

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES
FACULDADE DE MEDICINA

EFEITO DE VARIÁVEIS PRÉ-ANALÍTICAS NOS NÍVEIS DE
MILOPEROXIDASE

ANDREA ELISABET WENDLAND

Orientadora: PROFA. CARISI ANNE POLANCZYK

Co-orientadora: PROFA. JOÍZA LINS CAMARGO

Dissertação de Mestrado apresentada no
Programa de Pós-Graduação em
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, abril de 2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por serem exemplos de integridade, simplicidade e fé, por não medir esforços para proporcionar educação de qualidade aos seus filhos, pelas palavras de apoio e incentivo em todos os momentos difíceis. Especialmente ao meu pai, que mesmo não estando mais entre nós, compartilha da alegria de mais essa conquista.

Ao meu irmão Alberto, pelo carinho, força e incentivo, e por me ensinar a ser uma pessoa melhor. A minha cunhada Rosângela, pela amizade, carinho e paciência e ao meu sobrinho Rafael, por seu sorriso lindo, seu afeto e por ter dado um novo sentido às nossas vidas.

Às amigas Elizabeth, Mariela e Alessandra, pela amizade, pelo apoio e incentivo tanto nos bons quanto nos maus momentos. A amiga Márcia, por tudo isso e por acreditar e confiar em mim na co-orientação de seu trabalho de especialização.

Ao Fernando, por todos os momentos vividos, pelo amor e carinho, e por estar sempre ao meu lado quando preciso.

Agradeço de forma especial às minhas orientadoras, Carisi Anne Polanczyk e Joíza Lins Camargo, pela dedicação e paciência, pelo estímulo, por proporcionar meu crescimento e me dar tantas oportunidades. Por serem exemplos profissionais e pessoais.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Imunoensaios do HCPA, por possibilitarem a execução deste trabalho, principalmente os colegas Luiz Werres Jr e Maria Cristina Amaro, por sua ajuda na realização das leituras no equipamento.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul por ter um curso de pós-graduação de qualidade e por incentivar a pesquisa local. Às instituições fomentadoras de pesquisa FIPE/HCPA e CNPq, por acreditarem na competência e seriedade de nossos pesquisadores.

A todos que estiveram ao meu lado nessa jornada e que de alguma forma contribuíram para que ela fosse concluída.

E acima de tudo, a Deus, por guiar os meus passos e colocar tantas pessoas especiais ao meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS: Português	5
LISTA DE ABREVIATURAS: Inglês	6
ARTIGO DE REVISÃO:	7
O Papel da Mieloperoxidase na Doença Cardiovascular	
ARTIGO ORIGINAL: versão em português	46
Efeito de Variáveis Pré-analíticas nos Níveis de Mieloperoxidase	
Tabelas e Figuras	66
ARTIGO ORIGINAL: versão em inglês	73
Effect of Preanalytical Variables on Myeloperoxidase Levels	
Tables and Figures	91
ANEXOS:	97
Anexo I: Termo de Consentimento Informado	98
Anexo II: Questionário Clínico	99

LISTA DE ABREVIATURAS – Português

MPO	Mieloperoxidase
ELISA	Enzima Imunoensaio
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
PMNs	Neutrófilos Polimorfonucleares
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
ON	Óxido Nítrico
CV	Coefficiente de Variação
ANOVA	Análise da Variância
IC	Intervalo de Confiança
PCR	Proteína C Reativa
PCR-as	Proteína C Reativa de Alta Sensibilidade
NT-proBNP	Peptídeo Natriurético N-terminal do tipo pro-B

LISTA DE ABREVIATURAS – Inglês

MPO	Myeloperoxidase
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
PMNs	Polymorphonuclear neutrophils
LDL	Low Density Lipoprotein
HDL	High Density Lipoprotein
NO	Nitric Oxide
CV	Coefficient of Variation
ANOVA	Analysis of Variance
CI	Confidence Interval
CRP	C-Reactive Protein
hs-CRP	High-Sensitivity C-Reactive Protein
NT-proBNP	N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide

O Papel da Mieloperoxidase na Doença Cardiovascular

Andrea Elisabet Wendland, Raquel Melchior Roman, Carisi Anne Polanczyk

Resumo: 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 destes 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. Desta forma, a MPO e sua cascata inflamatória representam um alvo atrativo para investigação prognóstica e terapêutica na doença aterosclerótica cardiovascular. 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 da dosagem de MPO na estratificação de risco cardiovascular para incorporá-la à prática clínica como sinalizadora de vulnerabilidade de placa. Estudos adicionais são necessários para avaliar os níveis de MPO como preditor de risco cardiovascular em curto e longo prazo, bem como o potencial benefício em utilizá-la para definir estratégias terapêuticas, além da padronização do ensaio, ponto fundamental para a transição desse marcador do ambiente de pesquisa para uso na rotina clínica.

Palavras-chave: mieloperoxidase, neutrófilos, inflamação, aterosclerose.

(Artigo publicado no *Arq Bras Cardiol* 2007; 91: e12-e19 com modificações).

Introdução

A inflamação tem sido relacionada a todos os estágios do desenvolvimento da placa aterosclerótica, desde o depósito lipídico à ruptura da placa e suas complicações trombóticas.¹⁻⁶ 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).³⁻⁵

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 sugerido sua utilização como parte da avaliação preventiva de risco cardiovascular.² Contudo, muitos pacientes com risco de eventos cardiovasculares primordiais ainda não são precocemente identificados e as manifestações súbitas freqüentemente demandam procura a serviços de emergência. Assim, há necessidade de identificar marcadores adicionais para avaliação de risco de eventos cardiovasculares principalmente relacionados à vulnerabilidade de placa.⁷⁻¹⁰

A ruptura ou erosão de placas com formação de trombo intramural representa a mais importante modificação morfológica da 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 um denominador comum.^{7,8} Enquanto linfócitos e monócitos têm sido considerados importantes contribuintes na fisiopatologia da DCV, principalmente pela geração de citocinas pró-inflamatórias, os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) podem modular e sinalizar rotas inflamatórias pela secreção de enzimas que interagem em órgãos-alvo.^{1,4,11-13} 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).^{13,14}

A síntese de MPO ocorre durante a diferenciação mielóide na medula óssea e é completada dentro do granulócito, previamente a sua entrada na circulação. Essa enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e em alguns subtipos de macrófagos teciduais. Representa mais de 5% do conteúdo protéico total da célula em neutrófilos e 1% nos monócitos.¹⁴⁻¹⁶

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.¹⁷ É o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, prontamente liberada após ativação por diferentes agonistas contribuindo para a defesa imune inata do organismo.¹⁴

Crescentes evidências demonstram o papel da MPO como participante central do elo entre inflamação e DCV. A mieloperoxidase, através da reação com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), forma radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis com atividade antimicrobiana, ação chave no mecanismo de defesa imunológico. No entanto, também promove dano oxidativo do tecido do hospedeiro nos locais de inflamação, por exercer efeitos pleiotrópicos na vasculatura com potencial impacto no desenvolvimento de aterosclerose, disfunção endotelial, instabilização de placa e resposta no remodelamento ventricular após injúria isquêmica.^{6,17-21}

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 suas complicações trombóticas.

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

Níveis elevados de LDL têm um papel central no risco para aterosclerose, mas LDL por si só não parece ser aterogênico *in vitro*.^{16,22,23} Essas observações sugerem que o LDL precisa ser modificado de alguma forma para promover aterogênese. Muitas evidências corroboram com a hipótese de que modificações oxidativas do LDL desempenham um papel crítico na patogênese da aterosclerose, fazendo surgir a necessidade de identificar fontes biologicamente relevantes de estresse oxidativo na parede arterial.^{16,22-24}

Estudos recentes apontam os prováveis mecanismos pelos quais a MPO é capaz de promover oxidação de lipoproteínas *in vivo*.^{16,24-29} Macrófagos utilizam NADPH oxidase para produzir superóxido (O_2^-) que pode dismutar e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A MPO cataliza reações com H_2O_2 para gerar oxidantes citotóxicos mais potentes como ácido hipocloroso (HOCl) e radical tirosil,^{16,22,23} sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl.²⁵ Através de ensaios altamente sensíveis e específicos, diversos produtos finais estáveis gerados por essas espécies têm sido detectados em lesões ateroscleróticas.^{16,23}

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^- para gerar 3-clorotirosina. Pode também nitratar a tirosina oxidando nitrito (NO_2^-), produto final do metabolismo do óxido nítrico (ON), gerando 3-nitrotirosina.^{16,25-29} Além de marcadores da atividade da MPO, tanto a 3-clorotirosina quanto a 3-nitrotirosina têm significativa importância clínica, por promoverem dano oxidativo contribuindo para a aterosclerose.²⁶ O LDL modificado por espécies reativas de cloro e nitrogênio é convertido a uma forma avidamente ingerida e degradada por macrófagos, resultando em deposição de colesterol e formação de células espumosas, passos essenciais no desenvolvimento da lesão.^{16,25-29}

Foram observados níveis 30 vezes maiores de 3-clorotirosina em LDL de lesão comparado com LDL circulante^{22,23} e aproximadamente 100 vezes maiores em LDL retirado de aorta aterosclerótica comparado com LDL isolado de plasma de doadores saudáveis.²⁵ Intermediários nitrados são mais efetivos que os clorados na promoção de conversão oxidativa do LDL em uma forma altamente ingerível.²⁵

O mecanismo através do qual macrófagos arteriais ingerem e acumulam colesterol LDL levando a formação de células espumosas tem sido foco de intensas pesquisas. Células como os macrófagos são normalmente protegidos dos efeitos tóxicos do excesso de colesterol por múltiplos mecanismos, incluindo diminuição da regulação de moléculas receptoras de LDL de superfície em resposta a estoques intracelulares repletos de colesterol. Em contraste, LDL que foi previamente oxidado ou quimicamente modificado, pode ser reconhecido por receptores alternativos de LDL oxidado, para os quais a expressão de superfície não está diminuída sob exposição a excesso de colesterol.²⁹

Podrez *et al*^{25,29} caracterizaram o sistema MPO-H₂O₂-NO₂ como a rota preferencial, utilizada por macrófagos, para converter LDL em formas aterogênicas, com maior afinidade pelo receptor CD36, principal receptor dos macrófagos para LDL oxidado, diretamente envolvido na formação de células espumosas *in vivo*. As modificações bioquímicas na partícula do LDL que ocorrem durante a oxidação são complexas e as mudanças estruturais que promovem o reconhecimento do receptor não são completamente conhecidas.²⁹

Em contraste ao LDL, níveis plasmáticos de HDL se correlacionam inversamente com o risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana. Esses efeitos anti-aterogênicos são atribuídos principalmente à capacidade do HDL de transportar o excesso de colesterol das células da parede arterial para o fígado, durante o transporte reverso de colesterol,^{15,29,30} além de apresentar atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitrombótica.³¹

O HDL também é suscetível a modificações oxidativas mediadas pela MPO por nitração ou halogenação de resíduos tirosina na apolipoproteína AI (apo AI). Modificações desses resíduos prejudicam a habilidade da proteína de promover o transporte reverso de colesterol dependente de ABCA-1, contribuindo para a formação de lesões ateroscleróticas.^{29,31} O HOCl gera modificações no diâmetro da partícula e perda da estrutura de α -hélice, que tem alta afinidade lipídica.¹⁵

Evidências para modificações no HDL mediadas pela MPO são a presença de 3-clorotirosina e 3-nitrotirosina em HDL retirado de lesões ateroscleróticas.^{15,30,32} Níveis de 3-clorotirosina em HDL isolado de lesões ateroscleróticas foram 8 vezes maiores aos encontrados no HDL circulante e 13 vezes maiores no HDL isolado de plasma de pacientes com doença arterial coronariana comparado com indivíduos saudáveis.^{15,30}

Pennathur *et al*³² observaram níveis 6 vezes maiores de 3-nitrotirosina em HDL isolado de tecido aterosclerótico em relação ao HDL circulante. Comparando com indivíduos saudáveis o nível de 3-nitrotirosina foi 2 vezes mais elevado no HDL circulante de indivíduos com doença arterial coronariana (DAC) estabelecida.

Mieloperoxidase e o metabolismo do óxido nítrico: contribuição para a disfunção endotelial

A disfunção endotelial vascular, afetando a resposta vasomotora ao ON, é um fenômeno bem estabelecido na doença cardiovascular. O aumento do consumo oxidativo do ON é um achado característico da disfunção endotelial e alguns mecanismos peroxidase-mediados têm sido recentemente estudados. Abu-Soud *et al*³³ 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 da ON sintetase e reduzir seus cofatores como a 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.³⁴

Níveis séricos de MPO mensurados em 298 indivíduos demonstraram ser preditor independente de disfunção endotelial avaliada pela resposta vasodilatadora mediada por fluxo da artéria braquial por ultrassom. 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 apresentar disfunção endotelial em relação ao menor quartil.³⁵

O ON derivado das células endoteliais regula o tônus vascular basal, induzindo vasodilatação, inibe a aderência de leucócitos e agregação plaquetária, desempenhando potentes propriedades anti-inflamatórias.³⁶

Mieloperoxidase e vulnerabilidade da placa

A maioria dos eventos isquêmicos agudos resulta de ruptura da capa fibrosa que envolve a placa aterosclerótica.^{6,37,38} Estudos histopatológicos têm demonstrado que as lesões culpadas não são aquelas com maior grau de obstrução de fluxo, mas sim, com ateroma rico em macrófagos, metaloproteinases, lipídios e material pró-trombótico.^{6,37} Essas placas estão mais propensas a sofrer afinamento e subsequente ruptura da capa fibrosa que a envolve. Isso expõe o núcleo trombogênico da placa ao sangue circulante, resultando em formação de trombo, comprometimento do lúmen e isquemia.⁶

A maioria dos estudos que avaliam o papel da MPO na doença cardiovascular foca 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 da placa.³⁷

Evidências demonstram que a ativação da resposta inflamatória nas lesões ateroscleróticas coronarianas está relacionada à progressiva desestabilização da placa. Alguns estudos clínicos têm demonstrado que neutrófilos estão ativados em pacientes com angina instável e infarto agudo do miocárdio,^{11,12} e o índice intracelular de MPO está significativamente reduzido devido à liberação da enzima na circulação.¹¹

Um extenso infiltrado de monócitos e neutrófilos é tipicamente descrito em placas fissuradas e trombosadas em autópsia de pacientes com síndromes coronarianas agudas (SCA).^{12,38} 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 *et al*³⁹ documentaram a redução do conteúdo intracelular de MPO leucocitária em pacientes com angina instável submetidos a cateterismo cardíaco com amostras coletadas do seio coronariano e da artéria femural. O gradiente de ativação foi independente da localização da estenose responsável pela isquemia, introduzindo o conceito da ativação leucocitária generalizada em um leito coronariano amplamente inflamado nas SCA.

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.^{6,40} Em adição, os produtos da oxidação lipídica mediada pela MPO ativam células endoteliais no ateroma promovendo expressão de P-selectina na superfície, favorecendo a adesão plaquetária.⁴⁰

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 de fator tissular, favorecendo o aumento da trombogenicidade.⁴¹

O HOCl, derivado da MPO, dentro das placas inflamadas pode induzir morte de células endoteliais e descamação, por mecanismos oncóticos e apoptose. Debris de células apoptóticas na circulação sistêmica servem também como estímulo a ativação e agregação plaquetárias

levando a formação de trombo intracoronário.^{6,9,41} Além disso, o HOCl é capaz de converter metaloproteínas latentes em formas ativas, que prejudicam a integridade do endotélio, por degradar a capa fibrosa e expor o núcleo lipídico intensamente pró-coagulante.^{41,42}

A ligação da MPO com a ativação da cascata de proteases ocorre através da inativação oxidativa de inibidores de proteases [α -1-antitripsina, inibidor tecidual das metaloproteínas (TIMs) e inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1)] e ativação de formas latentes como as proelastases e metaloproteínas (MMPs). As MMPs afetam o remodelamento e estabilidade de placas ateroscleróticas. Fu *et al*⁴² demonstraram a geração de espécies oxidativas de HOCl pela MPO ativando a pró-matrilisina (MMP-7) capaz de promover degradação de matriz extracelular da capa fibrosa, potencialmente relacionando-as ao mecanismo de ativação e ruptura da placa aterosclerótica.

Mieloperoxidase e remodelamento ventricular

A migração de leucócitos para zonas peri-necrose e a reperfusão de artérias ocluídas expõe o território isquêmico a mais inflamação e estresse oxidativo. É possível que o aumento da atividade da MPO que acompanha modelos de injúria de isquemia e reperfusão contribua para o dano tecidual resultante e extensão do infarto.⁶

A MPO pode contribuir para a disfunção miocárdica e remodelamento ventricular adverso após o infarto através de vários potenciais mecanismos. A MPO gera uma série de oxidantes reativos e espécies citotóxicas, incluindo aldeídos, que podem modificar covalentemente resíduos críticos em canais iônicos chaves ou transportadores contribuindo para prejuízo da função contrátil após episódios de isquemia.

Outro potencial determinante de disfunção ventricular envolve o consumo de ON pela MPO.^{43,44} Os fenômenos de isquemia e reperfusão miocárdica estimulam o recrutamento de polimorfonucleares (PMNs) e a disfunção microvascular associada tem sido atribuída ao

decréscimo da biodisponibilidade de ON vascular. Ocorre degradação do ON pela reação com radicais livres derivados de oxigênio gerados durante a fase de reperfusão da injúria miocárdica. O mecanismo predominante é a rápida reação do ON com superóxido derivado da NADPH oxidase de neutrófilos PMNs secretados e ativados nos tecidos inflamados.^{36,45,46}

Após a ativação, os PMNs não só geram superóxido (O_2^-) e H_2O_2 , mas também secretam MPO. A MPO, na presença de H_2O_2 , cataliticamente consome ON derivado do endotélio, prejudicando dessa forma a sinalização ON-dependente nas células musculares lisas e subsequente relaxamento vascular.^{36,46}

Um estudo realizado por Baldus *et al*³⁶ analisando tecido miocárdico de pacientes que morreram após isquemia do miocárdio e reperfusão, verificou que a vasculatura relacionada com o infarto foi associada com abundante presença de PMNs MPO positivos comparado com tecido sem doença miocárdica. Níveis plasmáticos de MPO foram significativamente maiores em pacientes com infarto do miocárdio após revascularização comparados a amostras de controles saudáveis. O consumo de ON no plasma de pacientes foi marcadamente elevado comparado com controles.

