

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas:
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares
Dissertação de Mestrado

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DA MIELOPEROXIDASE E GRAVIDADE
DA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA**

Rodrigo Vugman Wainstein

Orientadora: Profa. Dra. Carisi Anne Polanczyk

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

*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*

09 de junho de 2008

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas: português	03
Lista de abreviaturas: inglês	04
Artigo de revisão:	05
Associação entre Polimorfismos da Mieloperoxidase e Doença Aterosclerótica	
Artigo Original:	24
Lack of Association of Myeloperoxidase Polymorphism and Plasma Myeloperoxidase with Severity of Stable Coronary Artery Disease	
Tabelas e Figuras:	45
Anexos:	52
Anexo 1: Questionário	
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	

LISTA DE ABREVIATURAS: PORTUGUÊS

DAC	Doença Arterial Coronariana
CRM	Cirurgia de Revascularização Miocárdica
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
ICP	Intervenção Coronariana Percutânea
MPO	Mieloperoxidase
SCA	Síndrome Coronariana Aguda
TRH	Terapia de Reposição Hormonal

LISTA DE ABREVIATURAS: INGLÊS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACS	Acute Coronary Syndrome
AMI	Acute Myocardial Infarction
ARB	Angiotensin Receptor Blocker
BMI	Body Mass Index
CAD	Coronary Artery Disease
CABG	Coronary Artery Bypass Graft
Cath Lab	Catheterization Laboratory
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HRT	Hormonal Replacement Therapy
MPO	Myeloperoxidase
NT-ProBNP	N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide
PCI	Percutaneous Coronary Intervention

ARTIGO DE REVISÃO:

Associação entre Polimorfismos da Mieloperoxidase e Doença Aterosclerótica

Introdução:

A doença aterosclerótica, em suas diferentes formas de apresentação, é uma das principais causas de morbi-mortalidade em todo mundo. A cardiopatia isquêmica destaca-se dentro deste amplo espectro da aterosclerose, principalmente devido a um aumento progressivo de sua incidência nos últimos anos e grande contribuição para mortalidade mundial ¹.

Deste modo, a busca pelo entendimento desta complexa doença tem contemplado amplamente todos os processos patológicos responsáveis pela formação da placa aterosclerótica. O intuito principal destes estudos é de disponibilizar medidas de prevenção e tratamento, procurando diminuir a sua elevada morbi-mortalidade. Neste contexto, estratégias de controle de fatores de risco e tratamento da doença arterial coronariana têm obtido considerável sucesso. Tal sucesso terapêutico se reflete na diminuição expressiva de desfechos significativos como mortalidade e eventos isquêmicos maiores através de intervenções específicas.

A patogênese da aterosclerose vem sendo estudada de forma extensiva ao longo dos anos. Inicialmente, acreditava-se que a doença aterosclerótica provinha tão somente de um depósito de partículas de gordura na parede dos vasos. Entretanto, estudos mais contemporâneos evidenciaram que existem outros fatores implicados na formação da placa de ateroma. A atividade inflamatória, por exemplo, tem ocupado papel de destaque na patogênese da aterosclerose ¹⁻⁴. Estudos recentes têm demonstrado que a inflamação está associada a todos os estágios desta doença, desde a formação da placa aterosclerótica até progressão para uma lesão obstrutiva

e, finalmente, complicações trombóticas agudas decorrentes da vulnerabilidade da placa. Estudos clínicos têm demonstrado que o emergente papel da inflamação na aterosclerose pode ter implicações clínicas significativas. Marcadores de atividade inflamatória, como a proteína C reativa, foram associados de forma definitiva com risco de eventos em pacientes com Síndrome Coronariana Aguda e Cardiopatia Isquêmica Crônica, adicionando informação prognóstica aos fatores de risco tradicionais ¹⁻⁴.

A presença e utilidade clínica de outros mediadores inflamatórios como a mieloperoxidase é um dos aspectos da atividade inflamatória na aterosclerose que, apesar de ser alvo de muitas pesquisas atuais, ainda carece de esclarecimentos científicos adicionais ². Dessa forma, esta revisão da literatura tem o intuito de analisar criticamente as evidências sobre o papel da mieloperoxidase e seus polimorfismos no diagnóstico e tratamento da doença aterosclerótica.

