high density lipoproteins." *BMC Biochem* **2**: 1.

Ohmura, H., Y. Watanabe, C. Hatsumi, H. Sato, H. Daida, H. Mokuno and H. Yamaguchi (1999). "Possible role of high susceptibility of high-density lipoprotein to lipid peroxidative modification and oxidized high-density lipoprotein in genesis of coronary artery spasm." *Atherosclerosis* **142**(1): 179-184.

Olsson, A. G., G. G. Schwartz, M. Szarek, W. J. Sasiela, M. D. Ezekowitz, P. Ganz, M. F. Oliver, D. Waters and A. Zeiher (2005). "High-density lipoprotein, but not low-density lipoprotein cholesterol levels

influence short-term prognosis after acute coronary syndrome: results from the MIRACL trial." Eur Heart J **26**(9): 890-896.

Patel, P. J., A. V. Khera, K. Jafri, R. L. Wilensky and D. J. Rader (2011). "The anti-oxidative capacity of high-density lipoprotein is reduced in acute coronary syndrome but not in stable coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **58**(20): 2068-2075.

Piegas, L. S., A. Avezum, J. C. Pereira, J. M. Neto, C. Hoepfner, J. A. Farran, R. F. Ramos, A. Timerman and J. P. Esteves (2003). "Risk factors for myocardial infarction in Brazil." Am Heart J **146**(2): 331-338.

Proudfoot, J. M., A. E. Barden, W. M. Loke, K. D. Croft, I. B. Puddey and T. A. Mori (2009). "HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes." J Lipid Res **50**(4): 716-722.

Pruzanski, W., E. Stefanski, F. C. de Beer, M. C. de Beer, A. Ravandi and A. Kuksis (2000). "Comparative analysis of lipid composition of normal and acute-phase high density lipoproteins." J Lipid Res **41**(7): 1035-1047.

Pyke, K. E. and M. E. Tschakovsky (2005). "The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function." J Physiol **568**(Pt 2): 357-369.

Quintao, E. C. and P. M. Cazita (2009). "Lipid transfer proteins: past, present and perspectives." Atherosclerosis **209**(1): 1-9.

Rader, D. J. (2006). "Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies." J Clin Invest **116**(12): 3090-3100.

Ray, K. K., M. Ditmarsch, D. Kallend, E. J. Niesor, G. Suchankova, R. Upmanyu, J. Anzuers-Cabrera, V. Lehnert, M. Pauly-Evers, I. Holme, J. Stasek, M. W. van Hessen, P. Jones and A. I. on behalf of the dal (2014). "The effect of cholesteryl ester transfer protein inhibition on lipids, lipoproteins, and markers of HDL function after an acute coronary syndrome: the dal-ACUTE randomized trial." Eur Heart J **35**(27): 1792-1800.

Ridker, P. M., J. Genest, S. M. Boekholdt, P. Libby, A. M. Gotto, B. G. Nordestgaard, S. Mora, J. G. MacFadyen, R. J. Glynn and J. J. Kastelein (2010). "HDL cholesterol and residual risk of first cardiovascular events after treatment with potent statin therapy: an analysis from the JUPITER trial." Lancet **376**(9738): 333-339.

Ringqvist, I., L. D. Fisher, M. Mock, K. B. Davis, H. Wedel, B. R. Chaitman, E. Passamani, R. O. Russell, Jr., E. L. Alderman, N. T. Kouchoukas, G. C. Kaiser, T. J. Ryan, T. Killip and D. Fray (1983). "Prognostic value of angiographic indices of coronary artery disease from the Coronary Artery Surgery Study (CASS)." J Clin Invest **71**(6): 1854-1866.

Riwanto, M., L. Rohrer, B. Roschitzki, C. Besler, P. Mocharla, M. Mueller, D. Perisa, K. Heinrich, L. Altwegg, A. von Eckardstein, T. F. Luscher and U. Landmesser (2013). "Altered activation of endothelial

anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling." *Circulation* **127**(8): 891-904.

Rubin, E. M., R. M. Krauss, E. A. Spangler, J. G. Verstuyft and S. M. Clift (1991). "Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI." *Nature* **353**(6341): 265-267.

Sachdeva, A., C. P. Cannon, P. C. Deedwania, K. A. Labresh, S. C. Smith, Jr., D. Dai, A. Hernandez and G. C. Fonarow (2009). "Lipid levels in patients hospitalized with coronary artery disease: an analysis of 136,905 hospitalizations in Get With The Guidelines." *Am Heart J* **157**(1): 111-117 e112.

Santos, E. S., A. Timerman, V. T. Baltar, M. T. Castillo, M. P. Pereira, L. Minuzzo and L. S. Piegas (2009). "Dante Pazzanese risk score for non-st-segment elevation acute coronary syndrome." *Arq Bras Cardiol* **93**(4): 343-351, 336-344.

Schwartz, G. G., A. G. Olsson, M. Abt, C. M. Ballantyne, P. J. Barter, J. Brumm, B. R. Chaitman, I. M. Holme, D. Kallend, L. A. Leiter, E. Leitersdorf, J. J. McMurray, H. Mundl, S. J. Nicholls, P. K. Shah, J. C. Tardif, R. S. Wright and O. I. dal (2012). "Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome." *N Engl J Med* **367**(22): 2089-2099.

Schwartz, G. G., A. G. Olsson, C. M. Ballantyne, P. J. Barter, I. M. Holme, D. Kallend, L. A. Leiter, E. Leitersdorf, J. J. McMurray, P. K. Shah, J. C. Tardif, B. R. Chaitman, R. Duttlinger-Maddux and J. Mathieson (2009). "Rationale and design of the dal-OUTCOMES trial: efficacy and safety of dalcetrapib in patients with recent acute coronary syndrome." *Am Heart J* **158**(6): 896-901 e893.

Sharrett, A. R., C. M. Ballantyne, S. A. Coady, G. Heiss, P. D. Sorlie, D. Catellier and W. Patsch (2001). "Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." *Circulation* **104**(10): 1108-1113.

Silbernagel, G., B. Schottker, S. Appelbaum, H. Scharnagl, M. E. Kleber, T. B. Grammer, A. Ritsch, U. Mons, B. Holleczeck, G. Goliash, A. Niessner, B. O. Boehm, R. B. Schnabel, H. Brenner, S. Blankenberg, U. Landmesser and W. Marz (2013). "High-density lipoprotein cholesterol, coronary artery disease, and cardiovascular mortality." *Eur Heart J*.

Sinoway, L. I., C. Hendrickson, W. R. Davidson, Jr., S. Prophet and R. Zelis (1989). "Characteristics of flow-mediated brachial artery vasodilation in human subjects." *Circ Res* **64**(1): 32-42.

Sochman, J. (2002). "N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?!" *J Am Coll Cardiol* **39**(9): 1422-1428.

Sociedade Brasileira de, C., H. T. Xavier, M. C. Izar, J. R. Faria Neto, M. H. Assad, V. Z. Rocha, A. C. Sposito, F. A. Fonseca, J. E. dos Santos, R. D. Santos, M. C. Bertolami, A. A. Faludi, T. L. Martinez, J. Diamant, A. Guimaraes, N. A. Forti, E. Moriguchi, A. C. Chagas, O. R. Coelho and J. A. Ramires (2013).

"[V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]." Arq Bras Cardiol **101**(4 Suppl 1): 1-20.

