

## Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica

*Myeloperoxidase and Coronary Arterial Disease: From Research to Clinical Practice*

Raquel Melchior Roman<sup>1,4</sup>, Andrea Elisabet Wendland<sup>2,4</sup>, Carisi Anne Polanczyk<sup>3,4</sup>

Departamento de Cardiologia do Hospital São Vicente de Paulo<sup>1</sup>, Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>2</sup>, Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>3</sup>, Programa de Pós-Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul<sup>4</sup>, Passo Fundo, Porto Alegre, RS - Brasil

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes. Além de integrantes da resposta imune inata, evidências têm comprovado a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante inflamação. A MPO participa de atividades biológicas pró-aterogênicas relacionadas à evolução da doença cardiovascular, incluindo iniciação, propagação e as fases de complicação aguda do processo aterosclerótico. Dessa forma, a MPO e sua cascata inflamatória representam um alvo atrativo para investigação prognóstica e terapêutica na doença aterosclerótica cardiovascular. Nesta revisão, apresentamos o estado da arte no entendimento das ações biológicas às evidências clínicas da relação entre MPO e doença arterial coronariana. Vários estudos apontam para o efeito independente dos níveis de MPO na evolução da doença e ocorrência de eventos em pacientes com síndrome coronariana aguda. Entretanto, ainda não é consistente o valor preditivo adicional dos níveis de MPO na estratificação de risco cardiovascular para incorporá-la à prática clínica como sinalizadora de vulnerabilidade de placa. Estudos adicionais são necessários para confirmar seu papel nas diferentes formas de apresentação da cardiopatia isquêmica, além da padronização do ensaio, ponto fundamental para a transição desse marcador do ambiente de pesquisa para uso na rotina clínica.

### Introdução

A inflamação tem sido relacionada a diversos estágios do desenvolvimento da placa aterosclerótica, desde o depósito lipídico à ruptura da placa e suas complicações trombóticas. Inúmeros estudos epidemiológicos têm avaliado os marcadores inflamatórios (proteína C reativa, citocinas, moléculas de adesão, contagem de leucócitos totais) e sua aplicabilidade clínica como preditores de risco para doença cardiovascular (DCV)<sup>1-3</sup>.

### Palavras-chave

Peroxidase, inflamação, aterosclerose, arteriosclerose coronariana.

**Correspondência: Raquel Melchior Roman •**

Rua Capitão Eleutério, 111/202 - Centro - 99010-060 - Passo Fundo, RS - Brasil  
E-mail: rmelchior@cardiol.br

Artigo recebido em 24/09/07; revisado recebido em 04/12/07; Aceito em 10/12/07

Reagentes de fase aguda como a proteína C reativa (PCR), marcadores de inflamação sensíveis, mas pouco específicos, estão aumentados em estágios precoces e tardios de lesões ateroscleróticas. Sua detecção como marcador sérico preditor de risco para doença arterial coronariana em estudos epidemiológicos tem embasado sua utilização como parte da avaliação preventiva de risco cardiovascular<sup>4</sup>. Contudo, muitos pacientes com risco de eventos cardiovasculares primordiais ainda não são precocemente identificados, e as manifestações súbitas freqüentemente demandam procura por serviços de emergência. Assim, há necessidade de identificar marcadores adicionais para avaliação de risco de eventos cardiovasculares, principalmente aqueles relacionados à vulnerabilidade de placa<sup>5-7</sup>.

A ruptura ou erosão de placas com formação de trombo intramural representa a mais importante modificação morfológica na transformação de lesões coronarianas estáveis em clinicamente instáveis. O substrato anatomopatológico dessas complicações é heterogêneo com respeito à arquitetura e composição da placa, mas a presença do processo inflamatório localizado tem surgido como denominador comum. Enquanto linfócitos e monócitos têm sido considerados importantes contribuintes na fisiopatologia da doença cardiovascular, principalmente pela geração de citocinas pró-inflamatórias, os neutrófilos polimorfonucleares podem modular e sinalizar rotas inflamatórias pela secreção de enzimas que interagem em órgãos-alvo. O papel dos neutrófilos nos locais de lesão tecidual é bastante complexo, mas pode ser sumarizado pela ação de endocitose de material estranho e secreção de enzimas intracelulares, como elastase, endopeptidases e mieloperoxidase (MPO)<sup>8</sup>.

A síntese de MPO ocorre durante a diferenciação mielóide na medula óssea e está completa dentro dos granulócitos previamente à sua entrada na circulação. Essa enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Representa mais de 5% do conteúdo protéico total da célula em neutrófilos e 1% nos monócitos<sup>9</sup>.

A MPO é uma proteína catiônica, com peso molecular de 144 kD, que consiste em dois dímeros idênticos ligados por uma ponte de bissulfeto, sendo cada dímero composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupos heme funcionalmente idênticos. É o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, prontamente liberada após ativação por diferentes agonistas, contribuindo para a defesa imune inata do organismo<sup>9-11</sup>.

Crescentes evidências demonstram o papel da MPO como participante central do elo entre inflamação e doença cardiovascular. A mieloperoxidase, pela reação com peróxido de hidrogênio, forma radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis com atividade antimicrobiana, mas também promove dano oxidativo do tecido do hospedeiro, por exercer efeitos pleiotrópicos na vasculatura com potencial impacto no desenvolvimento de aterosclerose, disfunção endotelial, instabilidade de placa e resposta no remodelamento ventricular após injúria isquêmica<sup>12-14</sup> (fig. 1).