Papel da Mieloperoxidase na Formação da Placa Aterosclerótica:

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína tradicionalmente reconhecida com uma enzima microbicida expressa em altos níveis nos neutrófilos, monócitos e em algumas populações de macrófagos humanos. Entretanto, tem havido extenso acúmulo de evidências de que a MPO tenha potentes propriedades pró-aterogênicas além das mencionadas previamente. ²⁻²³ Tal proteína e os produtos mediados por suas reações (radicais livres) estão comprovadamente presentes em lesões

ateroscleróticas da circulação coronariana⁵. Existe uma série de mecanismos associados à atividade aterogênica da MPO, entre os quais se pode citar:

- 1) Contribui para oxidação do LDL, o que facilita a captura desta fração do colesterol pelos macrófagos e a formação de células espumosas (*foam cells*).⁶⁻⁸
- 2) Oxidação do HDL produz uma inativação funcional do mesmo, diminuindo suas propriedades anti-ateroscleróticas.⁹⁻¹²
- 3) Diminui biodisponibilidade de óxido nítrico, promovendo disfunção endotelial.¹³⁻¹⁸
- 4) Promove instabilidade da placa aterosclerótica através da ativação da metaloproteinase-7 o que contribui para ruptura da mesma; e descamação e morte das células endoteliais o que ocasiona erosão superficial e aumento da trombogenicidade coronariana.¹⁹⁻²³

Aplicação Clínica da Dosagem dos Níveis Séricos de Mieloperoxidase

Do ponto de vista clínico, existem alguns artigos científicos que demonstram claramente a possível utilidade assistencial da MPO. Zhang et al²⁴ demonstraram que níveis aumentados de MPO podem predizer a presença de doença arterial coronariana. Neste estudo os níveis de MPO foram divididos em quartis, e os indivíduos que tinham níveis de MPO mais elevados, no quarto quartil, tinham 15 a 20 vezes mais chance de ter coronariografias anormais (estenose >50% em uma ou mais coronárias principais) em comparação aos pacientes no primeiro quartil (menor

nível de MPO). Tal associação se manteve significativa mesmo após ajustes para outras variáveis como escore de Framingham e proteína C reativa.

Além de preditor da existência de aterosclerose coronariana, como citado acima, a MPO tem se mostrado também um potente preditor independente de eventos isquêmicos coronarianos em pacientes com dor torácica e síndrome coronariana aguda. Inicialmente Baldus et al²⁵ demonstraram no ensaio clínico CAPTURE composto de 1090 pacientes com Síndrome Coronariana Aguda que níveis aumentados de MPO se correlacionavam à ocorrência de eventos isquêmicos coronarianos (morte e infarto agudo do miocárdio) em 6 meses (razão de azares (HR) 2,25, [IC 95% 1,32-3,82] p=0,003). Brennan et al²⁶ publicaram, na mesma época, ensaio clínico semelhante em que ratificou os achados do estudo CAPTURE em 604 pacientes com dor torácica. Ambos os estudos utilizaram modelos de regressão logística multivariada em que foram realizados ajustes para variáveis como marcadores de necrose miocárdica, mediadores inflamatórios e fatores de risco para cardiopatia isquêmica. A análise destes resultados demonstrou que o nível de MPO é um preditor independente de eventos coronarianos em 30 dias e 6 meses nestas populações. Uma particularidade muito relevante destes estudos é que a MPO identificou um subgrupo de alto risco para eventos coronarianos dentro dos pacientes com troponina T negativa (HR 7,48 [IC 95% 1,98 a 28,3], p=0,001). Ambos os estudos concluíram que a MPO além de ser útil para avaliação prognóstica em pacientes com síndrome coronariana aguda como um todo, também permite a identificação de pacientes de maior risco entre aqueles que se apresentam com marcadores de necrose miocárdica negativos.