Sorrentino, S. A., C. Besler, L. Rohrer, M. Meyer, K. Heinrich, F. H. Bahlmann, M. Mueller, T. Horvath, C. Doerries, M. Heinemann, S. Flemmer, A. Markowski, C. Manes, M. J. Bahr, H. Haller, A. von Eckardstein, H. Drexler and U. Landmesser (2010). "Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy." Circulation **121**(1): 110-122.

Sposito, A. C., L. S. Carvalho, R. M. Cintra, A. L. Araujo, A. H. Ono, J. M. Andrade, O. R. Coelho and J. C. Quinaglia e Silva (2009). "Rebound inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction after simvastatin withdrawal." Atherosclerosis **207**(1): 191-194.

Sposito, A. C., S. N. Santos, E. C. de Faria, D. S. Abdalla, L. P. da Silva, A. A. Soares, A. V. Japiassu, J. C. Quinaglia e Silva, J. A. Ramires and O. R. Coelho (2011). "Timing and dose of statin therapy define its impact on inflammatory and endothelial responses during myocardial infarction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(5): 1240-1246.

Steinberg, D. (2005). "Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis: an interpretive history of the cholesterol controversy, part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia." J Lipid Res **46**(10): 2037-2051.

Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev **84**(4): 1381-1478.

Stone, N. J., J. G. Robinson, A. H. Lichtenstein, C. N. Bairey Merz, C. B. Blum, R. H. Eckel, A. C. Goldberg, D. Gordon, D. Levy, D. M. Lloyd-Jones, P. McBride, J. S. Schwartz, S. T. Shero, S. C. Smith, Jr., K. Watson, P. W. Wilson, K. M. Eddleman, N. M. Jarrett, K. LaBresh, L. Nevo, J. Wnek, J. L. Anderson, J. L. Halperin, N. M. Albert, B. Bozkurt, R. G. Brindis, L. H. Curtis, D. DeMets, J. S. Hochman, R. J. Kovacs, E. M. Ohman, S. J. Pressler, F. W. Sellke, W. K. Shen, S. C. Smith, Jr., G. F. Tomaselli and G. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice (2014). "2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." Circulation **129**(25 Suppl 2): S1-45.

Takahashi, M., T. Ishida, O. Traub, M. A. Corson and B. C. Berk (1997). "Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress." J Vasc Res **34**(3): 212-219.

Tangirala, R. K., K. Tsukamoto, S. H. Chun, D. Usher, E. Pure and D. J. Rader (1999). "Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice." Circulation **100**(17): 1816-1822.

- Teich, V. and D. V. Araujo (2011). "Estimated Cost of Acute Coronary Syndrome in Brazil." Rev Bras Cardiol. **24**(2): 85-94.
- Undurti, A., Y. Huang, J. A. Lupica, J. D. Smith, J. A. DiDonato and S. L. Hazen (2009). "Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle." J Biol Chem **284**(45): 30825-30835.
- Uren, N. G., T. Crake, D. C. Lefroy, R. de Silva, G. J. Davies and A. Maseri (1994). "Reduced coronary vasodilator function in infarcted and normal myocardium after myocardial infarction." N Engl J Med **331**(4): 222-227.
- Vaisar, T., S. Pennathur, P. S. Green, S. A. Gharib, A. N. Hoofnagle, M. C. Cheung, J. Byun, S. Vuletic, S. Kassim, P. Singh, H. Chea, R. H. Knopp, J. Brunzell, R. Geary, A. Chait, X. Q. Zhao, K. Elkon, S. Marcovina, P. Ridker, J. F. Oram and J. W. Heinecke (2007). "Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL." J Clin Invest **117**(3): 746-756.
- Van Lenten, B. J., S. Y. Hama, F. C. de Beer, D. M. Stafforini, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, B. N. La Du, A. M. Fogelman and M. Navab (1995). "Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures." J Clin Invest **96**(6): 2758-2767.
- Vickers, K. C., B. T. Palmisano, B. M. Shoucri, R. D. Shamburek and A. T. Remaley (2011). "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins." Nat Cell Biol **13**(4): 423-433.
- Wang, Z., S. J. Nicholls, E. R. Rodriguez, O. Kummu, S. Horkko, J. Barnard, W. F. Reynolds, E. J. Topol, J. A. DiDonato and S. L. Hazen (2007). "Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis." Nat Med **13**(10): 1176-1184.
- Warner, T. D., J. A. Mitchell, H. Sheng and F. Murad (1994). "Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation." Adv Pharmacol **26**: 171-194.
- Waters, D. D., G. G. Schwartz, A. G. Olsson, A. Zeiher, M. F. Oliver, P. Ganz, M. Ezekowitz, B. R. Chaitman, S. J. Leslie and T. Stern (2002). "Effects of atorvastatin on stroke in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction: a Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) substudy." Circulation **106**(13): 1690-1695.
- WHO (2010). Global status report on noncommunicable diseases. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- Williams, P. T., R. M. Krauss, K. M. Vranizan, M. L. Stefanick, P. D. Wood and F. T. Lindgren (1992). "Associations of lipoproteins and apolipoproteins with gradient gel electrophoresis estimates of high density lipoprotein subfractions in men and women." Arterioscler Thromb **12**(3): 332-340.

Wolfram, R. M., H. B. Brewer, Z. Xue, L. F. Satler, A. D. Pichard, K. M. Kent and R. Waksman (2006). "Impact of low high-density lipoproteins on in-hospital events and one-year clinical outcomes in patients with non-ST-elevation myocardial infarction acute coronary syndrome treated with drug-eluting stent implantation." *Am J Cardiol* **98**(6): 711-717.

Ye, D., A. O. Kraaijeveld, R. W. Grauss, S. M. Willems, L. C. van Vark-van der Zee, S. C. de Jager, M. Jauhiainen, J. A. Kuivenhoven, G. M. Dallinga-Thie, D. E. Atsma, P. C. Hogendoorn, E. A. Biessen, T. J. Van Berkel, J. W. Jukema and M. van Eck (2008). "Reduced leucocyte cholesteryl ester transfer protein expression in acute coronary syndromes." *J Intern Med* **264**(6): 571-585.

Yesilbursa, D., A. Serdar, T. Senturk, Z. Serdar, S. Sag and J. Cordan (2006). "Effect of N-acetylcysteine on oxidative stress and ventricular function in patients with myocardial infarction." *Heart Vessels* **21**(1): 33-37.

Yusuf, S., F. Zhao, S. R. Mehta, S. Chrolavicius, G. Tognoni and K. K. Fox (2001). "Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation." *N Engl J Med* **345**(7): 494-502.

Yvan-Charvet, L., J. Kling, T. Pagler, H. Li, B. Hubbard, T. Fisher, C. P. Sparrow, A. K. Taggart and A. R. Tall (2010). "Cholesterol efflux potential and antiinflammatory properties of high-density lipoprotein after treatment with niacin or anacetrapib." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(7): 1430-1438.

Yvan-Charvet, L., F. Matsuura, N. Wang, M. J. Bamberger, T. Nguyen, F. Rinninger, X. C. Jiang, C. L. Shear and A. R. Tall (2007). "Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly increases macrophage cholesterol efflux to HDL." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(5): 1132-1138.

Zatz, R. and C. Baylis (1998). "Chronic nitric oxide inhibition model six years on." *Hypertension* **32**(6): 958-964.