### Mecanismos bioquímicos da relação entre mieloperoxidase e doença cardiovascular

A participação da mieloperoxidase na composição da carga lipídica do ateroma vascular, na ativação de proteases e em mecanismos de vasoconstrição e trombose torna consistente o envolvimento dessa heme proteína no desenvolvimento da doença aterosclerótica e de suas complicações trombóticas (tab. 1).

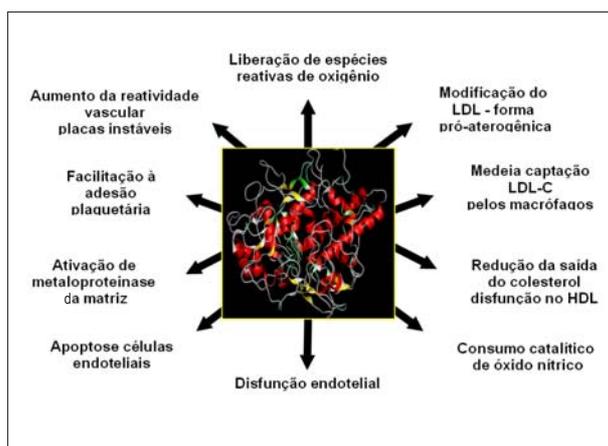


Fig. 1 - Potenciais mecanismos da mieloperoxidase na aterogênese (adaptada de Hasson e cols.9 e Nicholls e Hazen<sup>12</sup>).

### Mieloperoxidase como catalisadora da oxidação lipídica: efeitos sobre a LDL e a HDL

A modificação oxidativa da LDL leva ao aumento de sua recaptação e degradação por macrófagos, resultando em depósito de colesterol e formação de células espumosas, a marca celular das estrias gordurosas.

Estudos recentes apontam os prováveis mecanismos pelos quais a mieloperoxidase é capaz de promover oxidação de lipoproteínas *in vivo*<sup>15-21</sup>. Macrófagos utilizam NADPH oxidase para produzir superóxido ( $O_2^-$ ) que pode dismutar e formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A MPO catalisa reações com  $H_2O_2$  para gerar oxidantes citotóxicos mais potentes como HOCl (ácido hipocloroso) e radical tiosil, sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl. Por meio de ensaios de alta sensibilidade e especificidade, diversos produtos finais estáveis gerados por essas espécies têm sido detectados em placas ateroscleróticas<sup>15-17</sup>.

A MPO tem a habilidade de modificar oxidativamente o aminoácido tirosina da apolipoproteína B-100 (apo B-100), usando  $H_2O_2$  e íon Cl<sup>-</sup> para gerar 3-clorotirosina. Pode também nitratar a tirosina oxidando nitrito ( $NO_2^-$ ), produto final do metabolismo do óxido nítrico (ON), gerando 3-nitrotirosina<sup>18,19</sup>. Além de marcadores da atividade da MPO, a 3-clorotirosina e 3-nitrotirosina têm importância clínica por promover dano oxidativo, o que contribui para a aterosclerose.

Podrez e cols.<sup>18,20</sup> caracterizaram o sistema MPO-  $H_2O_2$ -  $NO_2^-$  como rota preferencial, utilizada por monócitos, para converter LDL em formas aterogênicas com maior afinidade pelo receptor CD36, principal receptor de macrófagos para LDL oxidado diretamente envolvido na formação de células espumosas *in vivo*.

Mais recentemente, demonstrou-se que a HDL é também suscetível a modificações oxidativas mediadas por mieloperoxidase por nitratação ou halogenação de resíduos tirosina na apolipoproteína AI (apo AI). Estas prejudicam a habilidade da proteína de promover o transporte reverso de colesterol dependente de ABCA-1, contribuindo para a formação de lesões ateroscleróticas<sup>21-23</sup>.

Tabela 1 – Mecanismos bioquímicos da MPO e relação com doença cardiovascular

Mecanismos	Rotas bioquímicas	Consequência
Catalisação oxidação lipídica	Compostos Halogenados (HOCl) Radical tiosil Espécies reativas de nitrogênio	LDL oxidado com maior afinidade CD36 → Formação células espumosas  HDL: Alvo oxidação APO A1 → Redução transporte reverso ABCA-1
Disfunção endotelial	Consumo fisiológico oxidativo ON Redução atividade ON-sintetase e cofatores (NADPH)	Prejuízo relaxamento vascular Agregação plaquetária Recrutamento e ativação de leucócitos
Promoção estresse oxidativo	Geração oxidantes nitrados: (NO <sub>2</sub> ) e nitrotirosina	Lesão vascular e promoção aterogênese
Modulação cascata Proteases	Inativação inibidores proteases (α-1-antitripsina, TIM, PAI-1) Ativação formas latentes (proelastases e MMP)	Degradação e ruptura capa fibrótica da placa aterosclerótica Remodelamento ventricular
Aumento trombogenicidade	HOCl: apoptose cels. endoteliais Aumento expressão e ativação fator tecidual Aumento expressão endotelial de moléculas de adesão (selectinas)	Ativação e agregação plaquetária – Formação trombo intraluminal