Com base nestes achados, Cavusoglu et al ²⁷ desenharam um estudo com intuito de verificar se o valor prognóstico da MPO pode se estender até 2 anos. Neste estudo foram incluídos 193 homens com diagnóstico de SCA e encontrou-se que após ajuste para diferentes variáveis clínicas, laboratoriais e angiográficas os níveis séricos de MPO permaneceram como preditor independente de eventos em 2 anos. Foi utilizado a mediana dos níveis de MPO sérica de toda coorte (20,34ng/mL) para estratificar os pacientes em dois grupos. O grupo com níveis séricos maiores que a mediana apresentaram sobrevida de 74% em 2 anos, ao passo que o grupo com níveis séricos menores que a mediana apresentaram sobrevida de 88% em 2 anos ($p=0,025$).

Achados semelhantes aos dos estudos acima foram encontrados quando os níveis de MPO sérica foram avaliados em pacientes exclusivamente com diagnóstico de SCA com supradesnivelamento do segmento ST (IAM). Em um estudo publicado em 2007, Mocatta et al ²⁸ dosaram níveis séricos de MPO em 512 pacientes com IAM e em 156 pacientes controles (sem doença cardíaca conhecida). Os níveis séricos de MPO eram significativamente mais elevados nos pacientes 24 a 96 horas pós-IAM. Neste estudo identificou-se que níveis de MPO sérica acima da mediana é um preditor independente de mortalidade em 5 anos (razão de chances (RC) 1,8 [IC 95% 1 a 3], $p=0,034$) em pacientes com IAM. Os autores concluíram que a MPO sérica pode adicionar valor prognóstico a outros fatores de risco mais tradicionais como fração de ejeção do ventrículo esquerdo e NT-proBNP em pacientes pós-IAM.

Outro estudo recente publicado por Vasilyev et al ²⁹ identificou que oxidantes (aldeídos citotóxicos) resultantes das reações mediadas pela MPO, podem ter efeito modulador no remodelamento miocárdico pós-IAM. Em tal estudo foram usadas

células vasculares de modelos murinos com IAM induzido por oclusão crônica da artéria descendente anterior. Foram comparadas células de ratos desprovidas de MPO com células de ratos selvagens. Os ratos desprovidos de MPO apresentaram 35% menos dilatação do ventrículo esquerdo ($p < 0,001$) e uma melhora de 52% na função do ventrículo esquerdo após modelo de isquemia e reperfusão miocárdica ($p < 0,0001$) em relação aos ratos selvagens. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tamanho do infarto entre os dois grupos. Este estudo sugere que os oxidantes gerados pela MPO não afetam significativamente necrose tissular após IAM, porém tem um efeito negativo no remodelamento e função ventricular.

Finalmente, a MPO sérica foi também associada a risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) em pacientes previamente saudáveis. Em 2007, Meuwese et al³⁰ publicaram um estudo de caso-controle em que foram coletadas amostras de MPO sérica basais em 3375 pacientes. Foram incluídos 1.138 homens e mulheres previamente hígidos que desenvolveram DAC em 8 anos e 2.237 pacientes que não desenvolveram doença cardiovascular. Os níveis séricos de MPO foram significativamente maiores nos pacientes que desenvolveram DAC e se correlacionaram significativamente com proteína C reativa e contagem total de leucócitos. Dosagem de MPO sérica foi estratificada por quartis, sendo que o quarto quartil manteve significância estatística para risco de DAC mesmo após ajuste para outros fatores de risco tradicionais (RC 1,36 [IC 95% 1,07 – 1,73]). Níveis elevados de MPO aumentaram risco de DAC mesmo em pacientes com LDL <130mg/dl, HDL >50mg/dl e proteína C reativa < 2mg/l. Concluindo-se que MPO sérica pode predizer risco de DAC mesmo em pacientes saudáveis.