Zheng, L., B. Nukuna, M. L. Brennan, M. Sun, M. Goormastic, M. Settle, D. Schmitt, X. Fu, L. Thomson, P. L. Fox, H. Ischiropoulos, J. D. Smith, M. Kinter and S. L. Hazen (2004). "Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease." *J Clin Invest* **114**(4): 529-541.

ANEXO A – Parecer Favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Distrito Federal



SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER COMPLEMENTAR Projeto 083/06

I – Identificação

Título: Registro de Síndromes Coronárias agudas no DF.
Pesquisador responsável: médico
Instituição onde será realizada a pesquisa: InCor DF- Fundação Zerbini Hospital de Base e HRT.
Unidade: Departamento de Cardiologia
Área de conhecimento: Ciências da Saúde 401 – Grupo III
Data de entrada no CEP: 03/05/06
Data de distribuição: 08/05/06

II – Introdução

" As doenças cardiovasculares são a principal causa de óbito e incapacidade em todo mundo, sendo por isso consideradas um problema de Saúde Pública".

A mortalidade hospitalar das pacientes com IAM caiu de 30% para 75% nas duas últimas décadas graças ao advento de novas drogas e a criação de unidades coronárias.

As evidências a serem obtidas neste serão de saúde preventivas no Distrito Federal.

III – Objetivos:

Datar o DF. De um Registro de Síndromes Coronárias Agudas na Rede Pública em uma população de baixa renda.

Possibilitar ações básicas de prevenção direcionadas para esta classe social.

Buscar formas de prevenção desta doença reduzindo a morbi – mortalidade e melhorando a qualidade de vida.

IV – Metodologia

Estudo observacional, com duração de 12 meses em 03 hospitais do Distrito Federal, sujeitos da pesquisa todo(a)s pacientes atendidas com síndrome coronária aguda nos 03 hospitais públicos do DF. Os dados serão coletados por uma equipe multiprofissional qualificada, e analisadas por Comitês Central sediado no InCor/DF.

V – Comentários com base na resolução CNS n° 196 / 96 e complementares:

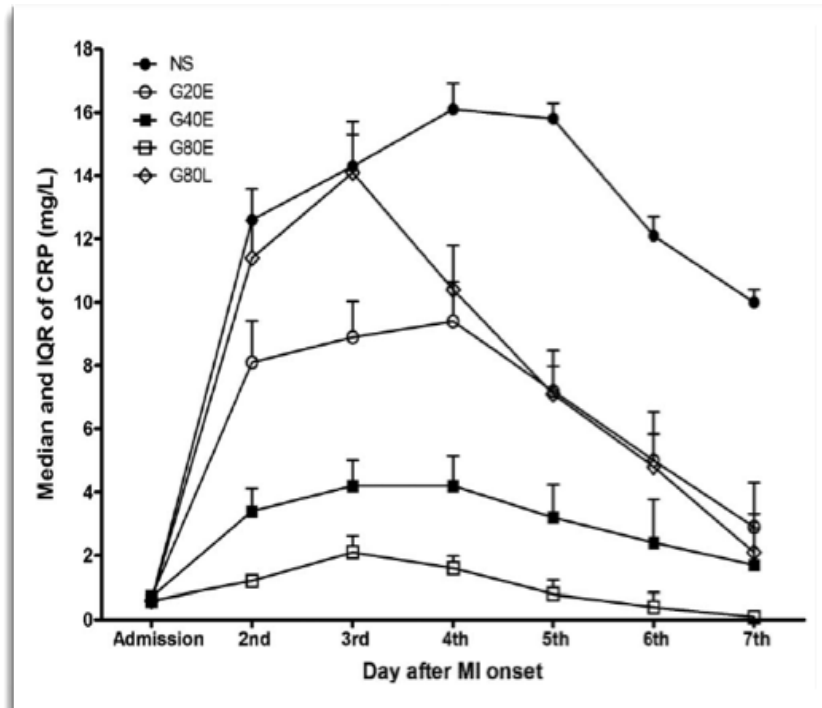
Observa-se que o mesmo contempla as normas estabelecidas quanto aos documentos de instrução do Protocolo de Pesquisa, contudo, falta anexar os termos de concordância dos diretores do Hospital de Base e do HRT. (PENDENCIA ATENDIDA).

VI – Conclusão – Projeto aprovado.

Brasília, 28 de maio de 2006.

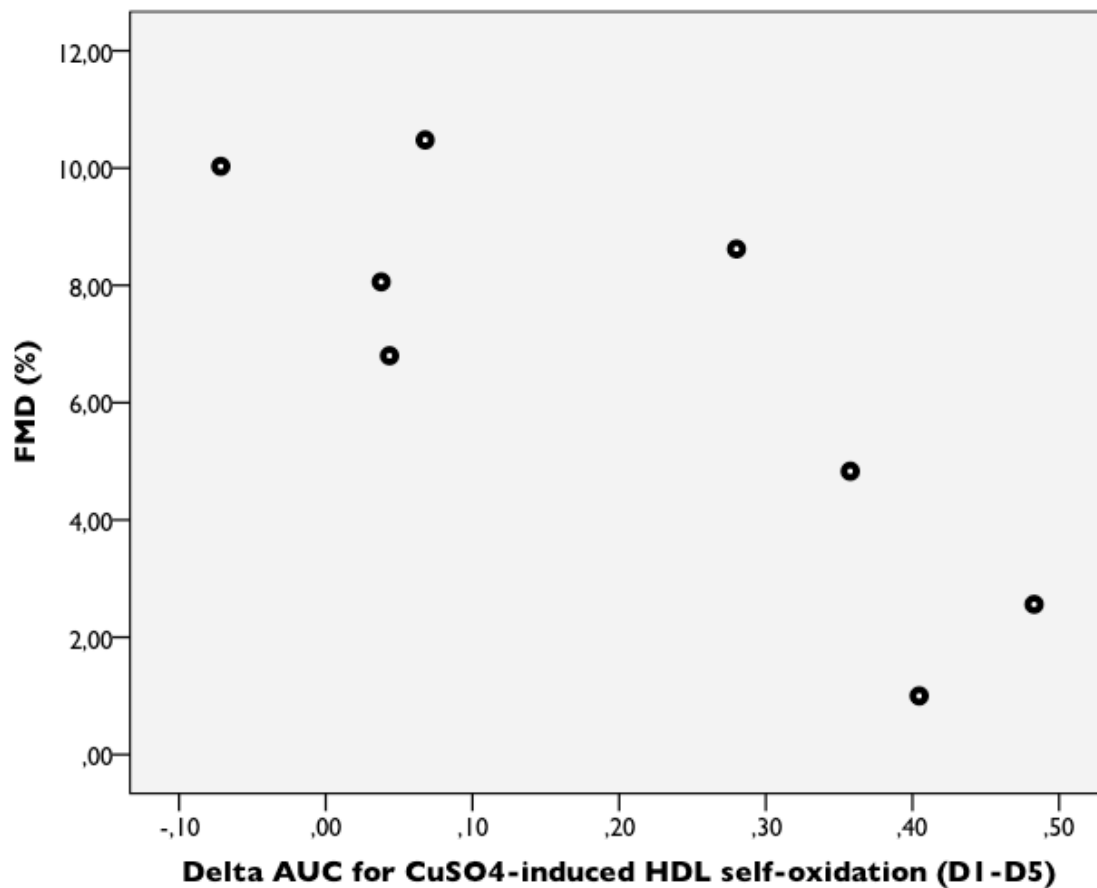
Maria Rita Garbi Novaes
Coordenadora CEP/SES-DF