## Atualização Clínica

### A mieloperoxidase e o metabolismo do óxido nítrico: contribuição para a disfunção endotelial

A disfunção endotelial vascular que afeta a resposta vasomotora ao óxido nítrico (ON) é um fenômeno bem estabelecido na doença cardiovascular, e alguns mecanismos peroxidase-mediados têm sido recentemente estudados. Abu-Soud e Hazen<sup>24</sup> demonstraram que todos os membros da superfamília de heme peroxidases, da qual a mieloperoxidase é o protótipo, são capazes de cataliticamente consumir ON sob condições fisiológicas, limitando sua biodisponibilidade. Além do consumo catalítico, oxidantes gerados são capazes de inibir a atividade do ON sintetase e reduzir seus co-fatores como NADPH. Estudos histopatológicos demonstram o acúmulo de MPO no endotélio vascular e sua combinação com nitrotirosina no espaço subendotelial de lesões ateroscleróticas, interferindo localmente no efeito do ON na parede dos vasos<sup>25</sup>.

Níveis séricos de MPO mensurados em 298 indivíduos demonstraram ser preditores independentes de disfunção endotelial, avaliada pela resposta vasodilatadora mediada por fluxo da artéria braquial por ultra-som. Após ajuste para presença de fatores de risco cardiovasculares tradicionais, medicações e presença de doença arterial coronariana, indivíduos com níveis de MPO no maior quartil apresentaram probabilidade 6,4 vezes maior de desenvolver disfunção endotelial em relação ao menor quartil<sup>26</sup>.

### Mieloperoxidase e vulnerabilidade da placa

A maioria dos estudos que avaliam o papel da mieloperoxidase na doença cardiovascular focam os estágios precoces do processo. Entretanto, estudos recentes ressaltam a ação moduladora da MPO sobre a cascata de proteases, participando das complicações agudas da aterosclerose, estímulo a trombogenicidade e vulnerabilidade de placa<sup>27</sup>.

Um extenso infiltrado de monócitos e neutrófilos é tipicamente descrito em placas fissuradas e trombadas em autópsia de pacientes com síndromes coronarianas agudas (SCA)<sup>28,29</sup>. Em situações de ativação leucocitária, a MPO é secretada de grânulos citoplasmáticos para fagolisossomas e espaço extracelular com extensa impregnação em locais de ruptura de placa. Buffon e cols.<sup>30</sup> documentaram a redução do conteúdo intracelular de MPO leucocitária em pacientes com angina instável submetidos a cateterismo cardíaco, em amostras coletadas do seio coronariano e da artéria femoral. O gradiente de ativação foi independente da localização da estenose responsável pela isquemia, introduzindo o conceito da ativação leucocitária generalizada no leito coronariano amplamente inflamado nas SCA.

A ligação da MPO com ativação da cascata de proteases ocorre pela inativação oxidativa de inibidores de proteases ( $\alpha$ -1-antitripsina, inibidor tecidual das metaloproteinasas (TIM) e inibidor do plasminogênio ativado (PAI-1)) e ativação de formas latentes como as proelastases e metaloproteinasas (MMP). As MMP afetam o remodelamento e a estabilidade de placas ateroscleróticas. Fu e cols.<sup>31</sup> demonstraram a geração de espécies oxidativas de HOCl por mieloperoxidasas ativando a promatrilisina (MMP-7) capaz de promover degradação de matriz extracelular da capa fibrosa, potencialmente

relacionando-as ao mecanismo de ativação e ruptura de placa aterosclerótica.

Em estudo *in vitro*, foi demonstrado que a incubação de células endoteliais com baixas doses de MPO ou macrófagos expressando MPO resulta em aumento da expressão e atividade do fator tecidual, favorecendo a trombogenicidade. O HOCl, derivado da MPO, pode induzir morte de células endoteliais e descamação por mecanismos oncóticos e apoptose, com estímulo à ativação e agregação plaquetária<sup>32</sup>.

A habilidade da MPO de reduzir a biodisponibilidade de ON torna a superfície endotelial, normalmente antitrombótica, trombogênica pela expressão de vários fatores pró-trombóticos e antifibrinolíticos.

### Mieloperoxidase e remodelamento ventricular

A migração de leucócitos para zona perinecrose e a perfusão de artérias ocluídas expõem o território isquêmico a mais inflamação e estresse oxidativo. É possível que o aumento da atividade da MPO que acompanha modelos de lesão de isquemia e reperfusão contribua para o dano tecidual e a extensão do infarto resultantes.

A MPO pode contribuir para a disfunção miocárdica e o remodelamento ventricular adverso após o infarto, por meio de vários potenciais mecanismos. A MPO gera inúmeros oxidantes reativos e espécies citotóxicas, incluindo aldeídos, que podem modificar covalentemente resíduos críticos em canais-chave iônicos ou transportadores, contribuindo para o prejuízo da função contrátil após episódios de isquemia. Os fenômenos de isquemia e reperfusão miocárdica estimulam o recrutamento de polimorfonucleares (PMN), e a disfunção microvascular associada tem sido também atribuída ao decréscimo da biodisponibilidade de ON vascular. O mecanismo predominante ocorre pela rápida reação com superóxido derivado da NADPH oxidase de neutrófilos PMN recrutados e ativados nos tecidos inflamados<sup>33</sup>.