Além disso, outro mecanismo através do qual a MPO pode afetar o remodelamento ventricular é via ativação da cascata da protease após o infarto. A inativação do inibidor do ativador do plasminogênio (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.⁴³

Askari *et al*⁴⁷ estudaram ratos nulos para MPO ($MPO^{-/-}$) com infarto agudo do miocárdio, e demonstraram reduzida infiltração leucocitária, menor dilatação ventricular e preservação da função sistólica. O mecanismo parece estar relacionado com a diminuição da inativação oxidativa do PAI-1 nos ratos $MPO^{-/-}$, levando a diminuição da atividade da plasmina tecidual.

Vasilyev *et al*⁴³ demonstraram que há significativo aumento na geração de aldeídos em tecidos pós-infartados de ratos selvagens em relação aos MPO^{-/-}, 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 uma desordem genética rara, a deficiência hereditária de MPO é relativamente comum nos Estados Unidos e Europa, com prevalência de 1:2000-4000 indivíduos, sendo menos freqüente no Japão, com 1:55000.¹⁷

Uma variedade de mutações que resultam na deficiência de MPO tem sido relatada, as quais afetam a biossíntese de MPO, impedindo que a enzima seja processada até a fase madura ou apresente baixa atividade de peroxidase. Alguns estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos com deficiência hereditária de MPO demonstram redução significativa da prevalência de doença cardiovascular, o que é consistente com eventos bioquímicos dependentes de MPO contribuindo para o início ou progressão da aterosclerose.¹⁷

Alguns polimorfismos são descritos para o gene da MPO, incluindo um polimorfismo funcional localizado na região promotora do gene que afeta sua transcrição, diminuindo a expressão de MPO na célula. O polimorfismo -463 G/A, que consiste na substituição de G por A na posição 463 pb, leva a redução da expressão de MPO no genótipo AA, níveis intermediários no GA e maior quantidade de MPO intracelular no genótipo GG.^{17,48,49}

Nikpoor *et al*⁴⁸ demonstraram em estudo de caso-controle a associação entre polimorfismo do gene da MPO e DAC. Comparando 229 pacientes com coronariopatia e 217 controles, encontraram papel protetor do alelo A, sendo que indivíduos com duas cópias do alelo A

apresentaram menor chance de desenvolver DAC quando comparados com indivíduos GA ou GG.

Em estudo de coorte foi avaliado o risco para eventos cardiovasculares associado 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) em relação ao grupo GA/AA (19% vs 4%, $p=0,02$).⁴⁹

Mieloperoxidase em placas ateroscleróticas e em “lesões culpadas”

Naruko *et al*¹² analisaram a presença de neutrófilos em 126 segmentos de artérias coronárias obtidos em autópsias ou durante procedimentos de aterectomia, utilizando análise imunohistoquímica. Foram estudados 58 pacientes; 13 com morte por IAM e 45 por doenças não-cardiovasculares (grupo controle). Todas as placas rotas ($n=8$) ou erosadas ($n=5$) dos pacientes com IAM expressaram infiltração de neutrófilos comparados com rara detecção em lesões coronarianas de pacientes com morte não-cardíaca, somente 2 de 87 lesões ateroscleróticas. 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 14 das 32 lesões culpadas (44%) e nos com AE somente em 2 das 35 lesões (6%). Essas observações sugerem que a infiltração de neutrófilos está ativamente associada com eventos coronarianos agudos.

Sugiyama *et al*³⁸ demonstraram em placas ateroscleróticas de pacientes com morte súbita, maior expressão de MPO nos locais de ruptura, em erosões superficiais e no núcleo lipídico enquanto estrias gordurosas exibiram menor expressão. Em adição, foi demonstrada associação da expressão de MPO nos macrófagos e de HOCl por técnicas de imunohistoquímica em lesões culpadas.

Ueda *et al*⁵⁰ estudando a presença de neutrófilos nas lesões de segmentos coronarianos obtidos em autópsias de pacientes que morreram por IAM, verificaram que a maioria das células MPO positivas eram neutrófilos e, nas aterectomias, áreas MPO positivas foram significativamente maiores em pacientes com AI em relação aos com AE.

Mieloperoxidase em pacientes com dor torácica

Brennan *et al*⁵¹ 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. A estimativa de risco foi ajustada para outras variáveis como sexo, idade, PCR, dislipidemia, revascularização prévia, história de IAM ou alterações eletrocardiográficas. A incidência de infarto do miocárdio aumentou com os quartis de MPO; 13,9% no primeiro quartil (<119,4 pM), 16,6% no 2º quartil (119,4-197,9 pM), 25,2% no 3º quartil (198-393,9 pM) e 38,4% no 4º quartil (>394 pM). Em pacientes sem evidência de necrose, definida pela dosagem de troponina T (TnT) negativa (<0,1 ng/mL) 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 (p<0,001). Utilizando o ponto de corte de 198 pM derivado da curva ROC, a adição de MPO a troponina, como teste de rastreamento, melhora a habilidade de identificar pacientes com risco de eventos em 30 dias de 58% para 84,5% (p<0,001). Níveis de MPO mostraram uma fraca correlação com pico de TnT (r=0,21; p<0,001), PCR (r=0,10; p=0,01) e idade (r=0,11; p=0,01) mas não mostraram correlação com contagem de leucócitos totais (p=0,11). Análise estratificada

quanto ao gênero revelou que apesar dos níveis de MPO serem menores no sexo feminino, foram similarmente preditores significativos de risco em ambos os sexos.

Mesmo em pacientes onde foi excluído infarto, baseado na medida de TnT, o aumento dos níveis de MPO na apresentação foi preditor de eventos. Outra vantagem é que enquanto os níveis circulantes de troponina aumentam em 3-6 horas após injúria miocárdica, os níveis de MPO foram significativamente elevados na apresentação (mesmo em 2 horas de início dos sintomas) em pacientes com TnT inicialmente negativa. Esses achados sugerem que a MPO seja um marcador de SCA precedendo a necrose, desta forma um preditor de placa vulnerável⁵¹. 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.

Esporcatte *et al*⁵² avaliando uma coorte de 140 pacientes, verificaram que naqueles com dor torácica aguda e sem elevação de ST, níveis elevados de MPO na admissão são importante ferramenta preditiva de eventos adversos intra-hospitalares com RC 8,04; p=0,048, para IAM. O ponto de corte de MPO para IAM obtido através da curva ROC foi ≥ 100 pM (AUC=0,662; IC95% 0,532-0,793) com elevada sensibilidade (92,3%) e elevado valor preditivo negativo (98,1%), embora com baixa especificidade (40,2%).

Mieloperoxidase na síndrome coronariana aguda

Investigadores do estudo CAPTURE (C7E3 Anti-Platelet Therapy in Unstable Refractory Angina) que incluiu 1090 pacientes com SCA e angina recorrente necessitando intervenção coronariana percutânea (ICP) avaliaram o valor prognóstico dos níveis de MPO. Níveis séricos de MPO mostraram correlação com fatores de risco tradicionais, mas não se correlacionaram com níveis de TnT, CD 40 ligante solúvel, PCR ou alterações eletrocardiográficas. Contudo, pacientes com níveis elevados de MPO ($>350\mu\text{g/L}$), 31,3% da amostra, experimentaram 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 $>350\mu\text{g/L}$ identificaram um subgrupo de pacientes sob risco aumentado para eventos mesmo apresentando níveis de TnT abaixo de $0,01\mu\text{g/L}$ (15,9% vs 2%, $p=0,001$).¹³

Em pacientes com SCA, níveis de MPO parecem predizer aumento de risco para eventos cardiovasculares subseqüentes e estendem as informações prognósticas de outros biomarcadores tradicionais. Junto com TnT, 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. Troponina é o melhor marcador prognóstico estabelecido para predizer 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. As evidências apontam para o fato de que a MPO 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 MPO foi avaliado em um grupo de 130 pacientes com 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) independente 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.⁵³

Cavusoglu *et al*⁵⁴ 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. Usando como ponto de corte a mediana dos valores de MPO da coorte, a porcentagem de pacientes sem IAM em 24 meses no grupo com valores basais

de MPO $\leq 20,34$ ng/mL foi de 88%, comparado com 74% no grupo com valores $>20,34$ ng/mL ($p=0,0249$).

Biasucci *et al*¹¹ conduziram um estudo para avaliar a prevalência e o momento de ativação de neutrófilos no curso das SCA e a relação temporal entre os episódios de isquemia recorrente e a ativação de neutrófilos. Avaliaram o índice de MPO 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 AI (n=30) e IAM (n=16) comparado com pacientes com AE crônica (n=40) e indivíduos normais (n=26); indicativo da liberação enzimática pelos neutrófilos relacionada à sua ativação. 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 duração do episódio isquêmico.

Gach *et al*⁵⁵ avaliaram a ativação de PMNs 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 como implante de stent coronário em relação ao grupo onde foi realizado apenas cateterismo diagnóstico.

Khan *et al*⁵⁶ 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). Foi utilizada na análise o valor da mediana das dosagens durante os 5 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) comparado com sobreviventes sem infarto recorrente (50,6 vs 33,5 ng/mL; $p=0,001$). Utilizando modelo de

regressão logística, a combinação dos marcadores MPO e NT-BNP melhorou a acurácia para 76%, excedendo a de qualquer marcador isoladamente. Outro achado interessante foi o fato de que a liberação de MPO revelou uma significativa diferença ao longo dos 5 dias ($p < 0,001$), com níveis de MPO aumentando precocemente antes do IAM e caindo rapidamente após as primeiras 24 horas, sugerindo que a ativação neutrofílica desempenha um papel bastante precoce e deve preceder o início do IAM.

O prognóstico em longo prazo da MPO e de marcadores de oxidação protéica foi avaliado por Mocatta *et al*⁵⁷ em 512 pacientes admitidos com IAM. MPO e carbonil proteína foram mais elevados no plasma de pacientes com infarto em 24-96 horas após admissão que em controles (MPO: 55 vs 39 ng/mL; carbonil proteína: 48 vs 17 pmol/mg de proteína; $p < 0,001$). Entretanto, apenas os níveis de MPO e não de carbonil proteína foram preditores independentes de mortalidade no seguimento de 5 anos. Pacientes com níveis de MPO acima da mediana em combinação com níveis elevados de NT-proBNP e reduzida fração de ejeção apresentaram significativa redução de sobrevida. MPO elevada, portanto, adicionou informação prognóstica para mortalidade em longo prazo quando usada com marcadores estabelecidos como NT-proBNP e função ventricular.

Rodriguez *et al*⁵⁸ avaliaram o papel da MPO como preditor de morte intra-hospitalar em pacientes infartados apresentando choque cardiogênico. Os níveis de MPO foram dosados em 38 pacientes consecutivos com IAM com elevação de segmento ST e choque cardiogênico, tratados com intervenção percutânea primária. Comparando com pacientes que sobreviveram ($n=18$), aqueles que foram a óbito ($n=20$) apresentaram níveis mais elevados de MPO quando admitidos na unidade de tratamento coronariano (81 ± 28 vs 56 ± 23 ng/mL; $P < 0,006$). Após ajuste para variáveis clínicas, laboratoriais e angiográficas, o nível basal de MPO foi preditor independente de morte intra-hospitalar na análise multivariada [RC 3,9 (IC95% 1,8-7,5); $P < 0,001$].

Mieloperoxidase na doença coronariana estável

Zhang *et al*¹⁴ conduziram um estudo de caso-controle para determinar a associação entre níveis de MPO e a prevalência de cardiopatia isquêmica crônica em 158 pacientes submetidos a cateterismo cardíaco com DAC estabelecida (infarto ou revascularização prévia, lesões $\geq 50\%$ em uma ou mais artérias coronarianas) e 175 pacientes sem DAC angiograficamente significativa (controles). Os níveis de MPO por leucócito e por mililitro de sangue foram ambos significativamente maiores em pacientes com DAC em relação aos controles ($p < 0,001$). 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 11,9 (IC95% 5,5-25,5) para o maior quartil de MPO leucocitária e 20,4 (IC95% 8,9-47,2) para a MPO sérica.

Estudo realizado por Stefanescu *et al*⁵⁹ avaliou os níveis de MPO em 382 pacientes com DAC estável, que foram divididos em 2 grupos: o grupo com MPO elevada, que incluiu pacientes com níveis de MPO no 3º tercil ($>75 \mu\text{g/L}$) e o grupo com MPO baixa, que incluiu os pacientes com valores de MPO no 1º ($<52,6 \mu\text{g/L}$) e 2º tercis ($52,6-75 \mu\text{g/L}$). O seguimento médio foi de 3,5 anos, período no qual ocorreram 35 mortes. Os níveis de MPO entre os não sobreviventes foram maiores em relação aos sobreviventes ($72,7$ vs $60,1 \mu\text{g/L}$), no entanto, apesar de níveis elevados de MPO estarem associados a maior risco de morte, não foram preditores de mortalidade, independentemente de outros fatores de risco cardiovascular em pacientes com DAC estável [RC 1,06 (IC95% 0,71-1,59); $P=0,77$].

Mieloperoxidase e insuficiência cardíaca

Estudo transversal realizado por Tang *et al*⁴⁴ avaliou os níveis plasmáticos de MPO em 102 pacientes com diagnóstico de insuficiência cardíaca (IC) (fração de ejeção $<50\%$) e 105 controles saudáveis. Níveis plasmáticos de MPO foram significativamente maiores em pacientes

com IC crônica sistólica (1158 ± 2965 vs 204 ± 139 pM, $p < 0,0001$). Os níveis de MPO aumentaram em paralelo com o aumento 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 27,7 (IC 95% 3,6-371,1).

Em um estudo populacional prospectivo de rastreamento para IC na comunidade, foram avaliados 1360 pacientes através da 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.⁶⁰

Outro estudo de Tang *et al*⁶¹ avaliou o valor prognóstico dos níveis de MPO em 140 pacientes com IC crônica sistólica (fração de ejeção $< 35\%$) e sua relação com índices ecocardiográficos. Elevados níveis de MPO foram associados com maior probabilidade de IC mais avançada, além de fornecer valor prognóstico para desfechos clínicos em longo prazo (morte, transplante cardíaco, internação por IC) com RR 3,35 (IC95% 1,52-8,86), mesmo após ajuste para variáveis comumente usadas (idade, fração de ejeção do ventrículo esquerdo, BNP, entre outros). Analisando a curva ROC, a adição de MPO a BNP aumentou a acurácia preditiva de futuro evento clínico adverso (AUC 0,66 para BNP somente e 0,70 para BNP + MPO).

Mieloperoxidase como preditor de risco em indivíduos aparentemente saudáveis

Recentemente, pesquisadores do EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) publicaram estudo de caso-controle incluindo 3375 indivíduos saudáveis da coorte de Norfolk - Inglaterra, demonstrando que níveis elevados de MPO são associados com risco para futuro desenvolvimento de DAC, independente de fatores de risco tradicionais.⁶² Indivíduos que desenvolveram DAC durante os 8 anos de seguimento foram arrolados como casos ($n=1138$; MPO: 704 pmol/L) e os controles ($n=2237$; MPO: 638 pmol/L; $p < 0,001$) permaneceram livres

de DAC. O risco de DAC aumentou em paralelo ao aumento dos quartis de MPO, com RC 1,49 (IC95% 1,20-1,84; $p < 0,001$) no maior quartil em relação ao menor. Após ajuste para fatores de risco tradicionais a RC no maior quartil permaneceu significativa 1,36 (IC95% 1,07-1,73; $p < 0,001$). A associação foi mais forte nos participantes que sofreram DAC fatal (RC 1,82, IC95% 1,23-2,70; $p < 0,025$) comparado com aqueles com DAC não fatal (RC 1,35, IC95% 1,04-1,74; $p = 0,013$).

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.⁶ Uma potencial dificuldade no desenvolvimento de inibidores é a preocupação de que a droga comprometa a defesa imune inata.

As estatinas têm demonstrado reduzir os níveis de oxidantes derivados de MPO e ON, principalmente nitrotirosina, independente dos efeitos de redução de lípidos, sugerindo propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes que devem ser incluídas nos efeitos pleiotrópicos atribuídos a estas drogas.^{63,64}

Zhou *et al*⁶⁵ avaliaram o efeito da atorvastatina nos níveis de MPO e PCR em 78 pacientes com SCA. Os pacientes foram randomizados para tratamento convencional sem hipolipemiantes (n=38) e para tratamento convencional + 10 mg/dia de atorvastatina (n=40). Dosagens de MPO e PCR foram realizadas antes do início da terapia e após uma semana, sendo verificado que a terapia com atorvastatina reduziu significativamente os níveis de MPO (16% vs 8%, $p = 0,01$) e de PCR.

Além disso, foi demonstrado que as estatinas diminuem a expressão do gene da MPO em monócitos e macrófagos *in vitro*, com efeito semelhante *in vivo*, com redução de níveis de

mRNA da MPO em leucócitos de ratos recebendo estatinas, que se correlacionou com a redução da proteína e da atividade da enzima.⁶⁶

Baldus *et al*⁶⁷ 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 melhora da função endotelial. Estudos envolvendo cultura de células endoteliais revelam que a MPO liga-se à superfície endotelial e sua transcitose para o espaço subendotelial depende de um sistema heparinóide-glicosaminoglicano. 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. Desta forma, a mobilização da MPO associada ao vaso pode representar um importante mecanismo pelo qual as heparinas exercem efeitos anti-inflamatórios e aumentam a biodisponibilidade de ON vascular.

Recomendações de mudanças no estilo de vida, incluindo dieta e exercícios, têm demonstrado benefício significativo na prevenção e tratamento da DAC. Roberts *et al*⁶⁸ avaliaram 31 homens obesos, submetidos à modificação intensiva de estilo de vida (dieta rica em fibras e pobre em gorduras, além de 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 ($166,2 \pm 19,3$ ng/mL vs $132,7 \pm 11,2$; $p < 0,05$) e dos demais marcadores avaliados (PCR, ICAM-1, P-selectina e MMP-9). A diminuição dos níveis de MPO com a modificação no estilo de vida fornece evidência para a diminuição do estresse oxidativo e a redução dos níveis de MMPs, que são ativadas pela MPO, se deve em parte também, à redução dos níveis de MPO. Foi verificada melhora do perfil lipídico e metabólico, diminuição da inflamação e do estresse oxidativo, aumento da produção de ON, diminuição da adesão de monócitos, da ativação plaquetária e de células endoteliais, além da diminuição de MMP-9, um marcador de desestabilização da placa.