Polimorfismos Genéticos da Mieloperoxidase

Interesse crescente tem surgido sobre a genética funcional (influência do genótipo para o risco de desenvolver doenças e também como determinante de sua apresentação e evolução) e sobre a farmacogenética (influência do genótipo como determinante das respostas individuais ao tratamento farmacológico). Para tentar compreender esta ligação entre o genótipo e as manifestações clínicas da DAC, em especial, diversos estudos têm buscado avaliar a influência de características genóticas no risco de desenvolver esta doença, em sua apresentação clínica e na resposta aos diferentes tratamentos disponíveis. Como foco principal está o estudo de polimorfismos, ou seja, variações genéticas (mutações) não-letais que aparecem em pelo menos 1% da população. Diferenças alélicas no DNA do gene resultam em variações polimórficas de seus produtos, nos quais se incluem proteínas envolvidas nas mais diversas funções do organismo. Existem centenas de polimorfismos em cada gene e estes polimorfismos podem ou não ter algum significado funcional.³¹

Ao longo dos últimos anos o estudo da MPO na cardiopatia isquêmica conseguiu reunir evidências científicas que permitem indicá-la como um marcador significativo de presença e risco de cardiopatia isquêmica. Dessa forma, o próximo passo foi o estudo de alterações genéticas que pudessem modificar a expressão da MPO. Piedrafita et al³² demonstraram que existe um polimorfismo funcional localizado em uma região promotora (posição -463) do gene que expressa a MPO. O

polimorfismo consiste na troca de um alelo G por um alelo A, produzindo três diferentes genótipos AA, GA e GG. A presença do alelo A ao invés do G diminuiria a expressão da MPO pelas células. O genótipo GG predomina na população norte-americana (60-66%) e pode estar associado a um aumento de 2-3 vezes os níveis de MPO em relação aos genótipos AG/AA. Nikpoor et al ³³ realizaram um estudo onde foi determinado qual o polimorfismo presente em um grupo com doença arterial coronariana (229 pacientes) e em controles (217 pacientes). Neste estudo a presença do alelo A foi menos freqüente em pacientes com coronariopatia (RC 0,138, IC 95% 0,04-0,47). Análise de regressão logística mostrou que a associação entre o polimorfismo da MPO e a presença de cardiopatia isquêmica é independente de outros fatores de risco. Da mesma forma, Pecoits-Filho et al ³⁴ demonstrou em uma coorte de 155 pacientes com insuficiência renal crônica pré-dialítica que a prevalência de doença cardiovascular é maior em pacientes que possuem o alelo G ou são homocigóticas GG (0% AA, 18% AG, 35% GG).

Como citado anteriormente, a MPO está associada à presença de disfunção endotelial. A partir disso, Makela et al ³⁵ realizaram um estudo com 49 pacientes jovens e hígidos para testar a relação entre os polimorfismos da MPO e alterações na reatividade coronariana. O grau de disfunção endotelial foi medido através da reserva de fluxo coronariano durante um teste de hiperemia reativa a adenosina. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com seu genótipo para MPO (AA, AG e GG). O autor identificou diferenças significativas quanto à reserva de fluxo coronariano entre os três genótipos da MPO, mesmo após ajustado para fatores de risco para aterosclerose. Os homens com genótipo GG obtiveram uma reserva de fluxo 18% menor que os com os demais genótipos com baixa expressão de MPO

($p=0,019$), evidenciando que o tipo de polimorfismo da MPO pode estar correlacionado com reatividade coronariana.

Mais recentemente, Asselberg et al³⁶ demonstraram que o polimorfismo -463 G/A é preditor independente de eventos coronarianos (morte cardiovascular, infarto agudo do miocárdio e hospitalização por angina instável). Neste estudo 139 pacientes entre 18 e 80 anos com cardiopatia isquêmica confirmada angiograficamente foram acompanhados por cerca de 5 anos. Até o final do seguimento 19 eventos coronarianos tinham ocorrido (2 mortes cardiovasculares, 5 IAM e 12 hospitalizações por angina instável). Pacientes com genótipo GG tiveram significativamente mais eventos que os pacientes com genótipo AA/AG (19% vs. 4%, $p=0,01$).