ANEXO B – Evolução temporal (em dias) da atividade inflamatória medida pela proteína C reativa (CRP) após o IMCSST, de acordo com o uso e a dose de sinvastatina na fase aguda



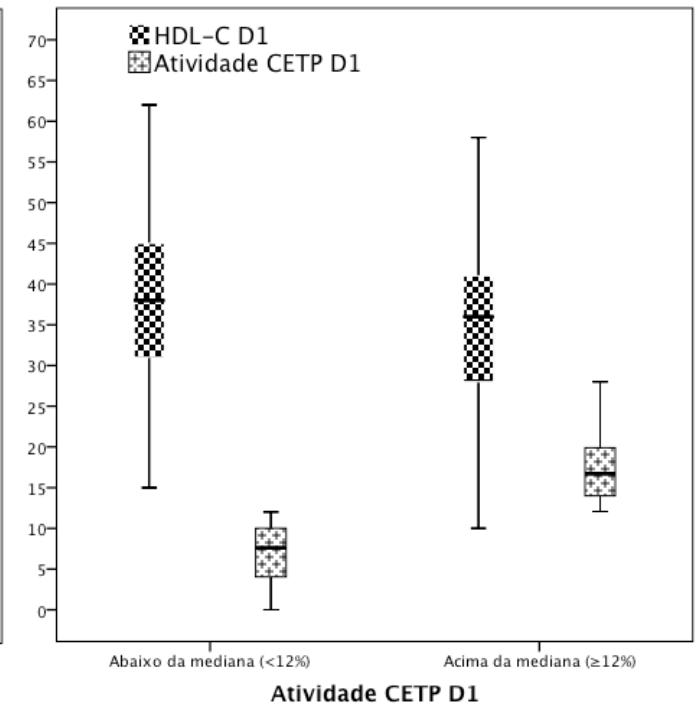
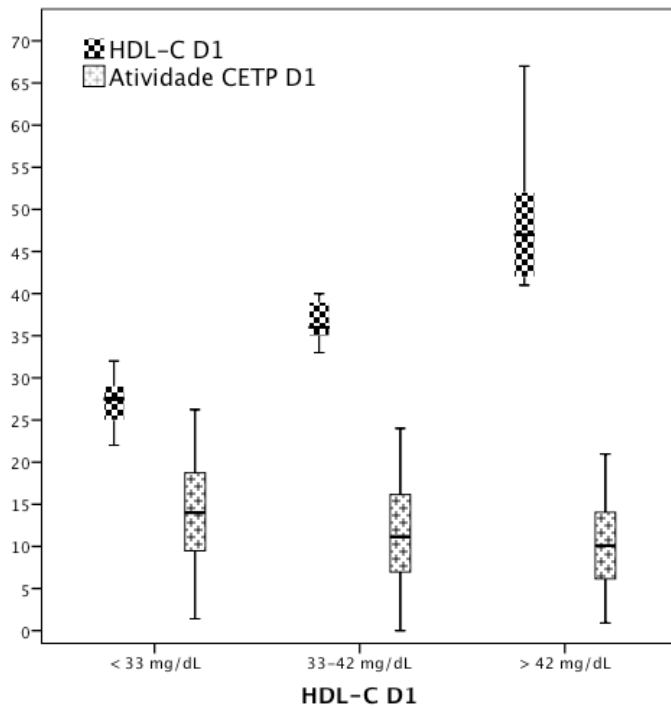
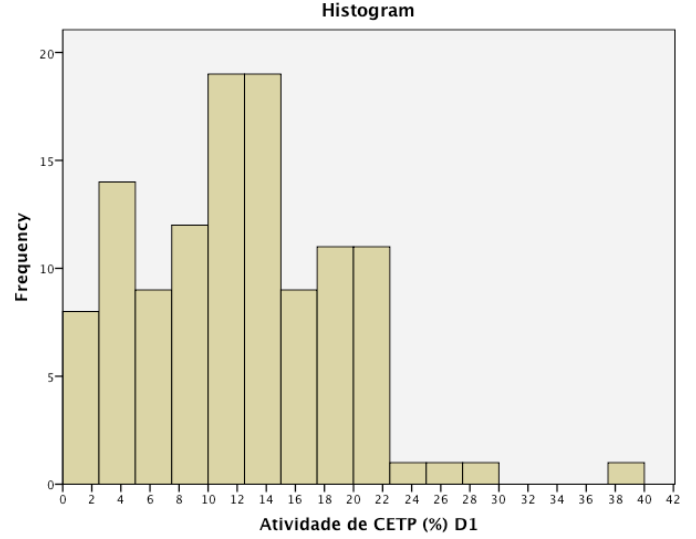
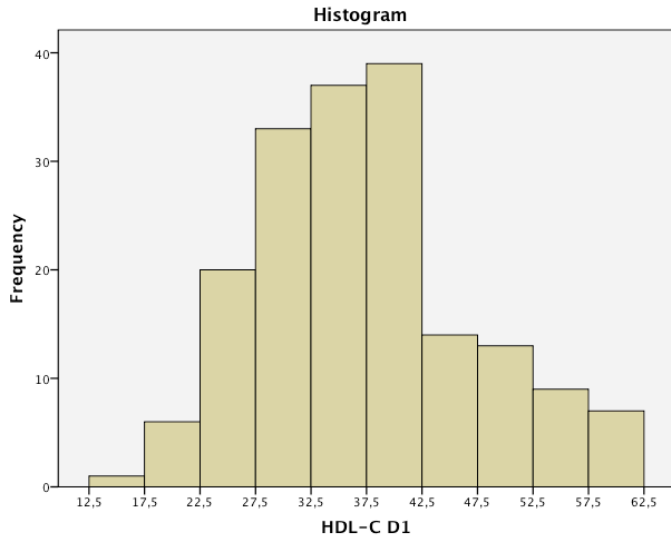
NS: sem uso de estatinas; G20E: uso de 20mg de sinvastatina iniciado nas primeiras 24h dos sintomas; G40E: uso de 40mg de sinvastatina iniciado nas primeiras 24h dos sintomas; G80E: uso de 80mg de sinvastatina iniciado nas primeiras 24h dos sintomas; G80L: uso de 80mg de sinvastatina iniciado após 48h dos sintomas do IMCSST. A atividade inflamatória, medida pela proteína C reativa (PCR) atinge seu pico após 48-72h dos sintomas do IM, de forma que nas primeiras 24h os níveis de citocinas e PCR são comparáveis a pacientes com doenças crônicas. No quinto dia, porém, a atividade inflamatória ainda encontra-se próxima ao seu pico. Extraído de: Sposito et. al. (2011) (Sposito, Santos et al. 2011)

ANEXO C – Correlação entre a Variação (Delta) da auto-oxidação de HDL induzida por sulfato de cobre entre D1 e D5 vs. Dilatação fluxo-mediada (FMD) medida no D30 após o IMCSST



Aumento na vulnerabilidade da HDL à auto-oxidação foi inversamente correlacionada com a FMD, com $r=-0.83$ e $p=0.004$.