Considerações técnicas nas dosagens de mieloperoxidase e importância da fase pré-analítica

A MPO é tradicionalmente dosada por método de ELISA em amostras de soro ou plasma, entretanto, o conteúdo de MPO também pode ser mensurado nos neutrófilos como um índice de degranulação, por citometria de fluxo em alguns analisadores hematológicos.^{10,69} Dessa maneira, através de extensa análise citoquímica, é possível quantificar o conteúdo de MPO no interior dos neutrófilos, o qual é calculado na forma de um índice expresso em unidades arbitrárias, refletindo a atividade média de MPO na população total de neutrófilos da amostra. Em indivíduos normais esse índice é próximo de zero. Valores positivos aparecem quando os neutrófilos estão ricos em MPO e valores negativos, quando sofreram depleção de MPO, o que tipicamente ocorre após sua ativação.¹¹

A dosagem de MPO ainda necessita padronização. Estudos avaliando sua utilidade como preditor de risco ou prognóstico utilizaram ensaios com técnica de ELISA, ainda não comercialmente disponíveis (Oxis Health Products, Calbiochem, Assay Designs, Merckodia e PrognostiX). Não há consenso quanto à unidade de medida utilizada para expressar os resultados (Tabela 1), 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), tipo de anticoagulante e a estabilidade do analito. Além disso, a variabilidade biológica é grande, em torno de 30%, o que dificulta o estabelecimento de valores de corte e intervalos de referência populacionais para a correta classificação dos pacientes.⁷⁰

Quando se avalia o uso de um novo marcador é necessário considerar certas especificações, que devem incluir a 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.^{2,8,10,71}

Vários fatores além das doenças podem afetar os resultados dos testes laboratoriais. Esses fatores surgem em mente particularmente quando o resultado laboratorial não é esperado e não corresponde ao estado clínico do paciente, prejudicando a interpretação da doença e induzindo a outros testes ou mudanças desnecessárias na terapia.⁷²

A fase pré-analítica é um componente importante da qualidade laboratorial total, e inclui o procedimento para a coleta e o manejo e processamento da amostra antes da análise. As variáveis pré-analíticas podem ser agrupadas em 3 categorias: fisiológicas (idade, sexo, estação do ano, altitude, gravidez, ciclo menstrual), coleta da amostra (jejum, hora da coleta, postura, duração do torniquete, exercício, efeito dos anticoagulantes, manejo e processamento da amostra) e fatores influentes ou interferentes (drogas e anticorpos circulantes).⁷³

Tipo de amostra

As análises laboratoriais podem ser realizadas em soro, plasma, sangue total, urina e outros fluídos corporais. O tipo de amostra e o manejo e processamento da mesma antes da análise podem ter grande influência sobre os resultados, já que alguns analitos apresentam níveis diferentes no soro e no plasma e são sujeitos a alterações por influência do tempo e da temperatura em que se encontram antes da análise.

O que difere basicamente soro e plasma é o fato do soro não conter fibrinogênio, o qual foi utilizado para a formação do coágulo. Diferenças nos resultados das dosagens de certos analitos entre soro e plasma heparinizado são relacionados ao consumo de fibrinogênio e a lise de elementos celulares durante o processo de coagulação.⁷³

Stiegler *et al*⁷⁴ compararam resultados de troponina em amostras de soro e plasma heparinizado e encontraram amostras com resultados 20% menores no plasma heparinizado em relação ao soro nos 3 diferentes ensaios utilizados. Estudo semelhante realizado por Gerhardt *et*

al⁷⁵ também encontrou valores 15% menores de troponina em plasma heparinizado em relação ao soro.

Anticoagulantes

O uso de anticoagulantes permite a análise de amostras de sangue total ou de constituintes plasmáticos obtidos por centrifugação e separação do plasma. Entre os anticoagulantes mais utilizados no laboratório clínico estão os sais de heparina, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e citrato de sódio. O citrato tradicionalmente tem sido usado como anticoagulante para as provas de coagulação, como tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). A heparina é o anticoagulante preferencial para coleta de amostras de sangue quando se pretende determinar níveis de eletrólitos e outros exames químicos de rotina, pois é efetivo em pequenas quantidades sem efeito significativo na maioria das determinações. Exerce seu efeito anticoagulante através da ligação com a antitrombina III, causando uma mudança conformacional na molécula, acelerando dessa forma a inibição dos fatores da coagulação Xa, IXa e trombina.⁷³

O EDTA é o anticoagulante comumente usado para determinações hematológicas de rotina. Sua ação anticoagulante é através da quelação de íons cálcio, os quais são necessários para o processo de coagulação. Sais de K e Na têm sido utilizados, e embora todos sejam hiperosmolares, provocando a saída de água das células, causando retração, esse efeito é relatado somente com o K₃EDTA. Além das hemácias, podem ocorrer alterações morfológicas também nos leucócitos e plaquetas, que são dependentes do tempo em que a amostra permanece em contato com o anticoagulante e da concentração do mesmo.⁷³

A PCR é um dos marcadores inflamatórios mais estudados tanto em relação à utilidade diagnóstica e prognóstica, quanto a sua estabilidade, variabilidade e influências analíticas e pré-analíticas. No entanto os dados ainda são controversos quanto ao tipo de amostra a ser utilizada.

Foi reportado que o uso de plasma com EDTA e plasma citratado produzem diferenças de -12% e -16% na concentração de PCR-as quando comparado com soro.⁷⁶

Roberts *et al*⁷⁷ comparando dosagens de PCR-as em soro, plasma heparinizado e plasma com EDTA verificaram que, apesar de excelente correlação, amostras de plasma com EDTA forneceram resultados mais baixos. Em contraste, nenhuma diferença significativa foi encontrada quando amostras de soro, plasma heparinizado e plasma com EDTA foram simultaneamente coletadas em outro estudo.⁷⁸

A comparação de dosagens de NT-proBNP em soro, EDTA e heparina mostrou correlação excelente entre os resultados, facilitando a coleta de sangue, juntamente com outros biomarcadores de doença cardíaca, em uma mesma amostra.⁷⁹

Uma prática comum em laboratórios clínicos é coletar sangue em tubos com gel separador do soro, devido à vantagem da barreira de gel, a qual facilita rápida separação do soro dos constituintes celulares do sangue e previne hemólise durante armazenamento prolongado. Entretanto concentrações medidas de certos analitos podem ser reduzidas quando espécies são armazenadas neste tipo de tubo, devido à adsorção pelo gel.⁸⁰

Efeitos do tempo e da temperatura de armazenamento

Além do efeito dos anticoagulantes, o tempo e a temperatura de armazenamento das amostras e os passos de processamento para obtenção de soro ou plasma podem introduzir uma variável pré-analítica. Analitos sujeitos a metabolismo celular necessitam de rápida separação das células.⁷³ A centrifugação e separação da amostra sanguínea deve preferencialmente ocorrer dentro de 1 hora após a coleta e amostras de sangue total não devem ser armazenadas.⁷²

O efeito da temperatura varia em diferentes analitos. Por exemplo, a liberação de K^+ dos eritrócitos é mínima em temperatura ambiente, no entanto o armazenamento da amostra sob refrigeração (4°C) inibe a bomba Na^+ , K^+ -ATPase, resultando na saída do K^+ do interior das

células, causando um aumento espúrio nos níveis séricos ou plasmáticos. Por outro lado, os níveis de glicose diminuem cerca de 10% se a amostra permanecer em temperatura ambiente por 2 h, devido a glicólise anaeróbica nos eritrócitos.^{72,73}

As dosagens de marcadores cardíacos também são influenciadas pelo efeito de variáveis pré-analíticas. Vários estudos realizados com diferentes marcadores e até o momento somente dois avaliando a MPO mostram a importância do conhecimento de fatores pré-analíticos que podem influenciar os resultados e levar a erros na classificação de risco e na conduta clínica do paciente.

Shimizu *et al*⁸¹ avaliando a estabilidade do NT-proBNP em 72h, perceberam que a concentração foi menor nas amostras armazenadas em 25°C comparadas àquelas armazenadas a 4°C, embora outro estudo não tenha observado diferença nos resultados de amostras armazenadas em -80°C durante um ano, nem houve influência de ciclos de congelamento e descongelamento da amostra.⁸²

Em relação à MPO, o estudo de Chang *et al*⁸³ verificou que o tempo 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. Enquanto que em amostras mantidas em temperatura ambiente, aparentemente a MPO continuou sendo liberada dos leucócitos no decorrer do tempo até a centrifugação, o que também explica valores mais elevados no soro em relação ao plasma heparinizado, pois a amostra deve permanecer a temperatura ambiente por mais tempo para a formação do coágulo.

Estudo de Shih *et al*⁸⁴ avaliando amostras de indivíduos saudáveis e pacientes com suspeita de SCA, coletadas e armazenadas em diferentes tubos e temperaturas, antes e após a centrifugação do material, demonstrou que o tipo de tubo utilizado na coleta e o manejo da

amostra influenciam as concentrações de MPO. Os autores encontraram valores mais elevados em amostras de soro e plasma heparinizado em relação a plasma com EDTA e citrato. Além disso, verificaram que a concentração de MPO é estável em amostras coletadas em tubos contendo EDTA, tanto antes quanto após a centrifugação, como sangue total ou plasma.

Infelizmente é impossível eliminar todos os fatores interferentes no diagnóstico laboratorial, mas a consideração desses fatores pode facilitar a interpretação dos resultados. O laboratório deve ser crítico na seleção dos métodos e a amostra deve ser coletada, armazenada e processada corretamente.⁷²

Conclusões e perspectivas futuras

Pelo conhecimento atual, dados sugerem que a MPO pode servir tanto como marcador de doença cardiovascular, promovendo informações independentes no diagnóstico e prognóstico de pacientes e também como potencial causador da progressão e instabilização 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.⁸⁵

Estudos adicionais são necessários, principalmente relacionados à padronização da técnica de dosagem, métodos de coleta e armazenamento, estabilidade do analito e ao conhecimento de eventuais interferências analíticas e pré-analíticas. A uniformização das unidades de medida para expressão dos resultados e determinação de 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: 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.²

Ainda não está claro, o valor preditivo adicional dos níveis de MPO na estratificação de risco para incorporá-la à prática clínica como sinalizadora de vulnerabilidade de placa. Mais estudos 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 um ponto fundamental para a transição desse marcador do ambiente de pesquisa para uso na rotina clínica.

Referências Bibliográficas

1. Lente FV. Markers of inflammation as predictors in cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta* 2000; 293: 31-52.
2. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. *Circulation* 2003; 107: 499-511.
3. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
4. Ross R. Mechanisms of disease: atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
5. Hansson GK. Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
6. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102-11.

7. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation* 2003; 108: 1664-72.
8. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: part II. *Circulation* 2003; 108: 1772-78.
9. 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: C19-31.
10. Apple FS, Wu AHB, Mair J, Ravkilde J, Panteghini M, Tate J, *et al.* Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2005; 51: 810-824.
11. 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: 611-616.
12. Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, *et al.* Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106: 2894-2900.
13. 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: 1440-45.
14. 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.
15. Malle E, Marsche G, Panzenboeck U, Sattler W. Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006; 445: 245-255.

16. Podrez E, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 28: 1717-25.
17. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006; 445: 214-224.
18. Suzuki K, Muso E, Nauseef WM. Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: S1-S2.
19. Arnhold J. Free radicals – friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)* 2004; 69: 4-9.
20. Nicholls SJ, Hazen SL. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of coronary artery disease. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: S21-S22.
21. Brennan ML, Hazen S. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Curr Opin in Lipidology* 2003, 14: 353-59.
22. Heinecke JW. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91 (suppl): 12A-16A.
23. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med* 1999; 133: 321-325.
24. Lehtimaki T, Lehtinen S, Solakivi T, Nikkila M, Jaakkola O, Jokela H, *et al.* Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 23-27.
25. 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.
26. Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *Journal of Surgical Research* 2006; 133: 143-149.

27. Carr AC, Myzak MC, Stocker R, McCall MR, Frei B. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. *FEBS Letters* 2000; 487: 176-180.
28. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda SE, *et al.* Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277: 46116-122.
29. 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: 1095-1108.
30. Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald T, *et al.* The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *PNAS* 2004; 101: 13032-37.
31. Nicholls S, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 212-219.
32. Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, *et al.* Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004; 279: 42977-983.
33. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem* 2000; 275: 37524-32.
34. 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.
35. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, *et al.* Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2004; 110: 1134-39.

36. 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 Radical Biology & Medicine* 2004; 37: 902-911.
37. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1143-46.
38. 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: 879-891.
39. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002; 347: 5-12.
40. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function. A critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004; 109 (suppl II): 27-33.
41. 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.
42. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001; 276: 41279-87.
43. 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.
44. Tang WHW, 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: 796-799.

45. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 5425-30.
46. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, *et al.* Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002; 296: 2391-94.
47. 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: 615-624.
48. Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Thérroux P, Rouleau GA. A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *Am Heart J* 2001; 142: 336-9.
49. Asselbergs FW, Reynolds WF, Cohen-Tervaert JW. Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary artery disease. *Am J Med* 2004; 116: 429-30 (Letter).
50. Ueda M, Ehara S, Kobayashi Y, Naruko T, Shirai N, Hai E, *et al.* Plaque instability in human coronary atherosclerotic lesions: roles of oxidized LDL and neutrophils. *International Congress Series* 2004; 1262: 75-78.
51. 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.
52. Esporcate R, Rey HCV, Rangel FOD, Rocha RM, Mendonça HTF, Dohmann HFR, *et al.* Valor preditivo da mieloperoxidase na identificação de pacientes de alto risco admitidos por dor torácica aguda. *Arq Bras Cardiol* 2007; 89: 377-384.
53. 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.

54. Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C, Chopra V, Yanamadala S, Clark LT, *et al.* Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2007; 99: 1364-68.
55. Gach O, Biemar C, Mys 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. *Cor Art Dis* 2005; 16: 59-65.
56. Khan SQ, Kelly 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: 826-831.
57. 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.
58. Rodriguez AD, Fard SS, Gonzalez PA, Gonzalez MJG, Kaski JC. Prognostic value of admission myeloperoxidase levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and cardiogenic shock. *Am J Cardiol* 2008; 101: 1537-40.
59. Stefanescu A, Braun S, Ndrepepa G, Koppa T, Pavaci H, Mehilli J, *et al.* Prognostic value of plasma myeloperoxidase concentration in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J* 2008; 155: 356-60.
60. 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.
61. Tang WHW, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, *et al.* Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2364-70.

62. Meuwese MC, Stroes WS, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub 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.
63. 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.
64. 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: 426-431.
65. 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. *Clinica Chimica Acta* 2006; 368: 168-172.
66. Kumar AP, Reynolds WF. Statins downregulate myeloperoxidase gene expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 331: 442-451.
67. 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: 1871-78.
68. 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.
69. 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. *International Journal of Cardiology* 2004; 95: 307-313.

70. Dednam M, Vorster BC, Ubbink JB. Biological variation of myeloperoxidase. *Clin Chem* 2008; 54: 223-225.
71. Jaffe AS, Katus H. Acute coronary syndrome biomarkers. The need for more adequate reporting. *Circulation* 2004; 110: 104-106.
72. Irjala KM, Gronroos, PE. Preanalytical and analytical factors affecting laboratory results. *Annals of Medicine* 1998; 30: 267-72.
73. Narayanan, S. The preanalytical phase – an important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathology* 2000; 113: 429-452.
74. Stiegler H, Fischer Y, Jimenez JFV, Graf J, Filzmaier K, Fausten B, *et al.* Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin Chem* 2000; 46: 1338-44.
75. Gerhardt W, Nordin G, Herbert AK, Burzell BL, Isaksson A, Gustavsson E, *et al.* Troponin T and I assays show decreased concentrations in heparin plasma compared with serum: lower recoveries in early than in late phases of myocardial injury. *Clin Chem* 2000; 46: 817-821.
76. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variation in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin Chem* 2003; 49: 1258-71.
77. Roberts WL, Schwarz EL, Ayanian S, Rifai N. Performance characteristics of a point of care C-reactive protein assay. *Clinica Chimica Acta* 2001; 314: 255-259.
78. Rothkrantz-Kos S, Schmitz PJ, Bekers O, Menheere PPCA, van Dieijen-Visser MP. High-Sensitivity C-reactive protein methods examined. *Clin Chem* 2002; 48: 359-362.
79. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Measurement of Elecsys NT-proBNP in serum, K₂ EDTA and heparin plasma. *Clinical Biochemistry* 2007; 40: 747-748.
80. Dasgupta A, Chow L, Tso G, Nazareno L. Stability of NT-proBNP in serum specimens collected in Becton Dickinson Vacutainer (SST) tubes. *Clin Chem* 2003; 49: 958-960.

81. Shimizu H, Aono K, Masuta K, Asada H, Misaki A, Teraoka H. Stability of brain natriuretic peptide (BNP) in human blood samples. *Clinica Chimica Acta* 1999; 285: 169-172.
82. Nowatzke WL, Cole TG. Stability of N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide after storage frozen for one year and after multiple freeze-thaw cycles. *Clin Chem* 2003; 49: 1560-62.
83. 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. *Clinica Chimica Acta* 2006; 373: 158-163.
84. Shih J, Datwyler SA, Hsu SC, Matias MS, Pacenti DP, Lueders C, *et al.* Effect of collection tube type and preanalytical handling on myeloperoxidase concentrations. *Clin Chem* 2008; 54: 1076-79.
85. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* 2006; 111: 16-26.
86. Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, von Beckerath N, Schömig A, Kastrati A. Myeloperoxidase level in patients with stable coronary disease and acute coronary syndromes. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 90-96.