Entretanto, outros estudos que tentaram relacionar grau de extensão da aterosclerose em vasos extracardíacos com o polimorfismo da MPO obtiveram resultados conflitantes aos observados quando foi estudada especificamente a circulação coronariana. Makela et al³⁷ publicaram um estudo no ano de 2003 utilizando uma coorte 300 homens entre 33 e 69 anos submetidos a autópsia devido a morte súbita. Neste estudo foi observada a extensão da aterosclerose da artéria aorta através de planimetria computadorizada e correlacionada com genótipos de alta expressão de MPO (GG) e baixa expressão de MPO (AA/AG). Paradoxalmente, os resultados deste estudo mostraram que em pacientes com menos de 53 anos os genótipos de baixa expressão de MPO apresentaram cerca de 40% maior carga aterosclerótica na aorta que os pacientes com genótipo de alta expressão de MPO. Dando continuidade a esta linha de pesquisa, Makela et al³⁸ seguiram relacionando carga aterosclerótica com polimorfismos da MPO em estudo publicado em 2008. Neste estudo mais recente, a avaliação da gravidade da aterosclerose foi aferida

através da medição do espessamento da camada íntima-média das carótidas por ecografia com Doppler. Foram selecionados 198 pacientes (161 não-diabéticos e 37 diabéticos tipo 2). Novamente, ao contrário do esperado, o espessamento da camada íntima-média das carótidas de pacientes sem diabetes foi 7,3% maior nos portadores de genótipos de baixa expressão de MPO, sendo que os resultados se mantiveram estatisticamente significativos ($p=0,015$) mesmo após ajuste para fatores e confusão como tabagismo e colesterol total. No entanto, não houve associação entre genótipo e carga aterosclerótica nos paciente portadores de diabete tipo 2, embora constituíssem um grupo muito pequeno neste estudo. Não há nestes estudos uma hipótese que indique a razão pela qual os genótipos de baixa expressão de MPO estão mais relacionados à aterosclerose extracoronariana do que os genótipos de alta expressão de MPO. Uma das possíveis razões citada nos artigos de Makela et al é que os pacientes portadores do alelo A possuem mais fatores de risco para aterosclerose do que os homozogóticos GG, especialmente dislipidemia ³⁹. Entretanto, tal explicação continua criando um paradoxo visto que o genótipo GG (alta expressão de MPO) tem sido associado à presença de doença arterial coronariana e eventos isquêmicos subseqüentes.

Associação entre Intervenções Farmacológicas e Expressão do Gene da Mieloperoxidase

Como exposto acima, estudos iniciais obtiveram sucesso em associar presença de doença arterial coronariana e risco de eventos com o polimorfismo genético da MPO na posição -463G/A. A partir disso, alguns pesquisadores passaram

a focar em possíveis intervenções farmacológicas que pudessem alterar a expressão de mieloperoxidase e a evolução do processo de aterogênese.

Em 2003, Makela et al ⁴⁰ publicaram um estudo com 87 mulheres pós-menopáusicas e não-tabagistas acompanhadas por 5 anos em que o uso de terapia de reposição hormonal (TRH) foi correlacionada com genótipo da MPO e gravidade da aterosclerose na aorta abdominal e artérias carótidas medida através de ultrassonografia. As pacientes foram distribuídas em 3 grupos: 25 pacientes usaram estradiol e progesterona, 32 pacientes usaram somente estradiol e 30 pacientes não usaram terapia de reposição hormonal (grupo controle). Neste estudo, a progressão da gravidade da aterosclerose foi mais rápida nas pacientes do genótipo GG não-submetidas a TRH do que nas pacientes com o mesmo genótipo submetidas a ambos os tipos de TRH ($p=0,042$). Os demais pacientes portadores do alelo A, no entanto, não apresentaram diferença significativa na progressão da aterosclerose entre os grupos que receberam TRH e grupo controle. O racional biológico deste estudo provém de experimentos anteriores e dá conta de que o estradiol é capaz de aumentar a atividade da MPO, porém de uma maneira que diminui a produção total de radicais livres amplamente associados com a formação da placa aterosclerótica. A partir destes resultados, os autores concluíram que a TRH pode retardar o processo de aterogênese, sendo especialmente benéfica nas pacientes portadoras do genótipo GG.