Além disso, a MPO pode afetar o remodelamento ventricular pós-infarto pela ativação da cascata da protease. A inativação do PAI-1 por oxidação catalisada pela MPO resulta em aumento da atividade da plasmina que acelera a degradação da matriz, um requisito para o afinamento da parede ventricular e dilatação da câmara. Askari e cols.<sup>34</sup>, ao estudarem ratos nulos para MPO (MPO<sup>-/-</sup>) com infarto agudo do miocárdio (IAM), demonstraram redução da infiltração leucocitária, menor dilatação ventricular e preservação da função sistólica.

Vasilyev e cols.<sup>35</sup> demonstraram que há significativo aumento na geração de aldeídos em tecidos pós-infartados de ratos selvagens em relação aos MPO<sup>-/-</sup>, apontando claramente para o papel da MPO na formação dessas espécies. O estudo demonstra que aldeídos derivados da oxidação de aminoácidos comuns, catalisada pela MPO, representam um mecanismo rápido e relevante para a geração de espécies citotóxicas em sítios inflamatórios.

### Mieloperoxidase: polimorfismos e mutações

Embora previamente descrita como um distúrbio genético raro, a deficiência hereditária de MPO é relativamente

comum nos Estados Unidos e na Europa, com prevalência de 1:2.000 a 1:5.000 indivíduos, sendo menos freqüente no Japão, 1:55.000<sup>9</sup>.

Uma variedade de mutações que resultam na deficiência de MPO tem sido relatada. Estas afetam a biossíntese de MPO, impedindo que a enzima seja processada até a fase madura ou apresente baixa atividade de peroxidase<sup>9</sup>. Estudo transversal com 92 indivíduos com deficiência de mieloperoxidase demonstrou significativa redução da prevalência de doença cardiovascular<sup>36</sup>.

Alguns polimorfismos são descritos para o gene da MPO, incluindo um polimorfismo funcional localizado na região promotora do gene que afeta sua transcrição<sup>37</sup>.

O polimorfismo – 463 G/A, que consiste na substituição de G por A na posição 463pb, provoca redução da expressão de MPO no genótipo AA, níveis intermediários no GA e maior quantidade de MPO intracelular no genótipo GG. Nikpoor e cols.<sup>38</sup> demonstraram, em estudo de caso-controle, a associação entre polimorfismo do gene da MPO e doença arterial coronariana (DAC). Comparando 229 pacientes com coronariopatia e 217 controles, encontraram papel protetor do alelo A, e indivíduos com duas cópias do alelo A apresentaram menor chance de desenvolver DAC quando comparados com indivíduos AG ou GG.

Em estudo de coorte, avaliou-se o risco para eventos cardiovasculares associados ao genótipo GG. Foram estudados 139 pacientes com doença coronariana, sendo 89 (64%) GG, 45 (32%) GA e 5 (4%) AA, acompanhados por 45 ± 19 meses. Pacientes com genótipo GG apresentaram maior taxa de eventos (óbito, infarto, internação por angina instável) que o grupo GA/AA, 19 vs 4%,  $p = 0,02$ <sup>39</sup>.

### Mieloperoxidase em placas ateroscleróticas e em “lesões culpadas”

Naruko e cols.<sup>29</sup> analisaram a presença de neutrófilos em 126 segmentos de artérias coronárias obtidos em autópsias ou durante procedimentos de aterectomia. A análise imunoistoquímica com diferentes anticorpos foi utilizada para identificação de neutrófilos: anti-CD66b, elastase, mieloperoxidase mono e policlonal e CD 11b. Todas as placas rotas ou erosadas dos pacientes com IAM expressaram infiltração de neutrófilos comparados com rara detecção em lesões coronarianas de pacientes com morte não-cardíaca. Achados similares foram obtidos em espécimes de aterectomia, em 35 pacientes com angina estável (AE) e 32 com angina instável (AI). Nos pacientes com AI, foi documentada a expressão de neutrófilos em 44% das lesões culpadas, e nos com AE somente em 6%. Essas observações sugerem que a infiltração de neutrófilos está ativamente associada com eventos coronarianos agudos.

Sugiyama e cols.<sup>28</sup> demonstraram, em placas ateroscleróticas de pacientes com morte súbita, maior expressão de MPO nos locais de ruptura, em erosões superficiais e no centro lipídico, enquanto estrias gordurosas exibiram menor expressão. Além disso, foi demonstrada associação da expressão de MPO nos macrófagos e de HOCl por técnicas de imunoistoquímica em lesões culpadas.

### Mieloperoxidase na doença coronariana estável

Zhang e cols.<sup>40</sup> conduziram um estudo caso-controle para determinar a associação entre os níveis de MPO e a prevalência de cardiopatia isquêmica crônica em 158 pacientes submetidos a cateterismo cardíaco com DAC estabelecida e 175 pacientes sem DAC angiograficamente significativa. Em modelos multivariados, ajustados para fatores de risco tradicionais, escore de risco de Framingham e contagem de leucócitos, os níveis de MPO foram significativamente associados com a presença de DAC com RC de 12 para o maior quartil de MPO leucocitária e 20 para a MPO sérica.

Por sua vez, o valor prognóstico da MPO para ocorrência de eventos em pacientes estáveis ainda não está clara. Em uma coorte de 178 pacientes com angina estável, em acompanhamento em ambulatório especializado de cardiopatia isquêmica no Brasil, foi avaliado o valor prognóstico dos níveis de mieloperoxidase. Durante o seguimento médio de 12 ± 5 meses, 26 (14%) dos pacientes apresentaram um evento cardiovascular maior (morte, infarto, revascularização, síndrome coronariana aguda ou vascular periférica), entretanto não houve diferença significativa nos níveis de MPO entre os grupos com e sem eventos<sup>41</sup>.