Tabela 1. Exemplos de estudos avaliando o valor prognóstico de níveis de MPO em indivíduos saudáveis e com doença cardíaca, evidenciando a variedade de reagentes e a falta de padronização na unidade de medida para expressão dos resultados:

Estudo	Reagente	Unidade/Material	Controles	Pacientes
Baldus et al¹³	Calbiochem	µg/L / soro	-	287 (1,5 – 1112)
Brennan et al⁵¹	Oxis Health	pM / plasma	120 (97 – 146)	198 (119 – 394)
Ng et al⁶⁰	ELISA (in house)	ng/mL / plasma*	-	33,9
Tang et al⁴⁴	PrognostiX	pM / plasma*	172 (125 – 225)	315 (218 – 808)
Tang et al⁶¹	PrognostiX	pM / plasma*	172 (125 – 225)	303 (256 - 430)
Esporcatte et al⁵²	Oxis Health	pM / plasma	88 (54 – 704)	186 (99 – 521)
Mocatta et al⁵⁷	ELISA (in house)	ng/mL / plasma*	39 (29 – 49)	55 (38 – 75)
Khan et al⁵⁶	ELISA (in house)	ng/mL / plasma*	27 (8 – 79)	36 (18 – 61)
Cavusoglu et al⁵⁴	Assay Designs	ng/mL / plasma	-	20,3
Meuwese et al⁶²	PrognostiX	pmol/L / soro	638 (454 – 951)	704 (492 – 1021)
Rodriguez et al⁵⁸	Oxis Health	ng/mL / soro	-	81 ± 28
Stefanescu et al⁵⁹	Mercodia	µg/L / plasma*	-	<53; 53-75; >75
Ndrepepa et al⁸⁶	Mercodia	µg/L / plasma*	61 (45 – 81)	75 (53 – 135)

* plasma coletado em tubos contendo EDTA; resultados expressos como mediana (intervalo); ponto de corte; tercis e média ± DP. Pacientes: indivíduos com doença cardíaca (SCA, ICC, DAC estável).

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Efeito de Variáveis Pré-Analíticas nos Níveis de Mieloperoxidase

Andrea Elisabet Wendland

Joíza Lins Camargo

Carisi Anne Polanczyk

Programa de Pós-Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Título abreviado: Variáveis pré-analíticas e mieloperoxidase

Palavras-chaves: Mieloperoxidase, Inflamação, Doença Cardiovascular, Variáveis Pré-Analíticas

Endereço para correspondência:

Andrea Elisabet Wendland

Av. Prof. Cristiano Fischer, 2062/526

91410-000, Porto Alegre, RS

Fone: 51 3339-2796

E-mail: andrea.wendland@ig.com.br

Resumo

Introdução: A mieloperoxidase (MPO) participa na promoção e propagação da aterosclerose. Vários estudos têm demonstrado o valor prognóstico de níveis elevados de MPO para eventos cardiovasculares, no entanto, informações sobre variabilidade pré-analítica são incompletas. O objetivo do estudo foi avaliar a influência de diferentes tipos de amostra e métodos de armazenamento nas dosagens de MPO.

Métodos: Quarenta voluntários (17 homens) com idades entre 21 e 75 anos foram incluídos no estudo: 15 com doença cardíaca e 25 sem doença. A MPO foi dosada em 4 amostras de sangue de cada participante usando método ELISA: plasma heparinizado (MPO-Hep), plasma com EDTA (MPO-EDTA), soro com gel separador (MPO-Gel) e soro sem gel separador (MPO-Soro). Para verificar a estabilidade da MPO, 40 alíquotas de plasma heparinizado foram armazenadas em temperatura ambiente (18-25°C), geladeira (2-8°C) e freezer -20°C e -80°C por período determinado.

Resultados: Níveis de MPO variaram de 16 a 69 ng/mL, sem diferença entre homens e mulheres (31 vs 27 ng/mL; P=0,31), mas foram mais elevados em pacientes com doença cardíaca quando comparados aos voluntários saudáveis (35 vs 25 ng/mL; P= 0,03). Os coeficientes de variação analíticos intra e interensaio foram 8,1% e 10,1%. Não houve diferença estatística entre níveis de MPO-Hep, MPO-Gel e MPO-Soro (29 ng/mL, 29 ng/mL; P=0,87 e 30 ng/mL; P=0,25), e MPO-Hep apresentou boa correlação com MPO-Gel e MPO-Soro ($r=0,775$ e $r=0,792$; $P<0,001$). Níveis de MPO-EDTA não apresentaram correlação com MPO-Hep ($r=0,21$; $P=0,20$), com valores em média 1,8 vezes mais elevados nas amostras com EDTA (51 vs 29 ng/mL; $P<0,001$). Não houve influência do método de armazenamento da amostra nos níveis de MPO.

Conclusões: Entre os fatores estudados, somente a coleta de MPO em tubos com EDTA apresentou efeito significativo nos resultados. Níveis de MPO apresentaram boa correlação entre

plasma heparinizado e soro com e sem gel separador e se mantiveram estáveis durante 6 meses de armazenamento.

Introdução

A inflamação tem sido relacionada a todos os estágios do desenvolvimento da placa aterosclerótica, desde o desenvolvimento da disfunção endotelial inicial, formação do ateroma até a ruptura da placa com suas complicações trombóticas,¹⁻⁵ sendo foco de estudo de diferentes biomarcadores inflamatórios.^{6,7}

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. Enquanto linfócitos e monócitos têm sido considerados importantes contribuintes na fisiopatologia da doença cardiovascular, principalmente pela geração de citocinas pró-inflamatórias, os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) podem modular e sinalizar rotas inflamatórias pela secreção de enzimas que interagem em órgãos-alvo, como a mieloperoxidase.^{8,9}

A mieloperoxidase (MPO), mais abundante componente dos grânulos azurofílicos dos leucócitos, secretada após ativação e degranulação dos leucócitos, contribuindo para a defesa imune inata, tem surgido como potencial participante na promoção e propagação da aterosclerose.⁴ A MPO, através da geração de radicais livres e oxidantes difusíveis, pode oxidar colesterol LDL, propagando a ingestão por macrófagos e perpetuando a formação de células espumosas,¹⁰⁻¹² além de provocar modificações oxidativas no HDL, prejudicando o transporte reverso de colesterol.^{13,14} Tem sido demonstrado que a MPO ativa metaloproteinases promovendo desestabilização e ruptura da placa aterosclerótica,¹⁵⁻¹⁷ consome cataliticamente o óxido nítrico (ON) derivado do endotélio, reduzindo sua biodisponibilidade e prejudicando suas funções vasodilatadoras e anti-inflamatórias,¹⁸⁻²⁰ podendo também contribuir para o remodelamento ventricular adverso após o infarto.^{20,21}

Vários estudos envolvendo indivíduos saudáveis,²² pacientes com coronariopatia crônica,^{23,24} aguda,²⁵⁻²⁸ em investigação por dor torácica,^{29,30} assim como naqueles com insuficiência cardíaca,³¹⁻³³ têm demonstrado associação prognóstica entre os níveis elevados de MPO e eventos cardiovasculares adversos. Entretanto, para a MPO ser útil na prática clínica, estudos adicionais sobre a disponibilidade de métodos analíticos acurados e reproduzíveis são fundamentais, incluindo aspectos sobre a influência de fatores pré-analíticos como o tipo de amostra, manipulação e armazenamento da amostra.³⁴

Informações referentes a fontes de variabilidade pré-analítica da MPO são incompletas e sabe-se que são de fundamental importância para garantir a qualidade dos resultados e uma conduta clínica correta. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência de diferentes tipos de amostra e seus métodos de armazenamento nas dosagens de MPO.

Material e métodos

Amostras

O estudo seguiu os protocolos do CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*) para validação de metodologias.³⁵

Foram coletadas amostras de sangue de 40 voluntários (25 saudáveis e 15 pacientes com doença cardíaca), sendo 17 homens e 23 mulheres, com idade entre 21 e 75 anos. Os indivíduos com doença cardíaca compreenderam 8 com Doença Arterial Coronariana Estável, 3 com Síndrome Coronariana Aguda e 4 com Insuficiência Cardíaca. Todos os participantes responderam um questionário com informações clínicas e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

Coleta de sangue e armazenamento da amostra

O desenho do estudo está demonstrado na Figura 1. Foram coletadas 4 amostras de sangue de cada participante do estudo (tubos Vacuette[®] Greiner Bio-one): 1 amostra de plasma heparinizado (MPO-Hep), 1 de plasma com EDTA (MPO-EDTA), 1 de soro (MPO-Soro) e 1 de soro com gel separador (MPO-Gel).

Imediatamente após a coleta, os tubos foram invertidos gentilmente para homogeneização do material e colocados em banho de gelo, onde permaneceram até a centrifugação, a 3000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, soro (com e sem gel) e plasma (com EDTA e heparinizado) foram divididos em alíquotas para serem usadas em cada procedimento do estudo.

Para comparar os resultados de MPO obtidos com os diferentes tubos de coleta utilizados, foram separadas alíquotas de soro, dos tubos com gel e sem gel, e de plasma heparinizado e com EDTA, de cada voluntário, que ficaram armazenadas em freezer -20°C por 36 horas até a dosagem.

Para verificar a estabilidade da MPO frente a diferentes períodos e temperaturas de armazenamento, foram separadas alíquotas de plasma heparinizado (n=40), amostra ideal segundo o fabricante do reagente, armazenadas em temperatura ambiente (18-25°C) por 3 dias; em geladeira (2-8°C) por 3 e 7 dias; em freezer (-20°C) por 7, 30, 90 e 180 dias e em freezer (-80°C) por 30, 90 e 180 dias.

Para estudos de imprecisão analítica, foram separadas 20 alíquotas de plasma heparinizado de uma mesma amostra, armazenadas em freezer -20°C, dosadas no mesmo dia (CV intra-ensaio) e 20 alíquotas de plasma heparinizado de uma mesma amostra, armazenadas em freezer -80°C, dosadas em diferentes dias (CV inter-ensaio), durante todo o período de dosagens.

Dosagem da amostra e metodologia

A dosagem de MPO foi realizada através de método ELISA, com o reagente BIOXYTECH[®] MPO-EIA[™] (OXIS Health Products, Inc. Estados Unidos). Cada placa incluía

uma solução padrão de MPO (50 ng/mL) para realização de uma curva padrão de 6 pontos, através de diluição seriada.

Todas as amostras foram diluídas 1:10 conforme orientação do fabricante para que a concentração estivesse dentro da faixa de linearidade do método (1,56-25 ng/mL). A leitura das absorbâncias foi em 405 nm, realizada no equipamento ETI-Max 3000 DiaSorin.

Análise estatística

Variáveis contínuas são apresentadas como média \pm desvio-padrão. Variáveis categóricas como números e porcentagem. Os níveis de MPO apresentaram distribuição normal. As diferenças entre as médias foram avaliadas através de teste T de Student para variáveis contínuas e teste de Qui-quadrado para variáveis categóricas. A correlação entre os diferentes tipos de amostra foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson e as médias das diferenças através do método de Bland-Altman. A estabilidade da amostra frente às diferentes formas de armazenamento foi avaliada através de ANOVA para medidas repetidas e do coeficiente de correlação intra-classe. Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS 14.0 e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $P < 0,05$.

Resultados

As características da amostra estão demonstradas na Tabela 1. A média de idade foi de 45 (21-75) anos. Os valores de MPO na amostra variaram de 16 a 69 ng/mL (média 29 ng/mL), sem diferença entre homens e mulheres (31 ± 12 ng/mL vs 27 ± 12 ng/mL; $P=0,31$). Níveis de MPO foram significativamente mais elevados em indivíduos com doença cardíaca em comparação aos voluntários saudáveis (35 ± 15 ng/mL vs 25 ± 8 ng/mL; $P=0,03$). Os coeficientes de variação analíticos (CV) intra e inter-ensaio foram de 8,1% e 10,1%, respectivamente.

Efeito dos anticoagulantes

Comparando os resultados de MPO obtidos nos diferentes tipos de amostra, não foi encontrada diferença significativa entre plasma heparinizado (29 ± 12 ng/mL) e soro coletado em tubo com gel (29 ± 13 ng/mL; $P=0,87$) ou sem gel (30 ± 14 ng/mL; $P=0,25$). Entretanto, quando a amostra foi coletada em tubo contendo EDTA como anticoagulante, foi encontrada uma diferença significativa em relação ao plasma heparinizado, com valores em média 1,8 vezes mais elevados (51 ± 15 ng/mL vs 29 ± 12 ng/mL; $P<0,001$) (Figura 2).

Resultados de MPO-Gel e MPO-Soro apresentaram boa correlação com aqueles obtidos em MPO-Hep, com $r=0,775$ e $r=0,792$; $P<0,001$, respectivamente. Entre MPO-EDTA e MPO-Hep, não houve correlação ($r=0,21$; $P=0,20$) (Figura 3).

O gráfico das diferenças de Bland-Altman³⁶ revelou uma diferença média de 24,7 ng/mL (IC95% 19,5-30,0 ng/mL), de 0,225 ng/mL (IC95% -2,54-2,99 ng/mL) e de 1,55 ng/mL (IC95% -1,16-4,26 ng/mL) entre MPO-Hep e MPO-EDTA, MPO-Gel e MPO-Soro, respectivamente (Figura 4).

Efeito das condições de armazenamento

O comportamento dos níveis de MPO quando as amostras foram armazenadas em diferentes temperaturas e períodos, pode ser visualizado na Figura 5.

Foi observada uma elevação dos níveis de MPO nas amostras armazenadas em relação aos níveis encontrados na primeira dosagem, que ocorreu em 36 horas, sendo significativa somente a partir do período de 7 dias, tanto nas amostras armazenadas em geladeira ($2-8^{\circ}\text{C}$) quanto naquelas armazenadas a -20°C (29 ± 12 vs 37 ± 17 ng/mL; $P<0,001$ e 33 ± 16 ng/mL; $P=0,006$). Este incremento se manteve constante nas demais alíquotas armazenadas ao longo do período avaliado. Não houve diferença nos valores de MPO entre as amostras armazenadas por 30, 90 e 180 dias, tanto em -20°C (38 ± 17 vs 36 ± 18 ng/mL; $P=0,12$ vs 42 ± 24 ng/mL; $P=0,21$) quanto

em -80°C (37 ± 17 vs 35 ± 19 ng/mL; $P=0,33$ vs 42 ± 28 ng/mL; $P=0,16$). Avaliando a estabilidade das amostras ao longo de todo o período de armazenamento, verificamos moderada correlação entre os resultados, com coeficiente de correlação intra-classe (CCI) de 0,598 (IC95% 0,480-0,724; $P<0,001$). Comparando amostras armazenadas na mesma temperatura ao longo do tempo, as correlações foram melhores, com $\text{CCI}=0,678$ (IC95% 0,540-0,798; $P<0,001$) para aquelas armazenadas em -20°C e $\text{CCI}=0,667$ (IC95% 0,507-0,795; $P<0,001$) para amostras armazenadas em -80°C .

Discussão

Em nosso estudo, comparamos os resultados das dosagens de MPO em plasma heparinizado, amostra ideal segundo o fabricante do reagente, com os resultados obtidos em plasma com EDTA e soro coletado em tubos com e sem gel separador. Não encontramos diferença nos resultados de MPO entre plasma heparinizado e soro, tanto nos tubos com ou sem gel separador. No entanto, uma diferença significativa foi verificada nos resultados de MPO de amostras coletadas em tubos com EDTA. O plasma com EDTA forneceu resultados em média 107% mais elevados em relação ao plasma heparinizado, sendo que esses valores foram maiores que 150% em 9 amostras.

Pelo conhecimento atual, dados sugerem que a MPO possa servir tanto como marcador de doença cardiovascular promovendo informações independentes no diagnóstico e prognóstico de pacientes e também como potencial causador da progressão e instabilização de lesões ateroscleróticas no momento da isquemia aguda.³⁷

No entanto pouco se sabe sobre as influências de fatores pré-analíticos nos métodos de dosagem da MPO. Além disso, os pontos de corte aplicados nos estudos são discrepantes, talvez devido aos diferentes tipos de amostra utilizados e ao manejo dessas, levando a incerteza quanto

aos limites de decisão, demonstrando a necessidade de estudos de performance analítica e pré-analítica.³⁴

Vários estudos realizados com outros marcadores de doença cardíaca e, até o momento, somente dois relacionados à MPO, mostram a importância do conhecimento de fatores pré-analíticos que influenciam as dosagens.³⁸⁻⁴⁸ Stiegler *et al*³⁸ compararam resultados de troponina em amostras de soro e plasma heparinizado e encontraram amostras com valores 20% menores no plasma heparinizado em relação ao soro nos 3 diferentes ensaios utilizados. Estudo semelhante realizado por Gerhardt *et al*³⁹ também encontrou valores 15% menores de troponina em plasma heparinizado em relação ao soro.

A PCR é um dos marcadores inflamatórios mais estudados tanto em relação à utilidade diagnóstica e prognóstica, quanto a sua estabilidade, variabilidade e influências analíticas e pré-analíticas. No entanto, os dados ainda são controversos quanto ao tipo de amostra a ser utilizada. Foi reportado que o uso de plasma com EDTA e plasma citratado produziram diferenças de -12% e -16% na concentração de PCR-as quando comparado com soro.⁴⁰

A comparação de dosagens de NT-proBNP em soro, EDTA e heparina mostrou correlação excelente entre os resultados, facilitando a coleta de sangue, juntamente com outros biomarcadores de doença cardíaca, em uma mesma amostra.⁴¹

Shimizu *et al*⁴² avaliando a estabilidade do NT-proBNP em 72h, perceberam que a concentração foi menor nas amostras armazenadas em 25°C comparadas àquelas armazenadas a 4°C, já outro estudo não observou diferença nos resultados de amostras armazenadas em -80°C durante um ano, nem tampouco houve influência de ciclos de congelamento e descongelamento da amostra.⁴³

Chang *et al*⁴⁴ comparando resultados de MPO em amostras de plasma heparinizado e soro, encontraram resultados muito mais elevados no soro, o que pode ser explicado pelo fato da amostra ter permanecido mais tempo em temperatura ambiente para a formação do coágulo antes

da centrifugação e separação do material, com conseqüente liberação da enzima do interior dos leucócitos. Nosso estudo não encontrou essa diferença, pois todas as amostras foram colocadas em banho de gelo imediatamente após a coleta, evitando a liberação da enzima para o meio. Todos os tubos de coleta de soro continham ativador de coágulo.

Outro estudo, avaliando amostras coletadas em diferentes tubos, encontrou valores mais elevados de MPO em amostras de soro e de plasma heparinizado em relação a plasma com EDTA ou citrato.⁴⁵ Nas amostras de plasma heparinizado os níveis de MPO foram aproximadamente 10% mais elevados em relação ao plasma com EDTA, enquanto que para as amostras de soro esses valores foram até 100% maiores. Entre plasma com EDTA ou citratado não foi encontrada diferença significativa. Esses achados diferem de nosso estudo que encontrou valores muito mais elevados nas amostras coletadas com EDTA.