Fármacos hipolipemiantes, como as estatinas, são fundamentais no tratamento e prevenção da aterosclerose. O mecanismo de ação das estatinas concentra-se na inibição da HMG-CoA reductase que é uma enzima primordial na formação do colesterol. Entretanto, especula-se que as estatinas possam ter

benefícios pleiotrópicos independentes dos níveis de colesterol através de efeitos antioxidantes e antiinflamatórios. Neste sentido, as estatinas também foram estudadas no que se refere à expressão de mieloperoxidase. Kumar et al ⁴¹ publicaram um estudo em 2005 em que identificaram que as estatinas foram capazes de suprimir a expressão de MPO mRNA de 20 a 200 vezes. Este resultado foi identificado *in vitro* em monócitos humanos e *in vivo* em macrófagos de ratos. O efeito supressivo foi observado em estatinas naturais e sintéticas como sinvastatina, atorvastatina, pravastatina e lovastatina. Tal efeito ocorreu independente do genótipo associado ao polimorfismo da MPO. A redução dos níveis de MPO mRNA nos ratos alimentados com estatina se correlacionou com diminuição dos níveis da atividade da enzima MPO. Os autores deste estudo sugerem que ao menos parte dos possíveis efeitos pleiotrópicos das estatinas possam se dever a diminuição da expressão de MPO.

Conclusão

Através desta revisão da literatura conclui-se que a mieloperoxidase é uma importante participante na formação da placa aterosclerótica. Nesse sentido, pesquisas atuais remetem para a possibilidade da utilização clínica desta enzima e seu polimorfismo genético na região promotora -463G/A, principalmente no que se refere ao diagnóstico e prevenção da cardiopatia isquêmica em todo seu espectro de apresentação. Além disso, o conhecimento mais aprofundado e detalhado da mieloperoxidase e sua expressão genética podem auxiliar no entendimento dos efeitos terapêuticos de algumas intervenções farmacológicas utilizadas atualmente. No entanto, a associação entre gravidade da doença aterosclerótica e polimorfismos

da mieloperoxidase ainda é controversa, necessitando de estudos adicionais para esclarecer esta hipótese.

Bibliografia:

1. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary heart disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
2. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102-1111.
3. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-1143.
4. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:37-42.
5. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1994;94:437–444
6. 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;103:1547–1560.
7. Zhang R, Shen Z, Nauseef WM, Hazen SL. Defects in leukocyte mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood* 2002;99:1802–1810.
8. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1717–1725.

9. Marsche G, Hammer A, Oskolkova O, Kozarsky KF, Sattler W, Malle E. Hypochlorite-modified high density lipoprotein, a high affinity ligand to scavenger receptor class B, type I, impairs high density lipoprotein dependent selective lipid uptake and reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* 2002;277:32172–32179.
10. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004;114:529–541.
11. Zheng L, Settle M, Brubaker G, Schmitt D, Hazen SL, Smith JD, Kinter M. Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem* 2005;280:38–47.
12. Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, Singh P, Anantharamaiah GM, Chait A, Brunzell J, Geary RL, Oram JF, Heinecke JW. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13032–13037.
13. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153–2157.
14. Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J. Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2000;15:409–415.

15. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lulis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002;296: 2391–2394.
16. Zhang C, Patel R, Eiserich JP, Zhou F, Kelpke S, Ma W, Parks DA, Darley-Usmar V, White CR. Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1469–H1475.
17. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, Penn MS, Keaney JF, Jr., Hazen SL. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2004;110:1134 –1139.
18. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, Lau D, Mollnau H, Ortak M, Petri S, Goldmann B, Duchstein HJ, Berger J, Helmchen U, Freeman BA, Meinertz T, Munzel T. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004;37:902–911.
19. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrix metalloproteinase-7 (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001;276: 41279–41287.
20. Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4322– 4326.
21. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative

- mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* 2003;278:28403-28409.
22. 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;24:1309–1314.
 23. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1143–1146.
 24. Zhang R, Brennan ML, Fu X, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; 286:2136–2142.
 25. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, Simoons ML, Hamm CW. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108: 1440–1445.
 26. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*. 2003;349:1595–1604.
 27. Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C. 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;1364-1368.

28. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1993-2000.
29. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112:2812-2820.
30. Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary disease in apparently healthy individuals. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:159-165.
31. Biolo A, Rhode LE. O Impacto dos polimorfismos genéticos e da farmacogenética na avaliação e manejo da insuficiência cardíaca. *Revista da Sociedade de Cardiologia do RS* 2004; 3: 1-3.
32. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, et al. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroidhormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996;27:14412–14420.
33. Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Theroux P, Rouleau GA. A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *Am Heart J* 2001;142:336 –339.
34. Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Marchlewska A, Heimbürger O, Barany P, Hoff CM, Holmes CJ, Suliman M, Lindholm B, Schalling M, Nordfors L. A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney Int* 2003;suppl: 172–S176.