### Mieloperoxidase em pacientes com dor torácica

Brennan e cols.<sup>42</sup> avaliaram o valor dos níveis plasmáticos de MPO como preditor de risco para eventos cardiovasculares em 604 pacientes consecutivos atendidos no departamento de emergência por dor torácica com suspeita de origem cardíaca. A dosagem de MPO na admissão, tempo médio de 4 horas do início da dor, foi preditor independente de risco para eventos coronarianos maiores em 30 dias (infarto, necessidade de revascularização ou óbito); RC 2º quartil 1,7 (1,1-2,8), 3º quartil 3,2 (2,0-5,4) e 4º quartil 4,7 (2,8-7,7) e em 6 meses. Em pacientes sem evidência de necrose, definida pela dosagem de troponina negativa em 16 horas de monitorização, o risco de revascularização e eventos cardíacos maiores combinados em 30 dias e 6 meses também foi maior com o aumento dos quartis de MPO. Utilizando o ponto de corte de 198 pM derivado da curva ROC, a adição de mieloperoxidase à troponina, como teste de rastreamento, melhorou a habilidade de identificar pacientes com risco de eventos em 30 dias de 58% para 84,5% ( $p < 0,001$ ). Esse foi o primeiro trabalho da literatura que demonstrou a utilidade da dosagem de MPO na triagem de pacientes na emergência para estratificação do risco para eventos cardiovasculares. Mesmo em pacientes em que foi excluído infarto, baseado na medida de troponina, o aumento dos níveis de MPO na apresentação foi preditor de eventos. Outra vantagem é que, enquanto os níveis circulantes de troponina aumentam em 3 a 6 horas após injúria miocárdica, os níveis de MPO foram significativamente elevados na apresentação (mesmo em 2 horas de início dos sintomas), em pacientes com troponina inicialmente negativa. Esses achados sugerem que a MPO seja um marcador de SCA precedendo a necrose, um preditor de placa vulnerável.

### Mieloperoxidase na síndrome coronariana aguda

Pesquisadores do estudo CAPTURE, que incluiu 1.090 pacientes com SCA e angina recorrente necessitando intervenção coronariana percutânea, avaliaram o valor prognóstico dos níveis de MPO. Os níveis séricos de MPO mostraram correlação com fatores de risco tradicionais, mas não se correlacionaram com níveis de troponina, CD 40 ligante solúvel, proteína C reativa (PCR) ou alterações eletrocardiográficas. Contudo, pacientes com níveis elevados de MPO, 31,3% da amostra, apresentaram um aumento de risco para o desfecho morte ou infarto em 72 horas até 6 meses, RR 2,25 (1,32-3,8). Em particular, níveis de MPO >350 µg/l identificaram um subgrupo de pacientes sob risco aumentado para eventos, mesmo com troponina normal (15,9% vs 2%,  $p = 0,001$ )<sup>43</sup>.

Em pacientes com SCA, os níveis de MPO parecem prever aumento de risco para eventos cardiovasculares subsequentes e estendem as informações prognósticas de outros biomarcadores tradicionais. Com troponina, a MPO identificou 95% de todos os eventos adversos do estudo CAPTURE. A estratificação de risco em pacientes com SCA é o principal objetivo para selecionar o regime terapêutico farmacológico e intervencionista. A troponina é o melhor marcador prognóstico estabelecido para prever eventos e identificar pacientes com maior benefício para estratégias agressivas. Como reflete necrose miocárdica, esforços têm sido estabelecidos para identificar pacientes em risco durante estágios mais precoces da doença. A mieloperoxidase sinaliza e identifica o estado de inflamação aguda da circulação coronariana, pelo aumento da ativação de neutrófilos que precede a injúria miocárdica.

Em nosso meio, o valor prognóstico da dosagem de mieloperoxidase foi avaliado em um grupo de 130 pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA). Níveis elevados de MPO na admissão hospitalar conferiram aumento de risco de 3,8 vezes para incidência de eventos cardiovasculares intra-hospitalares (óbito, angina recorrente, insuficiência cardíaca e arritmia grave), independentemente de outros preditores avaliados, como idade, dislipidemia, alterações isquêmicas no eletrocardiograma, troponina e PCR. Esses achados reproduzem o risco estimado pelo estudo CAPTURE com similar magnitude em uma amostra não selecionada de pacientes com SCA<sup>44</sup>.

Cavusoglu e cols.<sup>45</sup> avaliaram o valor prognóstico em longo prazo dos níveis de MPO em 193 homens com SCA e demonstraram que a dosagem de MPO basal foi um preditor independente de infarto em 24 meses.

Biasucci e cols.<sup>46</sup> conduziram estudo para avaliar a prevalência e o momento de ativação de neutrófilos no curso das SCA, além da relação temporal entre os episódios de isquemia recorrente e a ativação de neutrófilos. Avaliaram o índice de mieloperoxidase intracelular que quantifica a atividade média da MPO em toda a população de neutrófilos. Em indivíduos normais, o índice é próximo a zero. Valores positivos aparecem quando os neutrófilos estão ricos em MPO e valores negativos quando há depleção da enzima, que tipicamente ocorre após ativação de neutrófilos. O índice

intracelular foi significativamente reduzido em pacientes com angina instável e infarto do miocárdio, comparado com pacientes com angina estável crônica e indivíduos normais. Durante o acompanhamento na unidade coronariana sob monitorização eletrocardiográfica, não houve alteração no índice de MPO antes ou após os episódios isquêmicos comparados com valores basais, nem correlação com o momento ou a duração da isquemia documentada.