Algumas hipóteses podem ser levantadas em relação às alterações observadas com EDTA. Sabe-se que os neutrófilos são sujeitos a mudanças morfológicas quando o sangue é coletado com EDTA, que são dependentes do tempo de contato e da concentração utilizada, sendo que pequenas mudanças já aparecem mesmo em concentrações ótimas do anticoagulante. Essas mudanças incluem dilatação dos neutrófilos com perda da estrutura dos lóbulos, seguida pela perda da granulação e do aparecimento de vacúolos no citoplasma e no núcleo das células. Acima de 3 horas após a coleta do material as células podem se desintegrar.⁴⁹ Essa perda da granulação dos neutrófilos poderia ser um possível fator contribuidor para o aumento da concentração de MPO no plasma coletado com EDTA. Para não haver prejuízo na correta avaliação clínica e estratificação de risco dos pacientes, a coleta nesse tubo deveria ser melhor avaliada e estudos para determinar valores de referência nesse tipo de amostra deveriam ser realizados.

Discrepâncias semelhantes também foram descritas para outros marcadores, por exemplo, Roberts *et al*⁴⁶ comparando dosagens de PCR-as em soro, plasma heparinizado e plasma com

EDTA verificaram que, apesar de excelente correlação, amostras de plasma com EDTA forneceram resultados mais baixos. Em contraste, nenhuma diferença significativa foi encontrada quando amostras de soro, plasma heparinizado e plasma com EDTA foram simultaneamente coletadas em outro estudo.⁴⁷

Nosso estudo também avaliou a estabilidade da MPO em diferentes períodos e temperaturas de armazenamento, desde 3 dias em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (2-8°C), até 6 meses em freezer -20°C e -80°C. Apesar do aumento dos níveis de MPO verificado entre a primeira dosagem e as demais, que se tornou mais evidente a partir do período de 7 dias, consideramos que essa diferença não seja em função do tempo ou da temperatura de armazenamento, pois não houve elevação sistemática dos níveis ao longo do tempo, entre amostras armazenadas por período maior (30, 90 e 180 dias) tanto em -20°C quanto em -80°C. Além disso, alíquotas separadas para determinação dos CV analíticos também não apresentaram elevação dos níveis ao longo do período de armazenamento.

Nossa hipótese, baseada nos achados de Chang *et al*,⁴⁴ é que essa diferença tenha sido causada pelo tempo em que o plasma ficou em contato com os constituintes celulares durante o período em que as amostras permaneceram em temperatura ambiente, aproximadamente 2 horas, desde a centrifugação até a separação das alíquotas. No estudo de Chang *et al*⁴⁴ foi verificado que o tempo em que a amostra de sangue total permanece em temperatura ambiente antes da centrifugação afeta de maneira importante o conteúdo de MPO no plasma, e que esse aumento é proporcional ao tempo, com a concentração podendo quase dobrar quando a amostra permanece em temperatura ambiente por 1 hora antes da centrifugação. Amostras colocadas em banho de gelo após a coleta, mesmo com a centrifugação ocorrendo em temperatura ambiente não apresentaram aumento na concentração de MPO. Enquanto que naquelas mantidas em temperatura ambiente, aparentemente a MPO continuou sendo liberada dos leucócitos até o momento da centrifugação.

Resultados encontrados no estudo de Shih *et al*⁴⁵ também reforçam essa hipótese. Amostras de plasma, após a separação do sobrenadante, armazenadas em temperatura ambiente por 2 dias, entre 2-8°C por 8 dias e após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, apresentaram diferenças inferiores a 10% nos níveis de MPO. No entanto nesse mesmo estudo foi demonstrado um aumento de 4 vezes nos níveis de MPO nas amostras coletadas em tubos contendo heparina, armazenadas em temperatura ambiente por 2h, antes da centrifugação do material, enquanto que aquelas amostras mantidas em banho de gelo permaneceram relativamente estáveis.

Diferentemente de Chang *et al*⁴⁴ e Shih *et al*,⁴⁵ que verificaram o aumento dos níveis de MPO no sangue total antes da centrifugação da amostra, nós percebemos, em nosso estudo, que a liberação da enzima parece continuar ocorrendo mesmo após a centrifugação do material. Portanto, mesmo que as amostras tenham sido colocadas em banho de gelo após a coleta, a separação do plasma deve ser feita imediatamente após a centrifugação, para evitar falsa elevação dos resultados decorrente da contínua liberação da enzima para o plasma em contato com as células.

Avaliando os resultados de nosso estudo, bem como aqueles encontrados por Shih *et al*,⁴⁵ percebemos que após a separação do plasma dos constituintes celulares, a concentração de MPO aparentemente não sofre influência da temperatura e do período de armazenamento da amostra, informação útil para pesquisadores e clínicos que pretendem armazenar amostras para dosagens futuras. O que é fundamental ser observado na dosagem de MPO e que afeta de modo importante os resultados é o período em que a amostra permanece em contato com os constituintes celulares, tanto na forma de sangue total quanto como plasma após a centrifugação.

Uma prática comum em laboratórios clínicos é coletar sangue em tubos com gel separador do soro, devido à vantagem da barreira de gel, a qual facilita rápida separação do soro dos constituintes celulares do sangue e previne hemólise durante armazenamento prolongado.

Entretanto concentrações medidas de certos analitos podem ser reduzidas quando espécies são armazenadas neste tipo de tubo, devido à adsorção pelo gel.⁴⁸ Nosso estudo não mostrou diferença significativa entre amostras coletadas com heparina e soro com ou sem gel separador, assim como Dasgupta *et al*⁴⁸ também não verificaram com amostras de NT-proBNP. Além disso, houve boa correlação entre os resultados de MPO encontrados nesses 3 tipos de amostra, o que permite a coleta da amostra para análise de vários marcadores cardíacos em um mesmo tubo, possibilitando maior rapidez na coleta, maior economia para a instituição e maior conforto para o paciente.

Algumas limitações podem ser descritas para nosso estudo. O fato de desconhecermos a ocorrência da liberação da enzima do interior dos leucócitos para o plasma após a centrifugação das amostras, mesmo quando colocadas em banho de gelo logo após a coleta, dificultou a interpretação dos nossos resultados, que embora apontassem para a possibilidade de não haver influência do armazenamento nos níveis de MPO, só foram confirmadas através de estudos publicados posteriormente. Novo estudo realizado com períodos pré-determinados de permanência das amostras em contato com as células antes da separação das alíquotas, tanto em temperatura ambiente quanto em banho de gelo, poderia fornecer dados mais completos em relação à influência deste fator e a porcentagem de alteração dos níveis de MPO. A influência do armazenamento foi avaliada somente para amostras de plasma heparinizado. Estudar esta influência nos demais tipos de amostras poderia disponibilizar dados importantes sobre o assunto.

Ainda há muito para ser estudado em relação a fatores que possam influenciar os resultados de MPO. Estudos demonstram que as estatinas reduzem os níveis de MPO⁵⁰ e a administração de heparina provoca a mobilização da MPO ligada à parede do vaso, aumentando a concentração plasmática.⁵¹ Pouco se sabe sobre o efeito da atividade física⁵² nos níveis de MPO e sobre a variabilidade biológica deste analito.⁵³ No entanto não há estudos sobre a influência de

drogas anti-inflamatórias, terapia hormonal, bem como a ação do álcool, fumo e obesidade sobre esta enzima.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a coleta de MPO em tubos contendo EDTA altera de modo expressivo os resultados. Demais aspectos como tempo de armazenamento e tipo de amostra não tiveram efeito nos resultados. Estudos adicionais que avaliem variabilidade analítica e pré-analítica são necessários, assim como a uniformização das unidades de medida para expressão dos resultados, determinação de valores de referência populacionais e desenvolvimento de ensaios comercialmente disponíveis, padronizados e automatizados capazes de aumentar a agilidade e diminuir a imprecisão analítica, ponto fundamental para a transição desse marcador do ambiente de pesquisa para uso na rotina clínica.

Referências Bibliográficas

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
2. Ross R. Mechanisms of disease: atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
3. Hansson GK. Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
4. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102-11.
5. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111: 3481-88.

6. Lente FV. Markers of inflammation as predictors in cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta* 2000; 293: 31-52.
7. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. *Circulation* 2003; 107: 499-511.
8. Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, *et al.* Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106: 2894-2900.
9. 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: 611-616.
10. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med* 1999; 133: 321-325.
11. 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.
12. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda SE, *et al.* Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277: 46116-122.
13. Nicholls S, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 212-219.
14. Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, *et al.* Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004; 279: 42977-983.
15. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1143-46.

16. 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.
17. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001; 276: 41279-87.
18. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 5425-30.
19. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, *et al.* Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2004; 110: 1134-39.
20. 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 Radical Biology & Medicine* 2004; 37: 902-911.
21. 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.
22. Meuwese MC, Stroes WS, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub 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.
23. 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.

24. Stefanescu A, Braun S, Ndrepepa G, Koppara T, Pavaci H, Mehilli J, *et al.* Prognostic value of plasma myeloperoxidase concentration in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J* 2008; 155: 356-60.
25. 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: 1440-45.
26. Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C, Chopra V, Yanamadala S, Clark LT, *et al.* Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2007; 99: 1364-68.
27. Khan SQ, Kelly 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: 826-831.
28. 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.
29. 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.
30. Esporcate R, Rey HCV, Rangel FOD, Rocha RM, Mendonça HTF, Dohmann HFR, *et al.* Valor preditivo da mieloperoxidase na identificação de pacientes de alto risco admitidos por dor torácica aguda. *Arq Bras Cardiol* 2007; 89: 377-384.
31. Tang WHW, 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: 796-799.
32. 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.

33. Tang WHW, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, *et al.* Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2364-70.
34. Morrow DA. Appraisal of myeloperoxidase for evaluation of patients with suspected acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2001-02.
35. Protocolo CLSI EP9-A: Method comparison and bias estimation using patient samples. Approved Guideline, 1995. Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne. PA).
36. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 8: 307-310.
37. Roman RM, Wendland AE, Polanczyk CA. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. *Arq Bras Cardiol* 2007; 91: e12-e19.
38. Stiegler H, Fischer Y, Jimenez JFV, Graf J, Filzmaier K, Fausten B, *et al.* Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin Chem* 2000; 46: 1338-44.
39. Gerhardt W, Nordin G, Herbert AK, Burzell BL, Isaksson A, Gustavsson E, *et al.* Troponin T and I assays show decreased concentrations in heparin plasma compared with serum: lower recoveries in early than in late phases of myocardial injury. *Clin Chem* 2000; 46: 817-821.
40. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variation in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin Chem* 2003; 49: 1258-71.
41. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Measurement of Elecsys NT-proBNP in serum, K₂ EDTA and heparin plasma. *Clin Biochem* 2007; 40: 747-748.
42. Shimizu H, Aono K, Masuta K, Asada H, Misaki A, Teraoka H. Stability of brain natriuretic peptide (BNP) in human blood samples. *Clinica Chimica Acta* 1999; 285: 169-172.
43. Nowatzke WL, Cole TG. Stability of N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide after storage frozen for one year and after multiple freeze-thaw cycles. *Clin Chem* 2003; 49: 1560-62.

44. 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. *Clinica Chimica Acta* 2006; 373: 158-163.
45. Shih J, Datwyler SA, Hsu SC, Matias MS, Pacenti DP, Lueders C, *et al.* Effect of collection tube type and preanalytical handling on myeloperoxidase concentrations. *Clin Chem* 2008; 54: 1076-79.
46. Roberts WL, Schwarz EL, Ayanian S, Rifai N. Performance characteristics of a point of care C-reactive protein assay. *Clinica Chimica Acta* 2001; 314: 255-259.
47. Rothkrantz-Kos S, Schmitz PJ, Bekers O, Menheere PPCA, van Dieijen-Visser MP. High-Sensitivity C-reactive protein methods examined. *Clin Chem* 2002; 48: 359-362.
48. Dasgupta A, Chow L, Tso G, Nazareno L. Stability of NT-proBNP in serum specimens collected in Becton Dickinson Vacutainer (SST) tubes. *Clin Chem* 2003; 49: 958-960.
49. Narayanan S. The preanalytical phase – an important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathology* 2000; 113: 429-452.
50. 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. *Clinica Chimica Acta* 2006; 368: 168-172.
51. 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: 1871-78.
52. 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.

53. Dednam M, Vorster BC, Ubbink JB. Biological variation of myeloperoxidase. Clin Chem 2008; 54: 223-225.

Tabela 1: Características da amostra:

	Controles (n = 25)	Indivíduos com cardiopatia (n = 15)
Idade *, anos	35 (21-69)	60 (37-75)
Sexo		
Masculino	8 (32%)	9 (60%)
Feminino	17 (68%)	6 (40%)
Medicamentos		
AAS	-	11 (73%)
Estatinas	1 (4%)	10 (67%)
Heparina	-	6 (40%)
Ticlopidina	-	1 (8%)
Angina	-	4 (27%)
Dislipidemia	3 (12%)	10 (67%)
Diabetes Mellitus	-	3 (20%)
Hipertensão arterial	1 (4%)	12 (80%)
Insuficiência renal	-	4 (27%)
Doença inflamatória	2 (8%)	-
Doença arterial coronariana prévia	-	10 (67%)
Neoplasia	-	1 (7%)
Mieloperoxidase ** ng/mL	25 (16-46)	35 (18-69)

Idade e Mieloperoxidase: média (mínimo e máximo); AAS: ácido acetil salicílico; * P < 0,001; ** P = 0,03

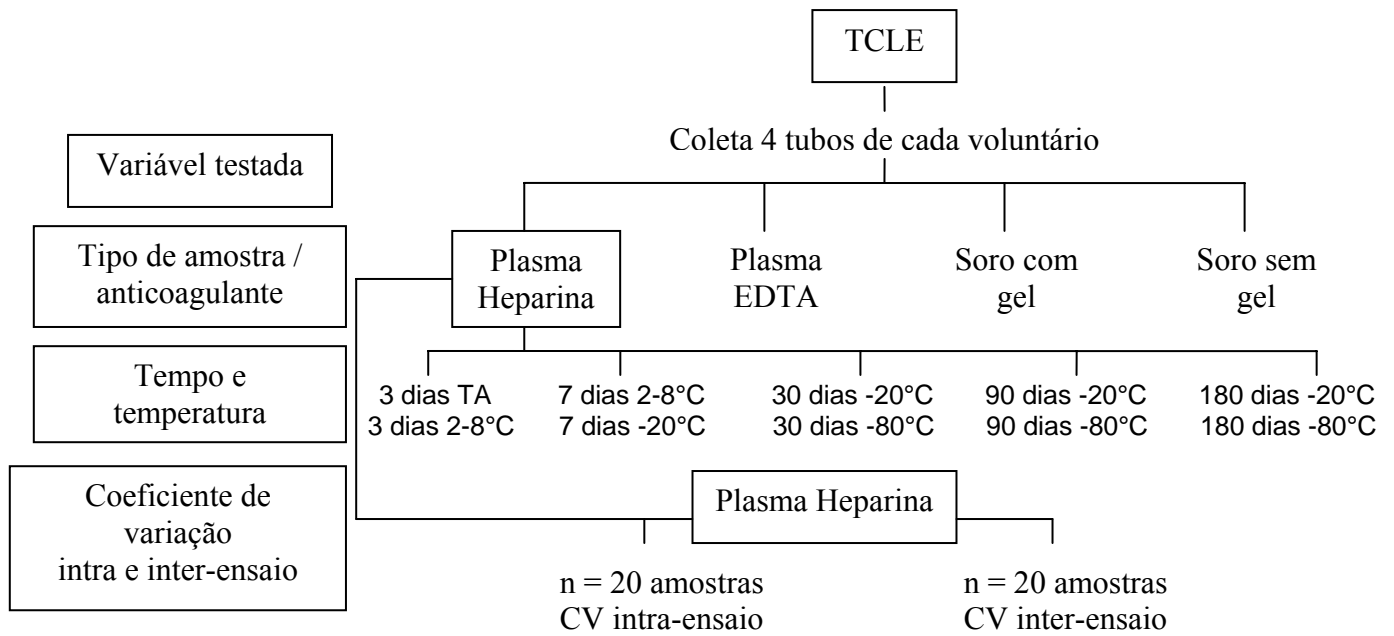


Figura 1. Desenho do estudo:

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; TA: temperatura ambiente; CV: coeficiente de variação; EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

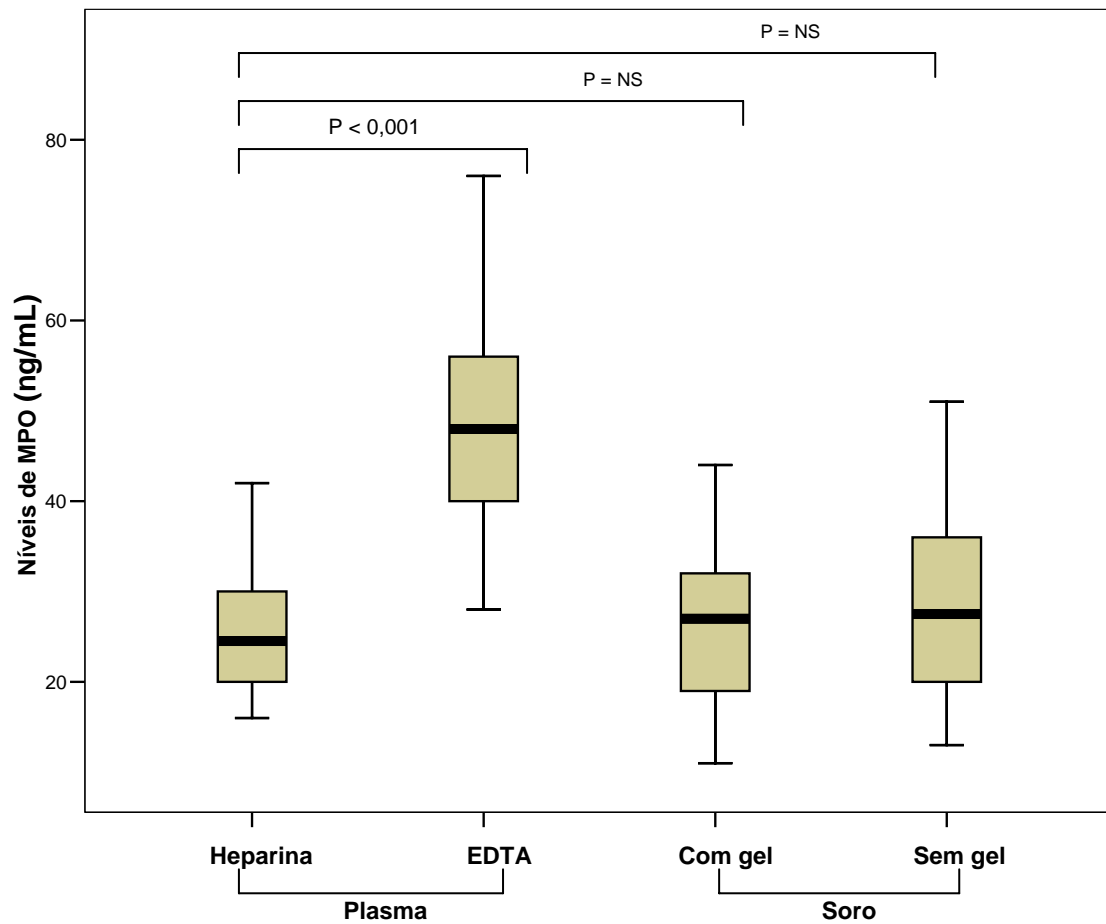


Figura 2. Efeito dos diferentes tipos de anticoagulantes nos níveis de MPO: comparação entre plasma (heparina e EDTA) e soro (com e sem gel separador).