35. Makela R, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, Jaakkola O, Knuuti J, Lehtimäki T. Myeloperoxidase gene variation and coronary flow reserve in young healthy men. *J Biomed Sci* 2004; 11:59-64.
36. Asselbergs FW, Reynolds WF, Cohen-Tervaert JW, Jessurun GA, Tio RA. Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary artery disease. *Am J Med* 2004;116:429–430.
37. Makela R, Karhunem PJ, Kunnas, TA, et al. Myeloperoxidase gene variation as a determinant of atherosclerosis progression in the abdominal and thoracic aorta: an autopsy study. *Lab Invest* 2003;83:919-25.
38. Makela R, Loimaala A, Nenonen A, et al. The association of myeloperoxidase promoter polymorphism with carotid atherosclerosis is abolished in patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2008; 41: 532-537.
39. Hoy A, Tregouet D, Leininger-Muller B, Poirier O, Maurice M, Sass C, Siest G, Tiret L, Visvikis S. Serum myeloperoxidase concentration in a healthy population: Biological variations, familial resemblance and new genetic polymorphisms. *Eur J Hum Genet* 2001;9:780–786.
40. Makela R, Dastidar P, Jokela H, Saarela M, Punnonen R, Lehtimäki T. Effect of long-term hormone replacement therapy on atherosclerosis progression in postmenopausal women relates to myeloperoxidase promoter polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 3823–8.
41. Kumar A, Reynolds W. Statins downregulate myeloperoxidase gene expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 442-451.

Original Article

**Lack of Association between Myeloperoxidase Polymorphisms
and Severity of Stable Coronary Artery Disease**

Abstract

Background: Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme involved in the process of atherosclerosis. The expression of MPO has been related to a functional promoter polymorphism located at the -463 position, consisting of a G to A base substitution. In recent studies, this polymorphism has been linked to the presence of atherosclerosis and risk of cardiovascular events.

Objectives: To test the hypothesis that MPO polymorphism and MPO plasma levels are associated with coronary artery disease (CAD) severity.

Methods: 135 consecutive patients submitted to elective coronary angiography were enrolled in this study. The CAD severity was assessed using a pre-defined angiographic score and blood samples were collected in order to assess the MPO genetic polymorphism and its plasma levels.

Results: The MPO genotype was determined in 118 patients (mean [\pm SD] age, 60.5 \pm 11.5 years; 60% male). Among these patients, 12 (10%) were homozygous for the AA genotype, 69 (58%) for the GG genotype, and 37 (32%) were heterozygous. MPO plasma levels were not related with this polymorphism, and were 8.7 \pm 4.7 ng/mL for AA, 8.6 \pm 7.0 ng/mL for AG and 9.4 \pm 5.6 ng/dL for GG genotypes ($p=0.75$). The CAD severity was not associated with MPO genotypes separately ($p=0.53$) or when analyzed as high and low expression genotypes ($p=0.43$), even after adjusting for risk factors in a logistic regression model. There was a trend towards greater proportion of patients with higher CAD score and MPO above mean levels.

Conclusion: Our data indicate that, in stable patients submitted to coronary angiography, there is no association between MPO polymorphism and MPO plasma levels with CAD severity.

Introduction

Atherosclerosis at its different clinical presentations is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Coronary artery disease (CAD) plays an important role in the spectrum of atherosclerosis, mainly due to its increase in incidence and great contribution to mortality. Risk factors involved in the atherogenesis process have raised great interest in the last years. Among those factors, the role of inflammation and inflammatory markers on the formation of the atherosclerotic plaque can be highlighted.¹⁻⁴

Myeloperoxidase (MPO) is a leucocyte-derived enzyme with an essential role in the immune system and inflammatory regulation ². Such protein and the products derived from its reactions (free radicals) are demonstrably present in human coronary atherosclerotic plaques ⁵. Several mechanisms can explain the pro-atherogenic effects of MPO, such as: LDL oxidation and formation of foam cells, functional inactivation of HDL, endothelial dysfunction due to decrease of nitric oxide bioavailability, activation of metalloproteinase 7 and increase in vascular cell apoptosis which contributes to endothelial erosion and plaque vulnerability ⁶⁻²³.