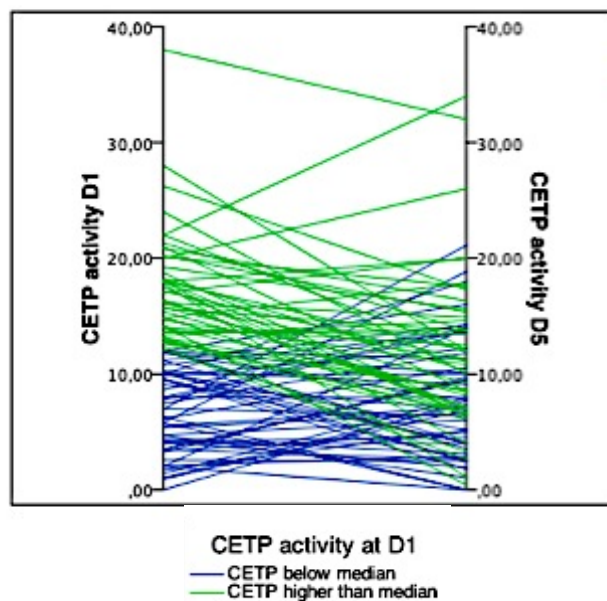
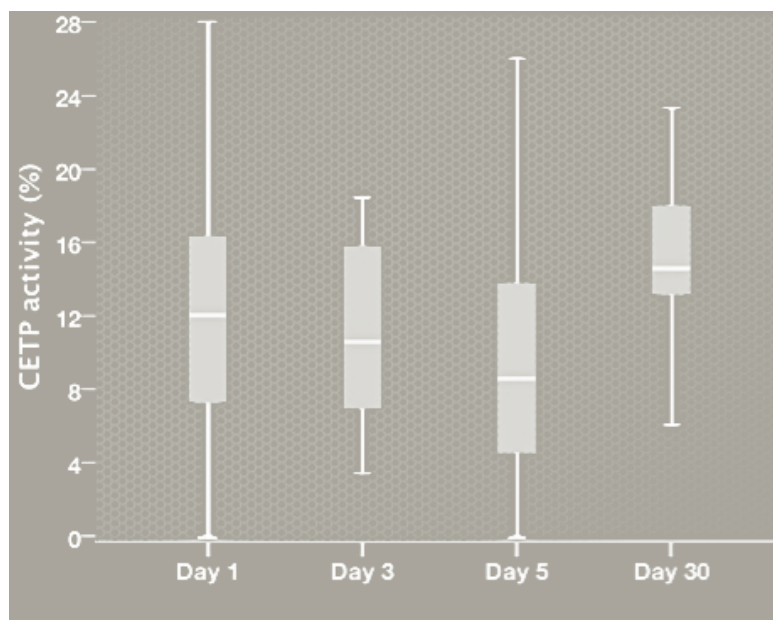
ANEXO D – Histogramas, gráficos de dispersão residual e testes de distribuição para HDL-C e CETP



Testes de Normalidade

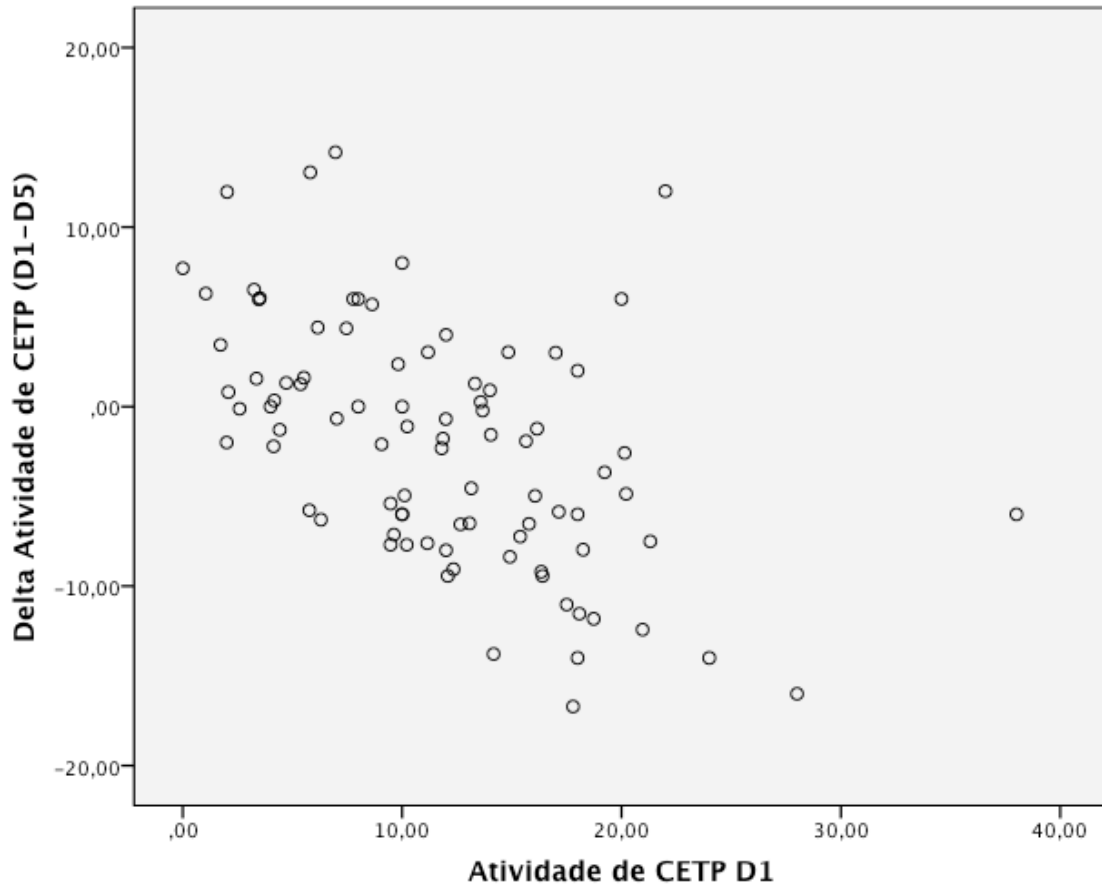
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Atividade CETP D1	0,081	116	0,020	0,970	116	0,011
HDL-C D1	0,092	180	0,001	0,957	180	0,001

ANEXO E – Atividade de CETP no D1, D3, D5 e D30 após o IMCSST – Boxplot e Dispersão dos Valores