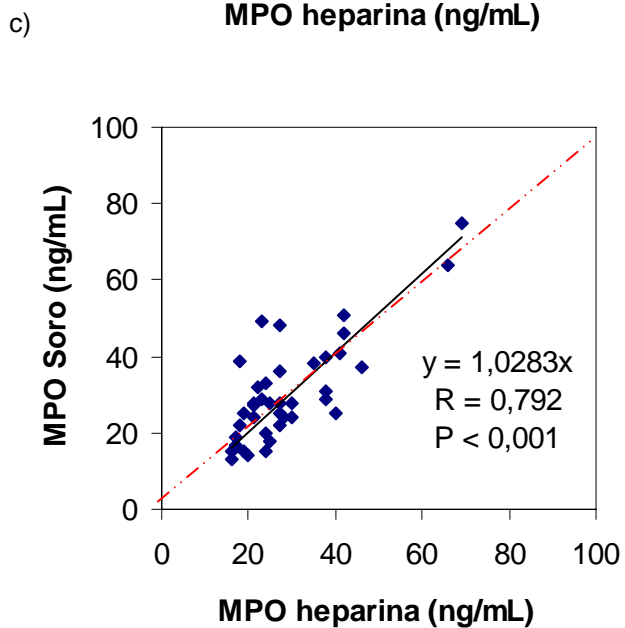
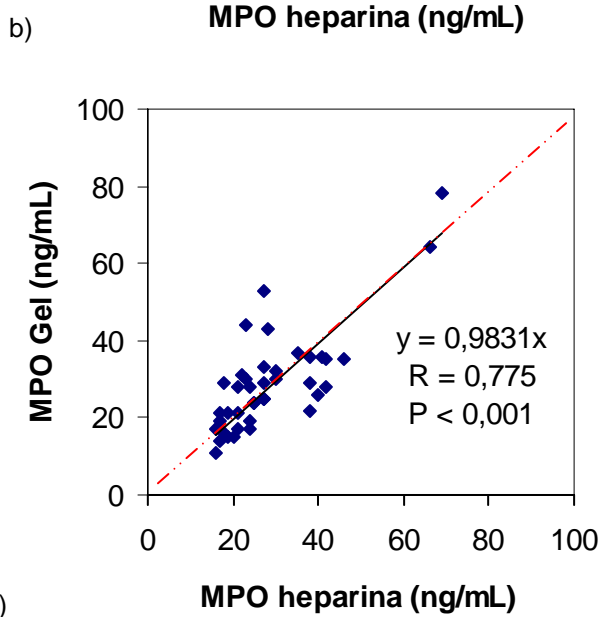
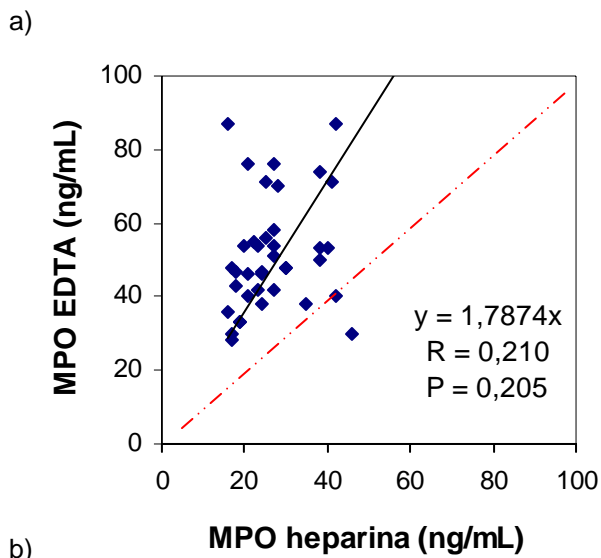


Figura 3: Níveis de MPO nos diferentes tipos de amostra: correlação entre MPO heparina e a) MPO EDTA, b) MPO gel e c) MPO soro. As linhas pontilhadas representam a linha de igualdade onde $Y = X$.

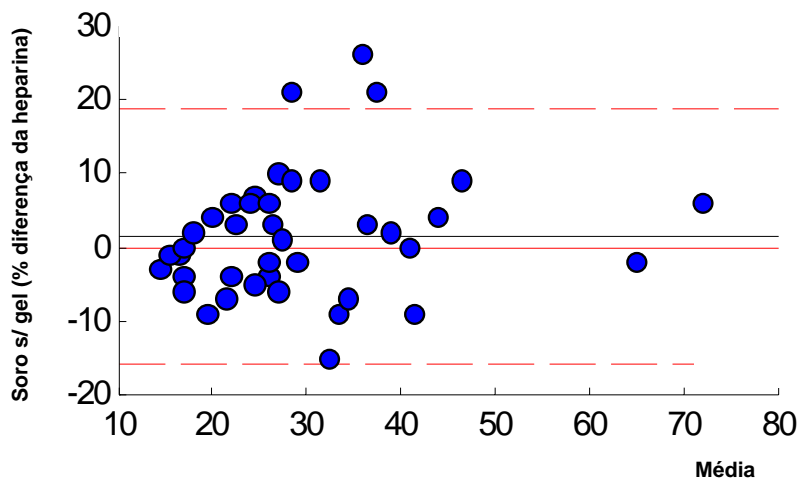
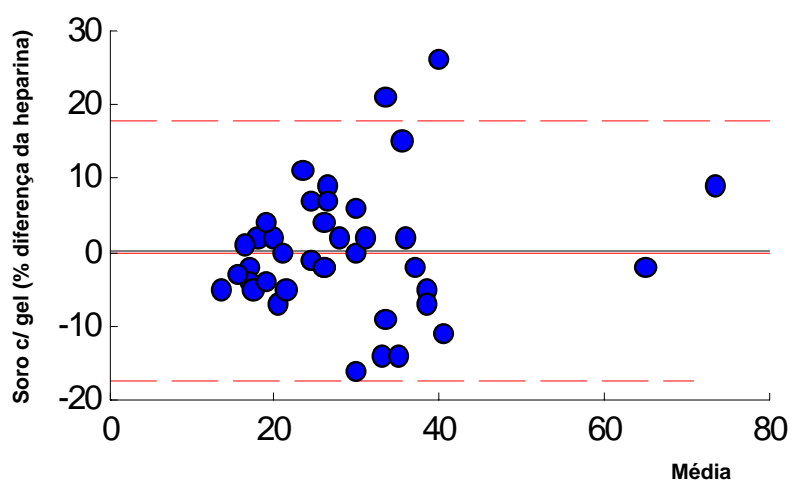
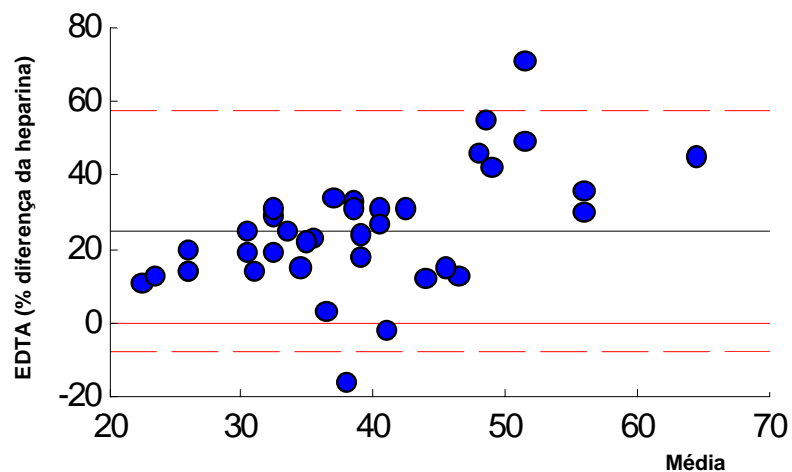


Figura 4: Gráficos das diferenças de Bland-Altman para as dosagens de MPO nos diferentes tipos de amostra: a linha sólida representa a diferença média entre a amostra referência (Heparina) e as demais (EDTA e Soro com e sem gel separador).

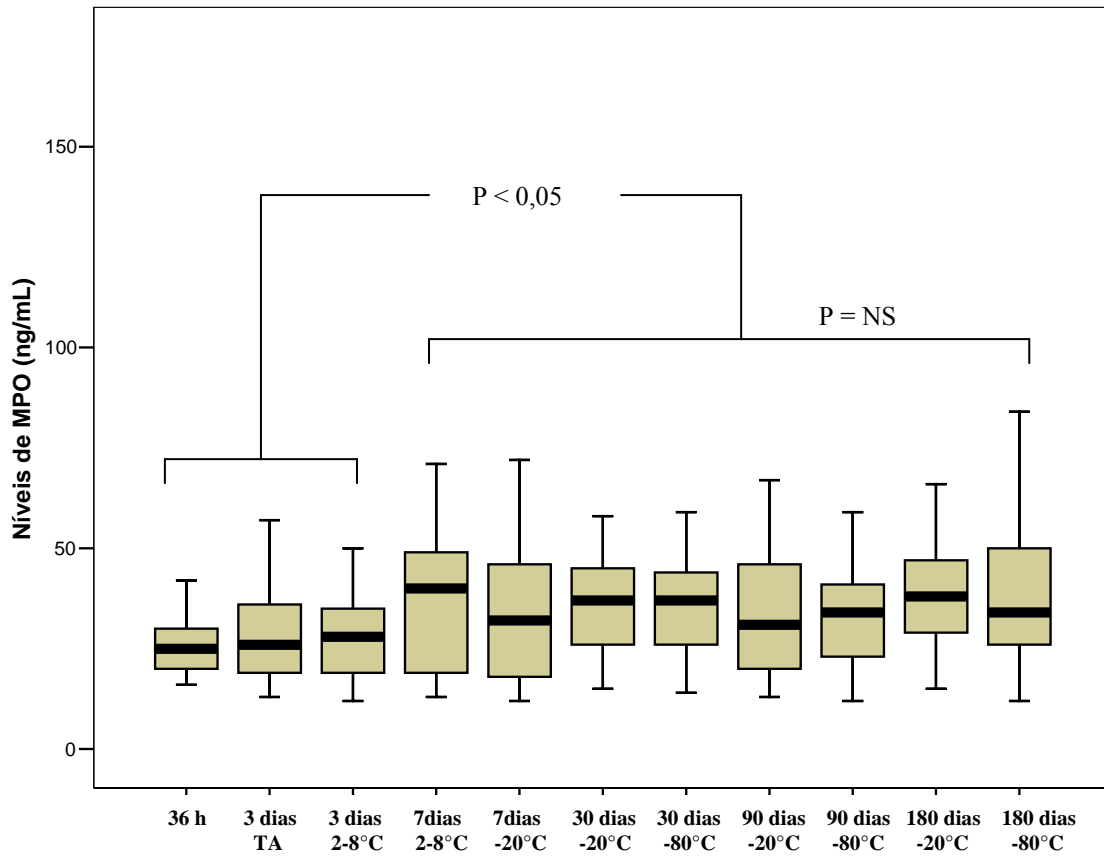


Figura 5. Comportamento dos níveis de MPO ao longo do período de armazenamento.

Os níveis de MPO aumentaram nas alíquotas armazenadas, sendo mais evidente a partir do período de 7 dias, permanecendo constante no restante do período.

ARTIGO EM INGLÊS

Effect of Preanalytical Variables on Myeloperoxidase Levels

Andrea Elisabet Wendland

Joíza Lins Camargo

Carisi Anne Polanczyk

Graduate Program in Cardiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Abbreviated title: Preanalytical variables and myeloperoxidase

Key-words: Myeloperoxidase, Inflammation, Cardiovascular Disease, Preanalytical Variables

Address for correspondence:

Andrea Elisabet Wendland
Av. Prof. Cristiano Fischer, 2062/526
91410-000, Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: + 55 51 3339-2796
E-mail: andrea.wendland@ig.com.br

Abstract

Background: Myeloperoxidase (MPO) participates in the promotion and propagation of atherosclerosis. Several studies have demonstrated the prognostic value of high MPO levels in cardiovascular events, but information about preanalytical variables is scarce. This study evaluated the effect of different sample types and storage conditions on MPO measurements.

Methods: Forty volunteers (17 men) aged 21 to 75 years were included in the study: 15 had cardiac disease and 25 were disease-free. Four blood samples from each participant were assayed for MPO using ELISA: heparinized plasma (MPO-Hep), plasma with EDTA (MPO-EDTA), serum with separator gel (MPO-Gel); and serum without separator gel (MPO-Serum). To evaluate MPO stability, 40 aliquots of heparinized plasma were separated and stored at room temperature (18-25°C), in a refrigerator (2-8°C) and in a freezer (-20°C and -80°C) for predetermined periods of time.

Results: MPO levels ranged from 16 to 69 ng/mL and were similar for men and women (31 vs. 27 ng/mL; $P=0.31$), but were higher in patients with heart disease compared to healthy volunteers (35 vs. 25 ng/mL; $P=0.03$). The analytical intraassay and interassay coefficients of variation were 8.1% and 10.1%. There were no statistical differences between MPO-Hep, MPO-Gel and MPO-Serum (29 ng/mL, 29 ng/mL; $P=0.87$ and 30 ng/mL; $P=0.25$), and MPO-Hep showed a good correlation with MPO-Gel and MPO-Serum ($r=0.775$ and $r=0.792$; $P<0.001$). No correlation between MPO-Hep and MPO-EDTA was found ($r=0.21$; $P=0.20$), and mean MPO value was 1.8 times higher in the EDTA samples (51 vs. 29 ng/mL; $P<0.001$). Storage method had no effect on the MPO levels.

Conclusions: Only collection of MPO in tubes with EDTA had a significant effect on the results. MPO results from assays of heparinized plasma were well correlated with serum with and without separator gel and remained stable over 6 months in storage.

Introduction

Inflammation plays an important role in all stages of atherosclerotic plaque development, from initial dysfunction to formation of atheroma, plaque rupture and the resulting thrombotic complications.¹⁻⁵ Different inflammatory biomarkers have been studied.^{6,7}

Rupture and erosion of plaques with formation of an intramural thrombus are the most important morphological changes in the transformation of stable coronary lesions into clinically unstable ones. Lymphocytes and monocytes seem to make an important contribution to the pathophysiology of cardiovascular disease, in particular through the generation of proinflammatory cytokines. However, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) may also be involved, and may modulate and signal inflammatory pathways by secreting enzymes, such as myeloperoxidase, that interact with target organs.^{8,9}

Myeloperoxidase (MPO), the most abundant component of azurophilic granules of leukocytes, is released after activation and degranulation of leukocytes, contributes to innate immune defenses, and has been shown to participate in the promotion and propagation of atherosclerosis.⁴ MPO generates free radicals and diffusible oxidants, and can, therefore, oxidize LDL cholesterol and promote uptake by macrophages and foam cell formation.¹⁰⁻¹² It may also cause oxidative changes in HDL and impair reverse transport of cholesterol.^{13,14} MPO activates metalloproteinases and promotes destabilization and rupture of the atherosclerotic plaque,¹⁵⁻¹⁷ it catalytically consumes nitric oxide (NO) derived from endothelium, reduces its bioavailability and affects its vasodilator and anti-inflammatory functions;¹⁸⁻²⁰ and may also contribute to adverse ventricular remodeling after infarction.^{20,21}

Several studies have demonstrated the prognostic association of high levels of MPO and adverse cardiovascular events in healthy individuals,²² patients with chronic heart disease^{23,24} or acute heart disease,²⁵⁻²⁸ patients being examined because of chest pain,^{29,30} and patients with heart failure.³¹⁻³³ However, its clinical use depends on further studies to define accurate and

reproducible analytical methods. Moreover, preanalytical factors, such as sample type, handling and storage, must be fully evaluated.³⁴

The preanalytical sources of MPO variability are still unknown, but the quality of assay results and correct clinical management depend on their accurate definition. This study evaluated the effect of different sample types and storage conditions on MPO measurements.

Material and methods

Samples

The Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) protocol was used for method validation.³⁵

Blood samples were collected from 40 volunteers (17 men) aged 21 to 75 years. Twenty-five participants were healthy and 15 had cardiac disease. Eight patients had stable coronary artery disease, 3, acute coronary syndrome, and 4, heart failure. All participants answered a questionnaire about clinical information and signed an informed consent form. This study was conducted at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil, and was approved by its Committee on Research Ethics.

Blood collection and sample storage

The study design is illustrated schematically in Figure 1. Four blood samples were obtained from each study participant (Vacuette[®] tubes Greiner Bio-one), and one specimen was prepared from each sample: heparinized plasma (MPO-Hep), EDTA plasma (MPO-EDTA), serum (MPO-Serum), and serum with separator gel (MPO-Gel).

Immediately after sample collection, tubes were stirred gently to homogenize the material and kept in an ice bath until they were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. After

centrifugation, serum (with and without gel) and plasma (heparinized and with EDTA) specimens were divided into aliquots to be used in the study procedures.

To compare MPO results for the different tube preparations, the following specimens were taken from the samples from each volunteer: aliquots of plasma were obtained from the tubes with heparin and EDTA, and aliquots of serum, from tubes with and without gel. All specimens were stored in a freezer at -20°C for 36 hours until measurement.