Gach e cols.<sup>47</sup> avaliaram a ativação de PMN em pequena amostra de pacientes com angina instável submetidos a cateterismo cardíaco. Foi documentado o aumento significativo dos níveis de MPO em medidas seriadas, nas primeiras 24 horas do exame em pacientes submetidos à angioplastia com implante de *stent* coronariano em relação ao grupo em que foi realizado apenas cateterismo diagnóstico.

Khan e cols.<sup>48</sup> estudaram 384 pacientes pós-infarto com supradesnivelamento de ST, para determinar o valor prognóstico dos níveis de MPO e NT-BNP (N-terminal peptídeo natriurético tipo pro-B). Utilizou-se o valor da mediana das dosagens durante os cinco dias do início da dor torácica. Os níveis de MPO foram significativamente maiores em pacientes que apresentaram o desfecho primário (morte ou readmissão por infarto), quando comparados com sobreviventes sem infarto recorrente. Utilizando modelo de regressão logística, a combinação dos marcadores MPO e NT-BNP melhorou a acurácia para 76%, excedendo a de qualquer peptídeo isoladamente.

O prognóstico em longo prazo da MPO e dos marcadores de oxidação protéica foi também avaliado por Mocatta e cols.<sup>49</sup> em 512 pacientes admitidos com infarto agudo do miocárdio. A MPO e o carbonil proteína foram mais elevados no plasma de pacientes com infarto, em 24 a 96 horas da admissão, que em controles. Entretanto, apenas os níveis de MPO e não de carbonil proteína foram preditores independentes de mortalidade no seguimento de cinco anos. Pacientes com níveis de MPO acima da mediana, em combinação com níveis elevados de NT pro-BNP e reduzida fração de ejeção, apresentaram significativa redução de sobrevida. A MPO elevada, portanto, adicionou informação prognóstica para mortalidade em longo prazo quando usada com marcadores estabelecidos, como NT pro-BNP e função ventricular.

### Mieloperoxidase e insuficiência cardíaca

Tang e cols.<sup>50</sup>, em estudo transversal, avaliaram os níveis de MPO em 102 pacientes com diagnóstico de insuficiência cardíaca (fração de ejeção < 50%) e 105 controles saudáveis. Os níveis de MPO foram significativamente maiores em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) crônica sistólica (1.158 vs 204 pM,  $p < 0,0001$ ). Os níveis de MPO aumentaram com a progressão da classe funcional da New York Heart Association (NYHA) e correlacionaram-se com níveis de BNP. Essa forte associação dos níveis de MPO com a prevalência de IC foi independente de outros fatores, como idade e níveis de BNP, RC 27 (IC 95%: 3,6 – 37).

Em um estudo populacional prospectivo de rastreamento para IC na comunidade, foram avaliados 1.360 pacientes pela dosagem de múltiplos marcadores. A dosagem de MPO e PCR adicionalmente ao BNP demonstrou atingir a melhor

especificidade, 94,3%, para o diagnóstico de disfunção ventricular sistólica<sup>51</sup>.

Recentemente, pesquisadores do European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) publicaram um estudo de casos e controles, no qual incluíram 3.375 indivíduos saudáveis da coorte populacional de Norfolk, Reino Unido, demonstrando que níveis elevados de MPO são associados com aumento de risco futuro de eventos cardiovasculares, independentemente de fatores de risco tradicionais<sup>52</sup>.

## Mieloperoxidase e terapêutica

A participação da MPO com suas atividades pró-aterogênicas em diversos estágios da doença cardiovascular tem estimulado o interesse no desenvolvimento de terapêuticas específicas anti-MPO<sup>12</sup>. Uma grande dificuldade no desenvolvimento de inibidores é a preocupação de que o fármaco possa comprometer a defesa imune inata.

As estatinas têm reduzido os níveis de oxidantes derivados de MPO e ON, sobretudo de nitrotirosina, independentemente dos efeitos de redução de lípidos, o que sugere que as propriedades antiinflamatórias e antioxidantes devem ser incluídas nos efeitos pleiotrópicos atribuídos a essas drogas<sup>53,54</sup>. Zhou e cols.<sup>55</sup> avaliaram o efeito da atorvastatina nos níveis de MPO e PCR, em 78 pacientes com SCA. Os pacientes foram randomizados para tratamento convencional e 10 mg/dia de atorvastatina ou tratamento sem hipolipemiantes. Dosagens dos marcadores demonstraram a redução adicional dos níveis de MPO (16% vs 8%,  $p = 0,01$ ) após uma semana de tratamento.

Baldus e cols.<sup>56</sup> avaliaram o efeito da administração de heparina durante o cateterismo cardíaco em 109 pacientes, demonstrando aumento nos níveis de MPO plasmática induzida por heparina que se correlacionou com a melhora da função endotelial. A ligação da MPO à parede do vaso é um pré-requisito para oxidação MPO-dependente do ON derivado do endotélio e prejuízo da função endotelial. Dessa forma, a mobilização da MPO associada ao vaso pode representar um mecanismo pelo qual as heparinas exercem efeitos antiinflamatórios e aumentam a biodisponibilidade de ON vascular.