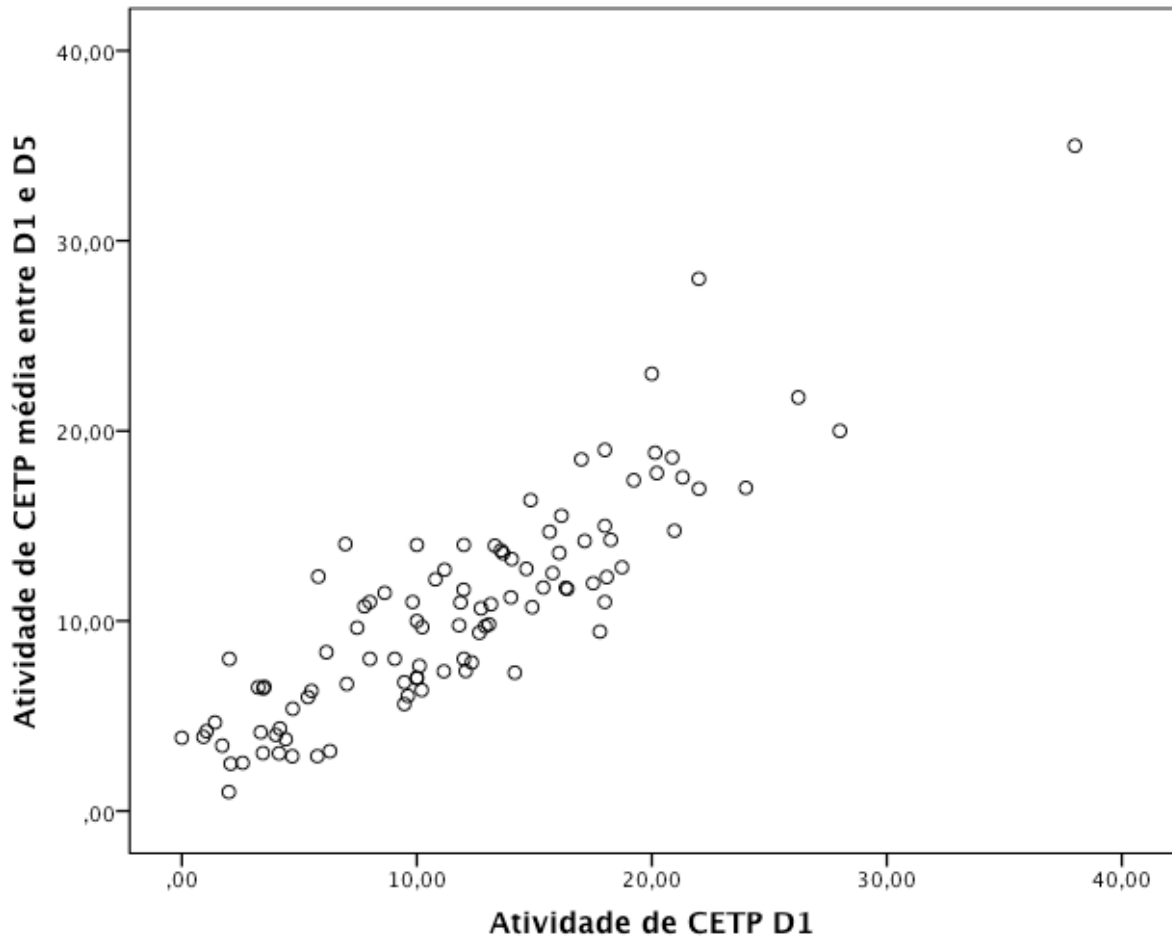
Nas primeiras 24h, existe uma dispersão muito maior da atividade de CETP, enquanto no 3º e 5º dias a dispersão é consideravelmente menor. Verificamos ainda que os pacientes com menor tempo entre os sintomas e a coleta de plasma (<10 horas) no dia da admissão apresentavam atividade de CETP mais elevada comparado com aqueles com tempo entre 10 e 23h ($16.32 \pm 4.5\%$ vs $11.04 \pm 6.0\%$; $p=0.008$).

ANEXO F – Atividade de CETP no D1 vs. Delta da atividade de CETP entre D1 e D5



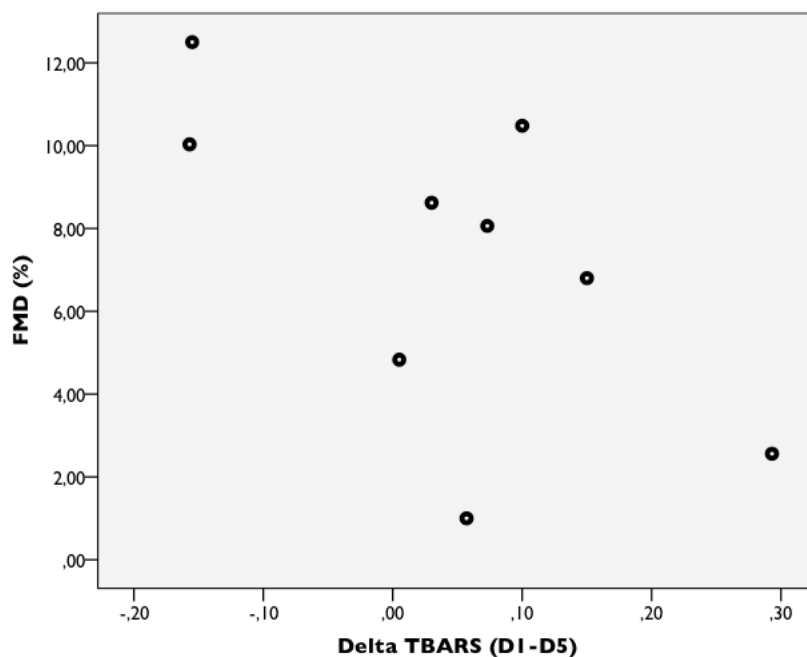
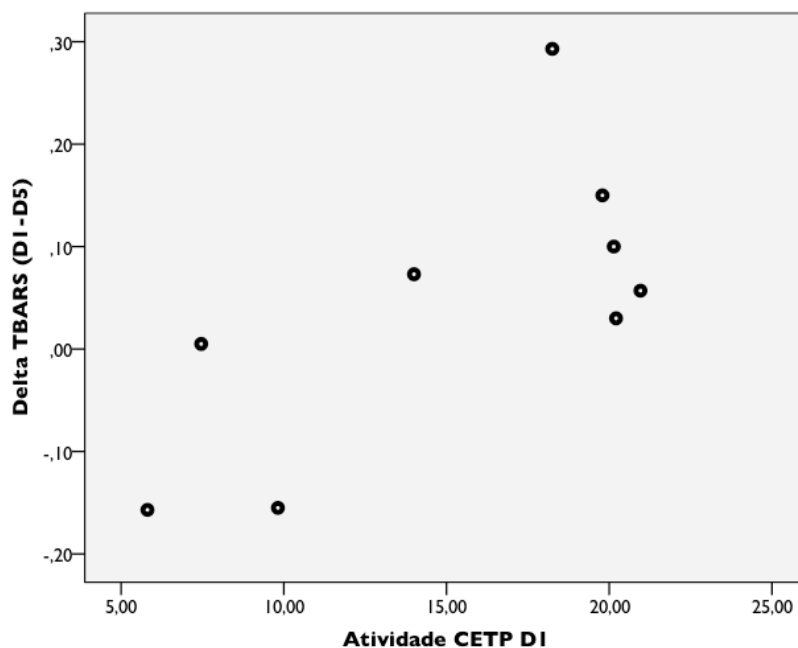
Indivíduos com maior atividade de CETP nas primeiras 24 horas são aqueles que apresentam maior redução da atividade entre D1 e D5, com $r = -0.52$ ($p < 0.001$), porém a maioria dos pacientes com atividade de CETP acima da mediana permanece com atividade mais elevada no D5.