To evaluate the stability of MPO according to different storage periods and temperatures, aliquots of heparinized plasma, which is the sample of choice according to the manufacturer of the kit, were separated (n=40) and stored at room temperature (18-25°C) for 3 days; in a refrigerator (2-8°C) for 3 and 7 days; in a freezer at -20°C for 7, 30, 90 and 180 days and in a freezer at -80°C for 30, 90 and 180 days.

For the analytical imprecision studies, 20 aliquots of heparinized plasma were obtained from a single sample stored at -20°C and measured on the same day (Intraassay CV) and 20 aliquots of heparinized plasma from a single sample were stored at -80°C and measured on different days (Interassay CV) throughout the assaying period.

Sample measurement and methodology

MPO level was measured using the ELISA method with a BIOXYTECH® MPO-EIA™ kit (OXIS Health Products, Inc. USA). A standard MPO solution (50 ng/mL) was poured on each plate to plot a 6-point standard curve by serial dilutions.

All samples were diluted at a 1:10 ratio according to the manufacturer's instructions, so that all concentrations were within the method's range of linearity (1.56-25 ng/mL). Absorption was read at 405 nm using an ETI-Max 3000 DiaSorin analyzer.

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean \pm standard deviation, and categorical variables, as absolute numbers and percentages. The MPO levels had a normal distribution. Differences between means were evaluated using the Student *t* test for continuous variables and the chi-square test for categorical variables. Correlations between sample types were evaluated using the Pearson correlation coefficient, and mean differences were analyzed using the Bland-Altman method. Sample stability under different storage conditions was evaluated using repeated-measures ANOVA and intraclass correlation coefficients. Data were analyzed using the statistical program SPSS 14.0, and differences were classified as statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Sample characteristics are shown in Table 1. Mean age was 45 (21-75) years. MPO levels ranged from 16 to 69 ng/mL (mean: 29 ng/mL), with no difference between men and women (31 ± 12 ng/mL vs. 27 ± 12 ng/mL; $P=0.31$). MPO levels in the group of patients with cardiac disease were significantly higher than those in the group of healthy volunteers (35 ± 15 ng/mL vs. 25 ± 8 ng/mL; $P=0.03$). The analytical intraassay and interassay coefficients of variation (CVs) were 8.1 % and 10.1 %.

Effect of anticoagulants

The comparison of MPO levels in different sample types revealed no significant differences between heparinized plasma (29 ± 12 ng/mL) and serum collected in tubes with gel (29 ± 13 ng/mL; $P=0.87$) or serum collected in tubes without gel (30 ± 14 ng/mL; $P=0.25$). However, the results of samples collected in tubes containing EDTA for anticoagulation were significantly different from results found for the heparinized plasma samples, with mean results about 1.8 times greater (51 ± 15 ng/mL vs. 29 ± 12 ng/mL; $P < 0.001$) (Figure 2).

The correlations between the results found for MPO-Gel and MPO-Serum and those for MPO-Hep were good ($r=0.775$ and $r=0.792$; $P < 0.001$). There was no correlation between MPO-EDTA and MPO-Hep ($r=0.21$; $P=0.20$) (Figure 3).

The Bland-Altman plots³⁶ revealed that the mean differences of MPO-Hep from MPO-EDTA, MPO-Gel and MPO-Serum were 24.7 ng/mL (95%CI 19.5-30.0 ng/mL), 0.225 ng/mL (95%CI -2.54-2.99 ng/mL) and 1.55 ng/mL (95%CI -1.16-4.26 ng/mL) (Figure 4).

Effect of storage conditions

MPO levels for samples stored at different temperatures and for different periods of time are illustrated in Figure 5.

It was observed an increase of MPO levels in the samples stored regarding the levels found in the first assay, which was performed at 36 hours, being significant only from the period of 7 days' storage, both for samples stored in the refrigerator (2-8°C) and those stored at -20°C (29 ± 12 vs. 37 ± 17 ng/mL; $P < 0.001$ and 33 ± 16 ng/mL; $P=0.006$). This increase remained constant for all other aliquots stored at all remaining time points. There were no differences between MPO levels of samples stored for 30, 90 or 180 days at -20°C (38 ± 17 vs. 36 ± 18 ng/mL; $P=0.12$ vs. 42 ± 24 ng/mL; $P=0.21$) or at -80°C (37 ± 17 vs. 35 ± 19 ng/mL; $P=0.33$ vs. 42 ± 28 ng/mL; $P=0.16$). The analysis of sample stability over the entire storage time revealed a moderate correlation between results (intraclass correlation coefficient [ICC]: 0.598; 95% CI 0.480-0.724; $P < 0.001$). The comparison of samples stored at the same temperatures over time revealed better correlations: for those stored at -20°C, ICC was 0.678 (95% CI 0.540-0.798; $P < 0.001$), and for those stored at -80°C, ICC was 0.667 (95% CI 0.507-0.795; $P < 0.001$).

Discussion

This study compared MPO results obtained from the analysis of heparinized plasma, which is the sample of choice according to the kit's manufacturer, with results obtained from plasma with EDTA and from serum collected in tubes with or without separator gel. No differences were found between MPO results of heparinized plasma and serum in tubes with or without separator gel. However, a significant difference was found in the MPO results of samples collected in tubes with EDTA. Mean results of plasma with EDTA were about 107% greater than the results of heparinized plasma, and nine of the samples had results that were more than 150% greater.

Current knowledge suggests that MPO, a potential cause of progression and instability of atherosclerotic lesions during acute ischemic events, may be used as a marker of cardiovascular disease and provide information to improve patient diagnosis and prognosis.³⁷ However, little is known about the effect of preanalytical factors on MPO measurements. Studies have used different cut-off points because of differences in sample types and handling procedures. Therefore, the limits within which results can be used as the basis for decisions are uncertain, and further studies should evaluate analytical and preanalytical performances.³⁴

Several studies that evaluated other markers of cardiac disease, as well as the only two other studies about MPO published to date, found that preanalytical factors may affect measurements.³⁸⁻⁴⁸ Stiegler et al³⁸ compared troponin results in serum and heparinized plasma and found that the heparinized plasma samples produced results that were 20% lower in the 3 different tests. A similar study conducted by Gerhardt et al³⁹ found that troponin levels measured in heparinized plasma were 15% lower than the results of serum samples.

C-reactive protein (CRP) is an inflammatory marker frequently studied because of its potential diagnostic and prognostic value. Such studies investigate its stability, variability and analytical and preanalytical influences. However, there is still debate on what type of sample

should be used. The concentration of hs-CRP measured in EDTA plasma and citrated plasma was -12% and -16% different from the results found in serum assays.⁴⁰

A comparison of NT-proBNP measured in serum, EDTA and heparin revealed an excellent correlation, and blood for this assay can be collected in the same tube used for other biomarkers of cardiac disease.⁴¹ Shimizu et al⁴² evaluated the stability of NT-proBNP over 72 h and found that concentrations were lower in samples stored at 25°C than in those stored at 4°C; another study did not find any differences in the results of samples stored at -80°C for 1 year, and freeze-thaw cycles also did not have any effect on the samples.⁴³

Chang et al⁴⁴ compared MPO results from heparinized plasma and serum samples and found that serum results were considerably higher, although this could be attributed to the time the sample remained at room temperature for clot formation before centrifugation and separation of the material, and to the fact that the enzyme was released from the leukocytes. Our study did not detect this difference: all our samples were put in an ice bath immediately after collection, and enzyme release was avoided. All tubes used to collect serum contained a clot activator.

Samples collected in different tubes were found to have higher levels of MPO in serum and heparinized plasma than in plasma with EDTA or citrate.⁴⁵ In the heparinized plasma samples, MPO levels were about 10% higher than in EDTA plasma, and values for the serum samples were up to 100% higher. There was no significant difference between EDTA and citrate plasma in that study. Those findings differ from our results, in which values were considerably higher in EDTA samples.

The changes observed in EDTA samples may be explained by the fact that when blood is collected in EDTA, neutrophils undergo morphological changes that are dependant on contact time and concentration, and minor changes may appear even at an optimal anticoagulant concentration. These changes include swelling of the neutrophils with loss of lobe structure, followed by loss of granulation and the appearance of vacuoles in the cytoplasm and in the

nucleus of the cells. Three hours after blood collection, cells can disintegrate.⁴⁹ This loss of neutrophil granulation may be a contributing factor to the increase of MPO concentrations in plasma collected with EDTA. To avoid incorrect clinical evaluations or risk stratification, blood collection in tubes with EDTA should be further investigated, and reference values should be determined.

Similar discrepancies have been described for other markers. Roberts et al⁴⁶ compared hs-CRP measurements in serum, heparinized plasma and EDTA plasma and found that, in spite of excellent correlations, EDTA plasma samples had lower levels. In contrast, another study found no significant differences between samples of serum, heparinized plasma and EDTA plasma collected simultaneously.⁴⁷

Our study also evaluated the stability of MPO according to different storage times and temperatures, from 3 days at room temperature (25°C) or in a refrigerator (2-8°C), to 6 months in a freezer (-20°C and -80°C). There was an increase in MPO levels from the first measurement to all others, and this increase was more marked from 7 days onwards. However, this difference does not seem to be a function of storage time or temperature because no systematic elevation of levels was found over time in the samples stored for longer periods (30, 90 and 180 days) at -20°C or at -80°C. Furthermore, aliquots to determine the analytical CVs also failed to show an increase in MPO levels at longer storage times.

This difference, in agreement with the findings reported by Chang et al,⁴⁴ may be explained by the time that the plasma was in contact with cellular constituents while the samples remained at room temperature, which was approximately 2 hours, from centrifugation to separation of the aliquots. In the study conducted by Chang et al,⁴⁴ the time during which the whole blood samples remained at room temperature before undergoing centrifugation had a significant effect on MPO levels in plasma; moreover, that increase was proportional to time, and the concentration was almost double when samples remained at room temperature for 1 hour

before centrifugation. No increases in MPO concentrations were found in samples put in an ice bath after collection, not even when centrifugation was performed at room temperature. In contrast, leukocytes apparently continued to release MPO in the samples stored at room temperature up to the time that they underwent centrifugation.

Results reported by Shih et al⁴⁵ also support this hypothesis. Plasma samples had a less than 10% difference in MPO levels after supernatant separation, storage at room temperature for 2 days, storage at 2-8°C for 8 days and after 3 freeze-thaw cycles. However, the same study found a 4 times increase in the MPO levels of samples collected in tubes containing heparin and stored at room temperature for 2 h before centrifugation, whereas samples kept in an ice bath remained relatively stable.

In contrast with the studies conducted by Chang et al⁴⁴ and Shih et al,⁴⁵ who found that MPO levels increased in whole blood before sample centrifugation, we found that enzyme release seems to take place even after centrifugation. Therefore, even when samples are placed in an ice bath after collection, plasma must be separated immediately after centrifugation to avoid false increases in levels resulting from the continuous enzyme release into the plasma that is in contact with the cells.

Our study results and those reported by Shih et al⁴⁵ suggest that once plasma has been separated from the cellular constituents, MPO concentration is not apparently affected by storage temperature or time, which is useful information for investigators who intend to store samples for future measurements. What is of fundamental importance in MPO measurements and significantly affects results is the time during which the sample, as whole blood or as plasma after centrifugation, remains in contact with cellular constituents.

A common practice in clinical laboratories is to draw blood in serum-separator tubes because of the advantage of the barrier gel, which facilitates rapid separation of serum from cell constituents of blood and prevents hemolysis during prolonged storage. However, the measured

concentrations of certain analytes may be reduced if specimens are stored in this type of tube because of adsorption by the gel.⁴⁸ Our study did not show any significant differences between samples collected with heparin and serum with or without separator gel, in agreement with Dasgupta et al,⁴⁸ who found no differences in NT-proBNP samples. Furthermore, there was a good correlation between MPO results for these 3 types of sample, which suggests that blood for the analysis of several cardiac markers may be collected in the same tube, which may shorten collection time, reduce costs and increase patient comfort.

Some limitations to our study should be acknowledged. The fact that we did not know that the enzyme was likely to be released from the leukocytes into plasma after samples have been centrifuged, even when samples were put in an ice bath soon after collection, made our results difficult to interpret. Although they indicated the possibility that storage did not affect MPO levels, confirmation was only obtained from studies published subsequently. Studies in which samples remain in contact with cells before aliquot separation at room temperature and in an ice bath for predetermined times should be conducted to further explain the effect of this factor and define the rate at which MPO levels change. We evaluated the effect of storage on heparinized plasma samples only, and further studies should investigate such effect on other sample types.

Several other factors may affect the results of MPO assays. Studies have demonstrated that statins reduce MPO levels⁵⁰ and that administration of heparin mobilizes the MPO on vessel walls and increases plasma concentrations.⁵¹ A few studies have investigated the effect of physical exercise⁵² on MPO levels and its biological variability.⁵³ However, no studies have focused on the effect of anti-inflammatory drugs, hormone therapy, alcohol, smoking or obesity on this enzyme.

Conclusion

This study demonstrated that the collection of MPO in tubes containing EDTA alters in expressive way the results. Other aspects as time of storage and type of sample had no effect in the results. Further studies should be conducted to evaluate analytical and preanalytical variability. Measurement units should be standardized, population-based reference ranges should be determined, and standard, automated and commercially available tests should be developed to shorten test time, facilitate use, and reduce analytical imprecision, which are the basic benchmarks to move this marker from the research environment to routine clinical practice.

References

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
2. Ross R. Mechanisms of disease: atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
3. Hansson GK. Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
4. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102-11.
5. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111: 3481-88.
6. Lente FV. Markers of inflammation as predictors in cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta* 2000; 293: 31-52.
7. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. *Circulation* 2003; 107: 499-511.

8. Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, *et al.* Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106: 2894-2900.
9. 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: 611-616.
10. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med* 1999; 133: 321-325.
11. 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.
12. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda SE, *et al.* Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277: 46116-122.
13. Nicholls S, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 212-219.
14. Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, *et al.* Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004; 279: 42977-983.
15. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1143-46.
16. 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.

17. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001; 276: 41279-87.
18. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 5425-30.
19. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, *et al.* Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2004; 110: 1134-39.
20. 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 Radical Biology & Medicine* 2004; 37: 902-911.
21. 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.
22. Meuwese MC, Stroes WS, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub 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.
23. 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.
24. Stefanescu A, Braun S, Ndrepepa G, Koppa T, Pavaci H, Mehilli J, *et al.* Prognostic value of plasma myeloperoxidase concentration in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J* 2008; 155: 356-60.
25. 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: 1440-45.

26. Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C, Chopra V, Yanamadala S, Clark LT, *et al.* Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2007; 99: 1364-68.
27. Khan SQ, Kelly 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: 826-831.
28. 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.
29. 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.
30. Esporcate R, Rey HCV, Rangel FOD, Rocha RM, Mendonça HTF, Dohmann HFR, *et al.* Valor preditivo da mieloperoxidase na identificação de pacientes de alto risco admitidos por dor torácica aguda. *Arq Bras Cardiol* 2007; 89: 377-384.
31. Tang WHW, 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: 796-799.
32. 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.
33. Tang WHW, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, *et al.* Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2364-70.
34. Morrow DA. Appraisal of myeloperoxidase for evaluation of patients with suspected acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2001-02.

35. Protocolo CLSI EP9-A: Method comparison and bias estimation using patient samples. Approved Guideline, 1995. Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne. PA).
36. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 8: 307-310.
37. Roman RM, Wendland AE, Polanczyk CA. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. *Arq Bras Cardiol* 2007; 91: e12-e19.
38. Stiegler H, Fischer Y, Jimenez JFV, Graf J, Filzmaier K, Fausten B, *et al.* Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin Chem* 2000; 46: 1338-44.
39. Gerhardt W, Nordin G, Herbert AK, Burzell BL, Isaksson A, Gustavsson E, *et al.* Troponin T and I assays show decreased concentrations in heparin plasma compared with serum: lower recoveries in early than in late phases of myocardial injury. *Clin Chem* 2000; 46: 817-821.
40. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variation in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin Chem* 2003; 49: 1258-71.
41. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Measurement of Elecsys NT-proBNP in serum, K₂ EDTA and heparin plasma. *Clin Biochem* 2007; 40: 747-748.
42. Shimizu H, Aono K, Masuta K, Asada H, Misaki A, Teraoka H. Stability of brain natriuretic peptide (BNP) in human blood samples. *Clinica Chimica Acta* 1999; 285: 169-172.
43. Nowatzke WL, Cole TG. Stability of N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide after storage frozen for one year and after multiple freeze-thaw cycles. *Clin Chem* 2003; 49: 1560-62.
44. 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. *Clinica Chimica Acta* 2006; 373: 158-163.

45. Shih J, Datwyler SA, Hsu SC, Matias MS, Pacenti DP, Lueders C, *et al.* Effect of collection tube type and preanalytical handling on myeloperoxidase concentrations. *Clin Chem* 2008; 54: 1076-79.
46. Roberts WL, Schwarz EL, Ayanian S, Rifai N. Performance characteristics of a point of care C-reactive protein assay. *Clinica Chimica Acta* 2001; 314: 255-259.
47. Rothkrantz-Kos S, Schmitz PJ, Bekers O, Menheere PPCA, van Dieijen-Visser MP. High-Sensitivity C-reactive protein methods examined. *Clin Chem* 2002; 48: 359-362.
48. Dasgupta A, Chow L, Tso G, Nazareno L. Stability of NT-proBNP in serum specimens collected in Becton Dickinson Vacutainer (SST) tubes. *Clin Chem* 2003; 49: 958-960.
49. Narayanan S. The preanalytical phase – an important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathology* 2000; 113: 429-452.
50. 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. *Clinica Chimica Acta* 2006; 368: 168-172.
51. 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: 1871-78.
52. 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.
53. Dednam M, Vorster BC, Ubbink JB. Biological variation of myeloperoxidase. *Clin Chem* 2008; 54: 223-225.