Recomendações de mudanças no estilo de vida, incluindo dieta e exercícios, têm demonstrado benefício na prevenção e no tratamento da doença arterial coronariana. Roberts e cols.<sup>57</sup> avaliaram 31 homens obesos submetidos à modificação intensiva de estilo de vida (dieta rica em fibras, pobre em gorduras e exercícios aeróbicos diários) por três semanas, analisando marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e função endotelial. Após curto período de intervenção, houve redução significativa dos níveis de MPO (166 vs 33 ng/ml,  $p < 0,05$ ) e dos demais marcadores avaliados.

## Considerações técnicas nas dosagens de mieloperoxidase

Avanços no entendimento da fisiopatologia da aterosclerose e das síndromes isquêmicas agudas têm levado a uma explosão no desenvolvimento de ensaios de biomarcadores séricos, no entanto não há consenso quanto à efetividade de sua

utilização na prática clínica. Quando se avalia o uso de um novo marcador, é necessário considerar certas especificações que devem incluir validação da imprecisão analítica e limites de detecção, caracterização do calibrador, especificidade do ensaio e padronização, características pré-analíticas e estudos apropriados de intervalos de referência<sup>6,7,58</sup>.

Além da dosagem sanguínea pelo método de ELISA, o conteúdo de MPO pode ser mensurado nos neutrófilos como um índice de degranulação por citometria de fluxo em alguns analisadores hematológicos<sup>6,59</sup>.

A dosagem de MPO ainda necessita de padronização. Estudos que avaliaram sua utilidade como preditor de risco ou prognóstico utilizaram ensaios com técnica de ELISA, ainda não comercialmente disponíveis (Oxis Health Products, Calbiochem e PrognostiX). Não há consenso quanto à unidade de medida a ser utilizada para expressar resultados, determinação de valores de referência populacionais e prováveis fatores pré-analíticos que poderiam interferir na sua dosagem, como o tipo de amostra utilizada (soro ou plasma), o tipo de anticoagulante e a estabilidade do analito. Chang e cols.<sup>60</sup> verificaram que o tempo em que a amostra permanece em temperatura ambiente antes da centrifugação afeta de maneira importante o conteúdo de MPO no plasma. Quando a amostra foi colocada em banho de gelo após a coleta, mesmo com a centrifugação ocorrendo em temperatura ambiente não houve aumento na concentração de MPO. No entanto, em amostras mantidas em temperatura ambiente, aparentemente a MPO continuou sendo liberada dos leucócitos no sangue no decorrer do tempo até a centrifugação, o que também explica valores mais elevados no soro em relação ao plasma coletado com heparina, pois a amostra permanece em temperatura ambiente por mais tempo para a formação do coágulo.

## Conclusões e perspectivas

Pelo conhecimento atual, dados sugerem que a MPO pode servir como marcador de doença cardiovascular, promovendo informações independentes no diagnóstico e prognóstico de pacientes, e também como potencial causador da progressão e instabilidade de lesões ateroscleróticas no momento da isquemia aguda.

Há perspectivas futuras para avaliação de sua utilidade para orientar a decisão terapêutica cardiovascular atual além do desenvolvimento de tratamentos específicos que atuem removendo a MPO dos espaços endotelial e subendotelial para prevenir suas ações pró-inflamatórias na parede dos vasos sanguíneos ou reduzindo as fontes de  $H_2O_2$  para evitar a depleção MPO-dependente dos níveis de ON vascular.

Estudos adicionais são necessários, principalmente aqueles relacionados à padronização da técnica de dosagem, método de coleta e armazenamento e ao conhecimento de eventuais interferências esperadas. A uniformização das unidades de medida e valores de referência populacionais deverá facilitar a avaliação clínica, e, no futuro, o desenvolvimento de ensaios comercialmente disponíveis, padronizados e automatizados, capazes de aumentar a agilidade e diminuir a imprecisão analítica.

Além disso, um marcador inflamatório para avaliação de risco cardiovascular precisa ter, entre outras características:

## Atualização Clínica

independência dos fatores de risco estabelecidos, habilidade para melhorar a predição de risco além dos fatores de risco tradicionais, custos aceitáveis do ensaio e generalização dos resultados a vários grupos populacionais.

Ainda não está claro o valor preditivo adicional dos níveis de MPO na estratificação de risco cardiovascular para incorporá-la à prática clínica como sinalizadora de vulnerabilidade de placa. Estudos adicionais são necessários para confirmar sua habilidade diagnóstica e prognóstica nas diferentes formas de apresentação da cardiopatia isquêmica, além da padronização do ensaio que ainda é ponto fundamental para a transição desse marcador do ambiente de pesquisa para uso na rotina clínica.