ANEXO G – Atividade de CETP no D1 vs. Atividade média de CETP entre D1 e D5





A figura mostra que existe forte correlação entre a atividade de CETP no D1 e a média da atividade de CETP entre o D1 e o D5, com $r=0.88$ ($p<0.001$)

ANEXO H – Conteúdo de TBARS na HDL isolada vs. Atividade de CETP à admissão e Dilatação fluxo-mediada (FMD)



A atividade de CETP foi diretamente associada ao acúmulo de produtos oxidados (Delta TBARS) na HDL entre o D1 e o D5 [$r=0.72$ ($p=0.014$)] e inversamente associados com a dilatação fluxo-mediada (FMD) [$r= -0.61$ ($p=0.046$)]

 **69º Congresso Brasileiro de Cardiolgia**

 **Sociedade Brasileira de Cardiolgia**

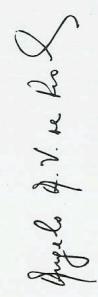
Conferir o prêmio ao tema livre


Elevaros níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL) disfuncional na fase aguda do infarto do miocárdio associam-se a reduzida dilatação fluxo-mediada e biodisponibilidade óxido nítrico

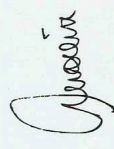
Autoria: Luiz Sérgio Fernandes De Carvalho, Simone Nascimento Dos Santos, Rodrigo Gimenez Pissutti Modolo, Náidlia Baratella Panzoldo, Foncieli Fontana, Jose Carlos Quinaglia F. Silva, Eliana Cotta De Faria, Andrei Carvalho Sposito.

por ter obtido o 1º lugar entre os Melhores Temas Livres Oraís - Jovem Pesquisador no 69º Congresso Brasileiro de Cardiolgia

Brasil, 28 de setembro de 2014

 Angelo Amato Vincenzo de Paola
Presidente da SBC

 Augusto De Marco Martins
Presidente do 69º Congresso da SBC

 Maria da Consolação V. Moreira
Diretora Científica da SBC

CERTIFICADO

XXXIV Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo
Ampliando os horizontes na prevenção cardiovascular

Certificamos que o tema Livre

ELEVADOS NÍVEIS DA CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN (CETP) NA FASE AGUDA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO SE ASSOCIAM A REDUZIDO FLUXO CORONARIANO, HIOPERFUSÃO MIOCÁRDICA E MAIOR MORTALIDADE EM 30 DIAS, SEM INTERFERIR NA RESPOSTA OXIDATIVO-INFLAMATÓRIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS – UNICAMP – SP - BRASIL, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - DF - BRASIL

Luiz Sergio F de Carvalho, Natalia Panzoldo, Simone Santos, Vitor V Wilson, Fernanda Cotta de Faria, Andrei Sposito

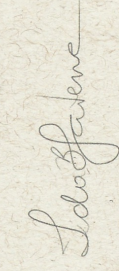
Foi classificado para o **Prêmio Melhor Pesquisa Aplicada "Prof. Dr. Luiz Venere Décourt"**, em sessão realizada no dia 30/05/2013.

São Paulo, 01 de junho de 2013

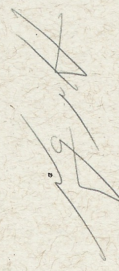
Carga horária: 29h


Dr. Carlos Costa Magalhães
Presidente da SOCESP

Protocolo: 86437
Especialidades:
Cardiologia: 15 - Cirurgia cardiovascular: 10 - Clínica médica: 10


Dra. Ieda Biscegli Jatene
Presidente do Congresso

Áreas de atuação:
Cardiologia pediátrica: 10 - Ecocardiografia: 10 - Ergometria: 10 - Hemodinâmica e cardiologia intervencionista: 10
Eletrofisiologia clínica invasiva: 10 - Ecografia vascular com doppler: 10 - Medicina de urgência: 10


Dr. Miguel Antonio Moretti
Coordenador Executivo

Coordenador Científico


Dr. Mauricio Wajngarten
Coordenador Científico



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Invited commentary

High-density lipoprotein and endothelial function in patients with myocardial infarction: Pieces in a puzzle

Seth S. Martin*, Parag H. Joshi, Michael J. Blaha

Ciccarone Center for the Prevention of Heart Disease, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2014

Accepted 19 October 2014

Available online 22 October 2014

Keywords:

High-density lipoprotein

Nitric oxide

Endothelial function

Myocardial infarction

Like the colorful lights of the aurora borealis, high-density lipoproteins (HDLs) are full of character and inspire wonder. Their extremely heterogeneous polymolecular complexity and multidimensional functionality demands careful scrutiny, or else their wondrous nuances could go unappreciated [1–3]. Indeed, while epidemiological observations have suggested an important role of HDL in protection from cardiovascular disease (CVD), recent clinical trials have tempered enthusiasm over simply raising the quantity of cholesterol within HDL [4–7]. The lack of positive clinical trials in this space has only increased motivation for a deeper understanding of how pieces of the puzzle fit together in the HDL-CVD relationship.

Over the life course of an HDL particle, there is continual remodeling of the lipidome and proteome, and these dynamic structural changes appear to dictate functionality. Reverse cholesterol transport is the classic function, but not necessarily the most important one. Other described HDL functions include platelet reactivity, heme metabolism, vitamin binding, insulin secretion, immunity, and as addressed in this issue by Carvalho et al. [7] – anti-oxidative/anti-inflammatory activity and regulation of endothelial function.

Translational mechanistic studies like Carvalho et al.'s are important to bridging the space between basic science and

outcomes research. In a prospective cohort design, the Brazilian Heart Study investigators examined 180 consecutive patients with ST-elevation myocardial infarction (STEMI). Embracing the dynamic nature of HDL, assessments were performed at admission and again at day 5 and day 30. The analysis showed that those with higher admission HDL cholesterol levels (third tertile >42 mg/dL) had a ~50% lower acute increase in plasma nitric oxide levels compared to those with HDL cholesterol levels <33 mg/dL and relatively less favorable endothelial function (~40% lower) at day 30 by flow-mediated dilatation (FMD). The study team performed a parallel anti-oxidative/anti-inflammatory protocol involving a subset of 9 non-diabetic STEMI patients and 9 age- and sex-matched healthy volunteers. Within 24 h of STEMI admission, HDL showed similar capacity for preventing LDL oxidation relative to healthy subjects, but STEMI patients then demonstrated significant impairment at day 5. It appeared that the acute inflammatory response with STEMI brought dynamic structural changes in HDL (reduction in apoA-I content) associated with impaired anti-oxidant/anti-inflammatory activity, which may underlie the observed relationship between HDL-C and FMD.

Guidelines view FMD as a research tool for non-invasive assessment of vascular endothelial function [8]. After release of arterial compression, blood flow stimulates nitric oxide release in healthy endothelium, inducing vasodilation that can be quantified by ultrasound. Generally considered a technically-challenging technique, FMD is best performed by experienced research teams like the Brazilian Heart Study investigators. When measured in expert laboratories, brachial artery FMD has been linked with invasive coronary endothelial function testing and long-term cardiovascular risk. However, standardizing FMD measurement across individual patients and research labs poses a challenge given the operator-dependency of the technique and possible variations in measurement at different times of day or temperatures, for instance. While FMD as a surrogate end-point is important and interesting, hard outcome data are critical, a lesson that has been learned the hard way in the HDL therapy world [2,6].

Regarding hard clinical outcomes, the authors noted the recent report of a null predictive value for HDL-C in secondary prevention. We [9] along with two other groups [10,11] have reached compatible findings. In addition, it is worth noting that two Mendelian randomization studies were not able to establish a causal

* Corresponding author. Johns Hopkins Hospital, 1800 Orleans Street, Zayed 7125, Baltimore, MD 21287, USA.

E-mail address: smart100@jhmi.edu (S.S. Martin).

role for HDL-C in risk of myocardial infarction [12,13]. This may come as a surprise to many given the widely ingrained beliefs about HDL cholesterol's inverse relationship with risk.