Table 1: Sample characteristics:

		Controls	Individuals with heart disease
		(n = 25)	(n = 15)
Age [*] , years		35 (21-69)	60 (37-75)
Sex	Males	8 (32%)	9 (60%)
	Females	17 (68%)	6 (40%)
Medication			
	AAS	-	11 (73%)
	Statins	1 (4%)	10 (67%)
	Heparin	-	6 (40%)
	Ticlopidine	-	1 (8%)
Angina		-	4 (27%)
Dyslipidemia		3 (12%)	10 (67%)
Diabetes Mellitus		-	3 (20%)
Arterial hypertension		1 (4%)	12 (80%)
Renal insufficiency		-	4 (27%)
Inflammatory disease		2 (8%)	-
Prior coronary artery disease		-	10 (67%)
Neoplasm		-	1 (7%)
Myeloperoxidase ^{**} ng/mL		25 (16-46)	35 (18-69)

Age and Myeloperoxidase: mean (minimum and maximum); AAS: acetyl salicylic acid; * P< 0.001;

** P = 0.03

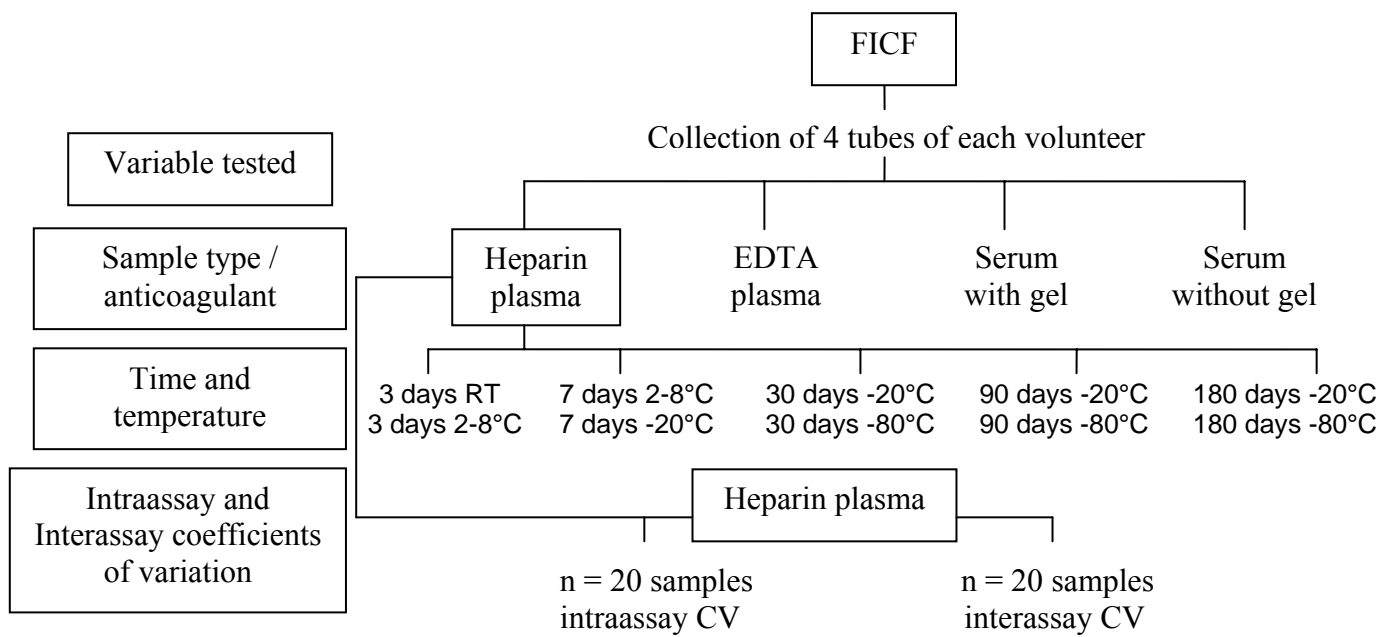


Figure 1. Study design:

FICF: Free and Informed Consent Form; RT: room temperature; CV: coefficient of variation;
 EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

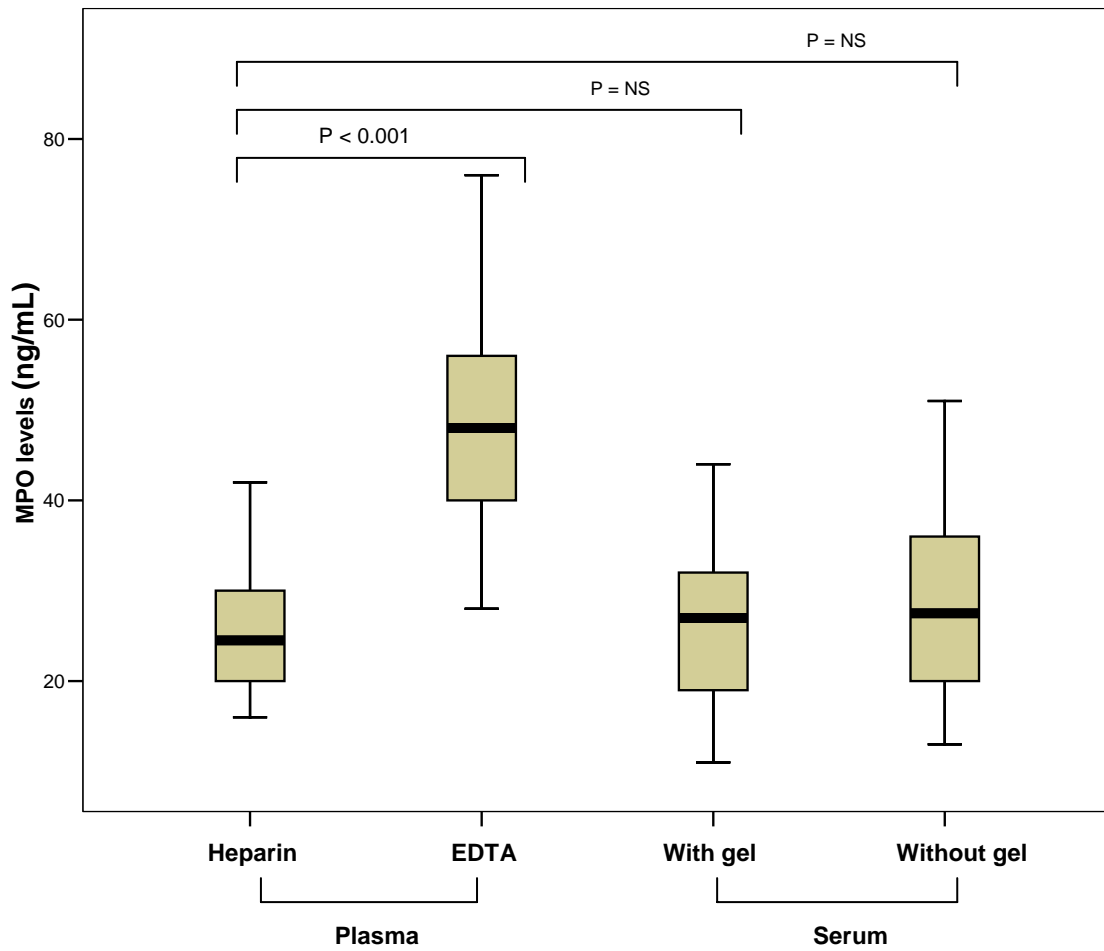


Figure 2. Effect of the different anticoagulants on MPO levels: comparison between plasma (with heparin and EDTA) and serum (with and without separator gel).

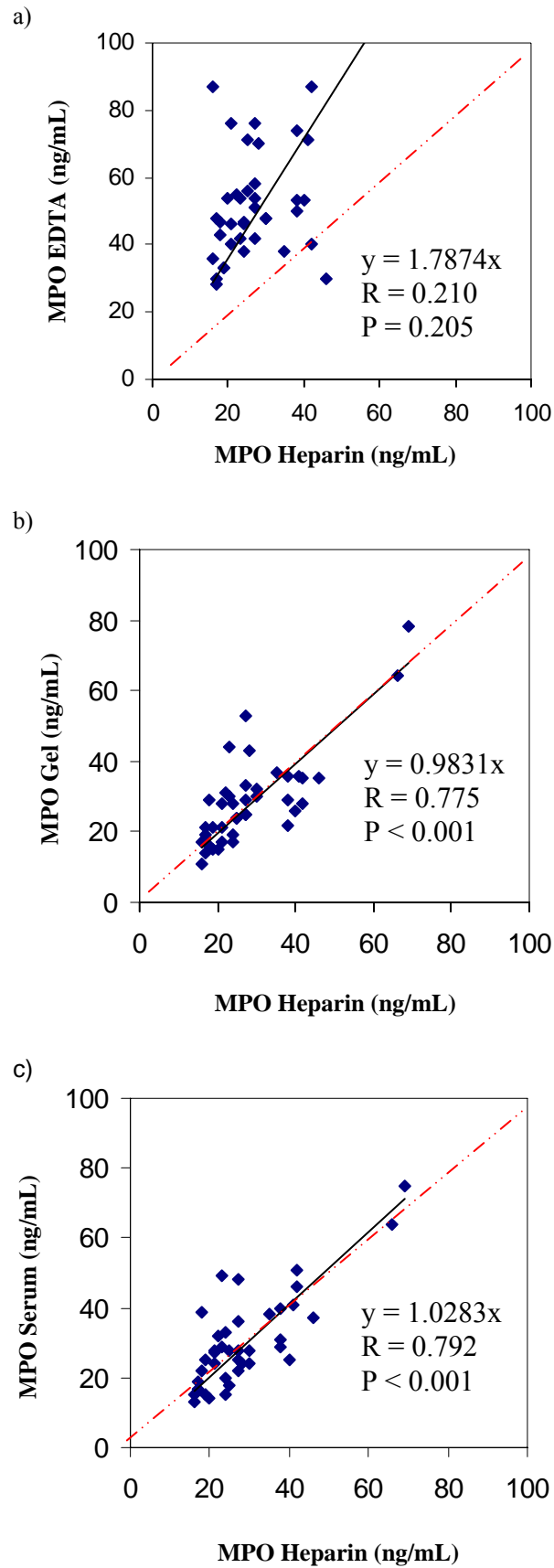


Figure 3: MPO levels in different sample types: correlation between MPO heparin and a) MPO EDTA, b) MPO gel and c) MPO serum. The dotted lines represent the line of equality at which $Y = X$.

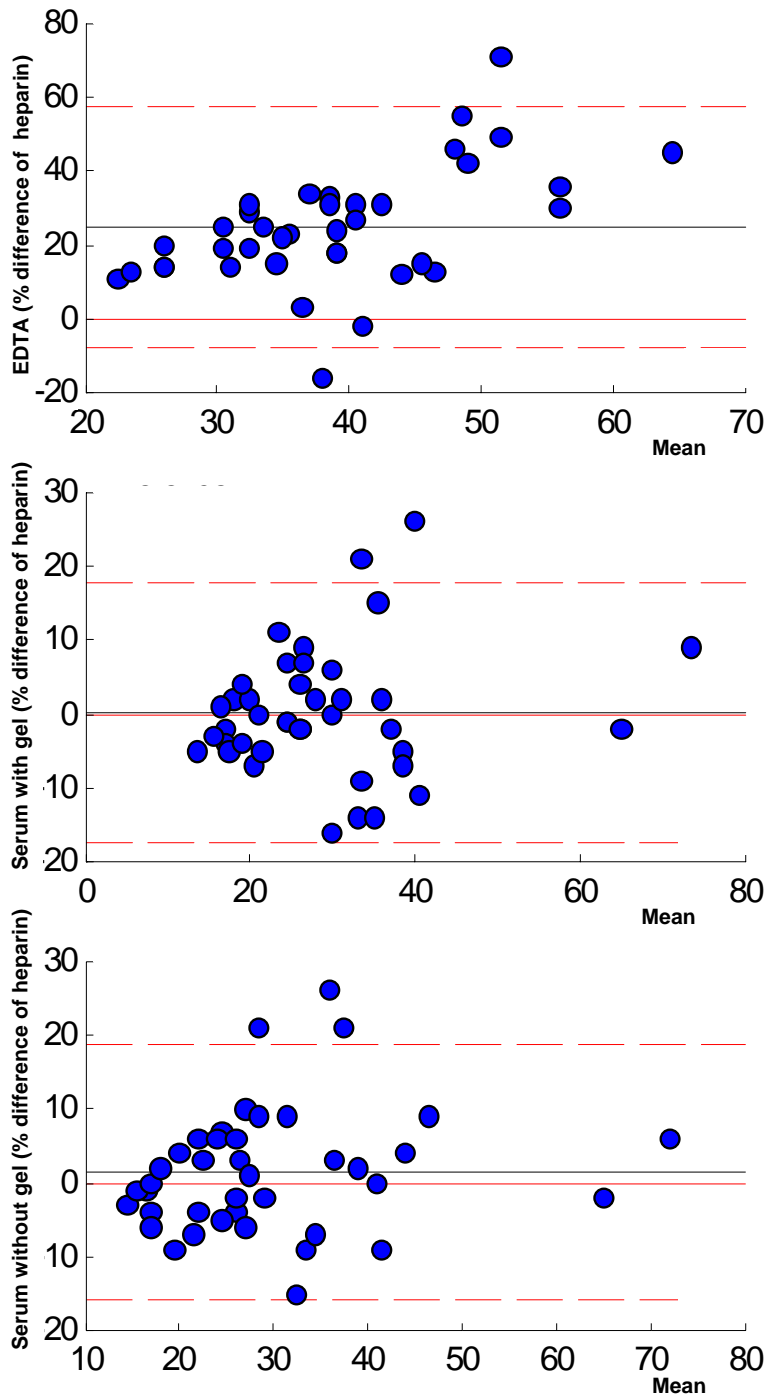


Figure 4: Bland-Altman difference plots for MPO levels in different sample types: the solid line represents the mean difference between the reference sample (Heparin) and the other samples (EDTA and serum with and without separator gel).

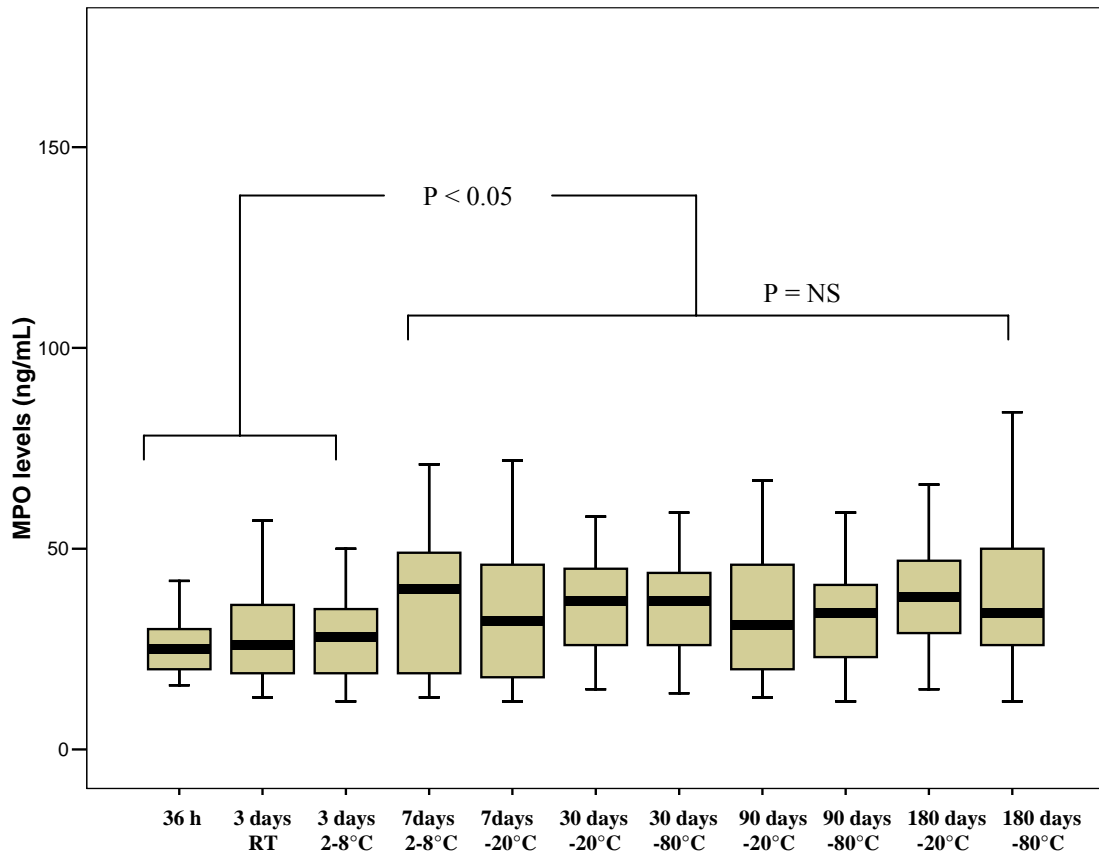


Figure 5: MPO levels assayed during storage. An increase in MPO levels was observed in stored aliquots along time, more markedly from 7 days onwards; increase then remained constant at later time points.

ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento Informado

Prezado Sr (a):

Estamos conduzindo um estudo para identificar os possíveis efeitos de variáveis pré-analíticas na dosagem de um marcador inflamatório utilizado para avaliação de pacientes com cardiopatia isquêmica (infarto ou angina). As variáveis pré-analíticas são alguns fatores que podem ocorrer antes da realização dos exames e que podem influenciar ou interferir nos resultados desses exames. Neste estudo iremos avaliar as interferências causadas pelos anticoagulantes usados nos tubos de coleta de sangue, além de verificar se a maneira de armazenar o material (temperatura ambiente, geladeira ou congelado em freezer) antes da dosagem, pode alterar os resultados.

Para podermos realizar este estudo, precisamos fazer uma coleta de sangue, na qual serão coletados quatro tubos. O Sr (a) só terá o desconforto de uma punção venosa. Os riscos de complicação dessa coleta são mínimos e relacionados principalmente a hematomas por extravasamento de sangue e inflamação no local.

Os resultados desse estudo não trarão benefícios diretos para o Sr (a), mas as informações obtidas podem servir para melhorar o atendimento futuro de outros pacientes.

O Sr (a) é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição, se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são a Dra Carisi A. Polanczyk e a Bioquímica Andrea E. Wendland, podendo ser encontrados nos telefones: 2101-8659 ou 2101-8316, tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Voluntário ou responsável: _____

Nome

Assinatura

ANEXO II

Questionário Clínico

1. Identificação (Prontuário): _____
2. Idade: _____
3. Sexo: Feminino Masculino
4. Grupo: Controle SCA Estável (Ambulatório) IC
5. Data de internação: _____
6. Diagnóstico clínico: Infarto
 Angina
 ICC
 Outros _____
7. Uso de medicamentos: Estatinas
 AAS
 Clopidogrel
 Ticlopidina
 Heparina
8. Outras informações: Infecção associada
 Doença inflamatória
 Dislipidemia
 Doença arterial prévia
 Diabete
 Hipertensão
 Neoplasia
 Insuficiência renal
9. Data da coleta: _____
10. Responsável pelas informações: _____