## Referências

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-26.
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105: 1135-43.
3. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1685-95.
4. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson HL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. *Circulation.* 2003; 107: 499-511.
5. Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 19-31.
6. Apple FS, Wu AHB, Mair J, Ravkilde J, Panteghini M, Tate H, et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin Chem.* 2005; 51: 810-24.
7. Jaffe AS, Balbun L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 1-11.
8. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells W, Litovsky JR, Badimon JJ, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient. *Circulation.* 2003; 108: 1664-78.
9. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 445: 214-24.
10. Arnhold J. Free radicals – friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow).* 2004; 69: 4-9.
11. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharm Therap.* 2006; 111: 16-26.
12. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1102-11.
13. Brennan ML, Hazen S. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14: 353-9.
14. Nicholls SJ, Hazen SL. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of coronary artery disease. *Jpn J Infect Dis.* 2004; 57: 21-2.
15. Podrez E, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28 (12): 1717-25.
16. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem.* 2002; 277: 46116-22.
17. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med.* 1999; 133: 321-5.
18. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1547-60.
19. Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *J Surg Res.* 2006; 133: 143-9.
20. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1095-108.
21. Malle E, Marsche G, Panzenboeck U, Sattler W. Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 445: 245-55.
22. Nicholls S, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med.* 2005; 15: 212-9.
23. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2004; 114: 529-41.
24. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem.* 2000; 275: 37524-32.
25. Baldus S, Eiserich HP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, et al. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1759-70.
26. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann S, Goormastic M, Shishebor MH, Penn MS, et al. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 2004; 110: 1134-9.
27. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1143-6.
28. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* 2001; 158: 879-91.
29. Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal A, van der Loos CM, Itoh A, et al. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2002; 106: 2894-900.
30. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. widespread inflammation in unstable angina. *N Engl J Med.* 2002; 347: 5-12.
31. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrix metalloproteinase (MMP-7): a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 41279-87.
32. Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1309-14.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por CNPq, CAPES, FIPE

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de mestrado de Raquel Melchior Roman pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

33. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, Lau D, Mollnau H, Ortak M, et al. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 902-11.
34. Askari AT, Brennan ML, Zhou X, Drinko J, Morehead A, Thomas JD, et al. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med.* 2003; 197: 615-24.
35. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML, Unzek S, Zhou X, Heinecke JW, et al. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation.* 2005; 112: 2812-20.
36. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? *Acta Haematol.* 2000; 104: 10-5.
37. Chevrier I, Tregouet DA, Massounet-Castel S, Beaune P, Lorient MA. Myeloperoxidase genetic polymorphisms modulate human neutrophil enzyme activity: genetic determinants for atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006; 188: 150-4.
38. Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Thérioux P, Rouleau GA. A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *Am Heart J.* 2001; 142: 336-9.
39. Asselbergs FW, Reynolds WF, Cohen-Tervaert JW. Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary artery disease. *Am J Med.* 2004; 116: 429-30.
40. Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA.* 2001; 286: 2136-42.
41. Melchior R, Camargo PVS, Rohde LE, Lucchesse A, Campagnolo N, Alberton DL, et al. Unbalanced predictive value of C-reactive protein and myeloperoxidase in stable angina patients. [Abstract]. *Circulation.* 2005; 112 (17): 626.
42. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1595-604.
43. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003; 108: 1440-5.
44. Roman RM. Valor prognóstico da mieloperoxidase na doença arterial coronariana: comparação entre pacientes estáveis e instáveis [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
45. Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C, Chopra V, Wanamadala S, Clark LT, et al. Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 2007; 99: 1364-8.
46. Biasucci LM, D'Onofrio G, Liuzzo G, Zini G, Monaco C, Caligiuri G, et al. Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 27: 611-6.
47. Gach O, Biemar C, Nys M, Deby-Dupont G, Chapelle JP, Deby C, et al. Early release of neutrophil markers of activation after direct stenting in patients with unstable angina. *Coron Artery Dis.* 2005; 16: 59-65.
48. Khan SQ, Keely D, Quinn P, Davies JE, Ng LL. Myeloperoxidase aids prognostication together with N-terminal pro-B-Type natriuretic peptide in high-risk patients with acute ST elevation myocardial infarction. *Heart.* 2007; 93: 826-31.
49. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 1993-2000.
50. Tang W, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, et al. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2006; 98: 796-9.
51. Ng LL, Pathik B, Loke IW, Squire IB, Davies JE. Myeloperoxidase and C-reactive protein augment the specificity of B-type natriuretic peptide in community screening for systolic heart failure. *Am Heart J.* 2006; 152: 94-101.
52. Meuwese MC, Stroes WS, Hazen SL, Miert JN, Kuivenhoven JA, Schub RG, et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 159-65.
53. Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA.* 2003; 289: 1675-80.
54. Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, et al. Statin promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation.* 2003; 108: 426-31.
55. Zhou T, Zhou S, Qi S, Shen X, Zeng G, Zhou H. The effect of atorvastatin on serum myeloperoxidase and CRP levels in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta.* 2006; 368: 168-72.
56. Baldus S, Rudolph V, Roiss M, Ito WD, Rudolph TK, Eiserich JP, et al. Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. *Circulation.* 2006; 113: 1871-8.
57. Roberts CK, Won D, Pruthi S, Kurtovic S, Sindhu RK, Vaziri ND, et al. Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 1657-65.
58. Jaffe AS, Katus H. Acute coronary syndrome biomarkers: the need for more adequate reporting. *Circulation.* 2004; 110: 104-6.
59. Leckie MJ, Gomma AH, Purcell IF, Nyawo B, Dewar A, Okrongly D, et al. Automated quantitation of peripheral blood neutrophil activation in patients with myocardial ischaemia. *Int J Cardiol.* 2004; 95: 307-13.
60. Chang PY, Wu TL, Hung CC, Tsao KC, Sun CF, Wu LL, et al. Development of an ELISA for myeloperoxidase on microplate: normal reference values and effect of temperature on specimen preparation. *Clin Chim Acta.* 2006; 373: 158-63.