Taking the line of investigation a step beyond total HDL cholesterol, in secondary prevention patients, we examined the risk associations of its two major subclasses: HDL₂-C and HDL₃-C [9]. Participants were from two modern, prospective, cohort studies: Translational Research Investigating Underlying disparities in acute Myocardial infarction Patient's Health status (TRIUMPH) registry and Intermountain Heart Collaborative Study (IHCS). The complementary nature of the study populations enhances their generalizability; TRIUMPH included STEMI and non-STEMI patients from 24 hospitals across the United States while the IHCS involved patients undergoing cardiac catheterization for a spectrum of coronary indications. Although HDL₂-C was not significantly associated with risk, those in the lowest tertile of HDL₃-C had an approximately 50% higher risk of long-term mortality after accounting for potential confounding variables. The smaller, denser, protein-rich HDL₃ subclass tends to carry about three-fourths of HDL cholesterol [9] and most closely relates to the broad range of atheroprotective HDL functions [1]. As Carvalho et al. discuss, an acute inflammatory surge related to myocardial infarction may induce endothelial lipase and phospholipases, and attenuate lecithin-cholesterol acyltransferase activity, in turn, resulting in denser, cholesterol-depleted HDL particles. However, to what extent this explains our results is unclear as blood specimens were drawn near discharge in TRIUMPH and at the time of cardiac catheterization in IHCS, and similar findings were reached.

Similar results were also reached in diverse primary prevention populations inclusive of Caucasian and African-American men and women from the Framingham Offspring Cohort and Jackson Heart Studies, where evidence supports HDL₃-C as the primary link to coronary risk and mortality [14,15]. The longest available follow-up (53 years) comes from Gofman's Livermore Cohort wherein analytic ultracentrifugation was performed at baseline to measure HDL subclass mass [15]. In an analysis of 1144 men, 34% survived to age 85, and the odds of survival were 70% higher for men above the lowest quartile of HDL₃-C compared to men within that lowest HDL₃-C group, a finding that persisted after adjustment for standard risk factors.

Given that low HDL₃-C relates to risk similarly at different time points in the context of secondary prevention, and also in primary prevention, one cannot conclude that the acute HDL changes in the context of myocardial infarction primarily explain the connection between low HDL₃-C and poor prognosis. Still, as the authors point out, evidence indicates that HDL₃ in myocardial infarction patients is especially susceptible to oxidation. We can thus speculate that one reason for the link of low HDL₃-C to higher mortality risk may be poor reserve in the oxidative buffering function of HDL and greater vascular injury that may result. However, we suspect that this would be one of multiple important mechanisms of injury and risk.

Overall, we believe that there has been a long-standing challenge in the HDL field to connect different lines of evidence. From basic research to translational studies to population science to clinical trials, we submit that there is a strong need to work together to build the evidence in a collaborative and complementary fashion. Once pieces of the puzzle start fitting together, then we may start making sense of the mystery that is HDL. It is important to consider how patient characteristics may impact results. The present study population was predominantly composed of Brazilian men, with a large portion of smokers, who were treated with chemical revascularization. Whether the findings would have been similar, for instance, in American women who are non-smokers and treated with percutaneous coronary intervention is

not certain. Also, given statin therapy has an impact on both HDL-C and inflammation, it will be important to carefully scrutinize the relevance of this to the findings. Of course none of the healthy volunteers in this study were taking statins.

In conclusion, Carvalho et al.'s documentation of dynamic structural and functional changes in HDL during STEMI, and connection of these changes with FMD, are an important addition to the literature that further support the growing movement towards a more sophisticated structural-functional characterization of HDL. We look forward to following the Brazilian Heart Study and learning how the findings in this study eventually map to hard clinical outcomes. If our research community continues to be inspired by the complexity of HDL and collaboratively embrace the challenge of trying to understand it, we may fit together the pieces of the puzzle with this intricate lipoprotein and clarify whether it is a viable therapeutic target in CVD.

Support

SSM is supported by the Pollin Cardiovascular Prevention Fellowship, Marie-Josée and Henry R Kravis endowed fellowship, and a National Institutes of Health training grant (T32HL07024). PHJ is supported by the Pollin Cardiovascular Prevention Fellowship and a National Institutes of Health training grant (T32HL007227).

References

- [1] S.S. Martin, S.R. Jones, P.P. Toth, High-density lipoprotein subfractions: current views and clinical practice applications, *Trends Endocrinol. Metab.* 25 (2014) 329–336.
- [2] B.H. Subedi, P.H. Joshi, S.R. Jones, S.S. Martin, M.J. Blaha, E.D. Michos, Current guidelines for high-density lipoprotein cholesterol in therapy and future directions, *Vasc. Health Risk Manag.* 10 (2014) 205–216.
- [3] P.P. Toth, P.J. Barter, R.S. Rosenson, et al., High-density lipoproteins: a consensus statement from the National Lipid Association, *J. Clin. Lipidol.* 7 (2013) 484–525.
- [4] J.W. Gofman, W. Young, R. Tandy, Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity, *Circulation* 34 (1966) 679–697.
- [5] D.J. Gordon, J.L. Probstfield, R.J. Garrison, et al., High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies, *Circulation* 79 (1989) 8–15.
- [6] AIM-HIGH Investigators, W.E. Boden, J.L. Probstfield, et al., Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 2255–2267.
- [7] L.S. Carvalho, N. Panzoldo, S.N. Santos, et al., HDL levels and oxidizability during myocardial infarction are associated with reduced endothelial-mediated vasodilation and nitric oxide bioavailability, *Atherosclerosis* (2014) (In press).
- [8] P. Greenland, J.S. Alpert, G.A. Beller, et al., ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines, *J. Am. Coll. Cardiol.* 56 (2010) e50–103.
- [9] S.S. Martin, A.A. Khokhar, H.T. May, et al., HDL cholesterol subclasses, myocardial infarction, and mortality in secondary prevention: the lipoprotein investigators collaborative, *Eur. Heart J.* (2014 Jun 30) pii: ehu264. (Epub ahead of print).
- [10] G. Silbernagel, B. Schottker, S. Appelbaum, et al., High-density lipoprotein cholesterol, coronary artery disease, and cardiovascular mortality, *Eur. Heart J.* 34 (2013) 3563–3571.
- [11] E. Angeloni, F. Paneni, U. Landmesser, et al., Lack of protective role of HDL-C in patients with coronary artery disease undergoing elective coronary artery bypass grafting, *Eur. Heart J.* 34 (2013) 3557–3562.
- [12] B.F. Voight, G.M. Peloso, M. Orho-Melander, et al., Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study, *Lancet* 380 (2012) 572–580.
- [13] M.V. Holmes, F.W. Asselbergs, T.M. Palmer, et al., Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease, *Eur. Heart J.* (2014 Jan 27) (Epub ahead of print).
- [14] P.H. Joshi, P.P. Toth, S.T. Lirette, et al., Association of high-density lipoprotein subclasses and incident coronary heart disease: the Jackson Heart and Framingham offspring cohort studies, *Eur. J. Prev. Cardiol.* (2014 Jul 25) pii: 2047487314543890. (Epub ahead of print).
- [15] P.T. Williams, Low high-density lipoprotein 3 reduces the odds of men surviving to age 85 during 53-year follow-up, *J. Am. Geriatr. Soc.* 60 (2012) 430–436.