Recent studies were able to identify MPO plasma levels as an independent predictor of the CAD presence and subsequent ischemic events in patients with Acute Coronary Syndromes (ACS) ²⁴⁻²⁹. Likewise, the protective effect of MPO deficiency against cardiovascular diseases has also been described.³⁰

Throughout the last years, MPO related research has pointed to strong evidence that allows the characterization of this enzyme as a potential predictor of presence and risk of ischemic heart disease. Thus, the next step was the study of genetic changes that could modify the expression of MPO. A few polymorphisms are described for the MPO gene, including a functional polymorphism located at the promoter region of this gene that affects its transcription³³. The presence of an A rather than G at position 463 bp seems to decrease the expression of MPO enzyme, giving rise to three different genotypes: AA, AG e GG. The GG genotype predominates in the North-American population (60-66%), but whether it is associated with more elevated MPO serum levels than the AG and AA genotypes is still debatable³⁴⁻³⁸. Other studies have shown that the high expression genotype (GG) is a statistically significant predictor of CAD, ischemic events and endothelial dysfunction when compared to low expression genotypes (AA/AG)³⁴⁻³⁷. Nevertheless, conflicting data exist on the relation of MPO levels and its polymorphism with atherosclerosis at different vascular beds³⁹⁻⁴⁰.

Therefore, it is reasonable to speculate that presence and risk of CAD can be predicted properly using MPO serum levels and its genetic polymorphism. In the present study, we sought to assess if there is an association between CAD severity and MPO polymorphism. In addition, as secondary objective we also investigated the association between severity of CAD and MPO plasma levels.

Methods

Study Population:

In this cross-sectional study performed at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Cardiac Catheterization Laboratory, 135 consecutive patients who had a clinical indication of elective coronary angiography were enrolled between August 2007 and April 2008. Exclusion criteria were: age less than 18 years old; current or recent hospitalization (< 30 days) for ACS, previous history of percutaneous coronary intervention (PCI) or coronary artery by-pass surgery (CABG), history or current treatment of cancer and leukemia and acute or chronic active inflammatory disease.

Clinical Protocol:

Clinical information was obtained through a standardized questionnaire (appendix 1) after admission. The questionnaire included demographic and anthropometric data as well as information on risk factors for atherosclerosis and current medications.

Approximately 10 ml of blood was collected from the femoral artery sheath immediately after its insertion during the cardiac catheterization. No additional venous or arterial puncture was needed. Study protocol and consent forms were approved by Institutional's Ethical Committee. Written informed consent was obtained from all patients (appendix 2).

Clinical variables:

Diabetes was defined as clinically known and treated diabetes mellitus. Patients were diagnosed as hypertensive if they were documented to have a blood pressure >140/90 mm Hg on >2 or more occasions or were already on antihypertensive therapy. Hyperlipidemia was diagnosed in patients who had been

given lipid-lowering medication or had a history of total cholesterol levels >240 mg/dl. Smoking was defined as the inhaling use of cigarettes, cigars, or pipes in any quantity. Smokers were classified as non-smokers only if they had not smoked at all in the 6 months preceding the date of angiography. Family history of CAD was defined as a premature cardiac event in a first degree relative (< 55 years in men and < 65 years in women). Previous AMI was considered in patients who had had history of this event before.

Angiographic Data:

Angiographic analysis was performed by the same investigator who was blinded for genotype results and MPO plasma levels. Stenosis severity was determined by visual estimation (in ≥ 2 orthogonal views). CAD severity was assessed using a 6 level score⁴¹: (1) normal coronary angiogram; (2) nonsignificant CAD (<70% stenosis in ≥ 1 epicardial vessel and <50% stenosis of left main coronary artery); (3) significant 1-vessel disease ($\geq 70\%$ stenosis in 1 major epicardial vessel); (4) significant 2-vessel disease ($\geq 70\%$ stenosis in 2 major epicardial vessels); (5) significant 3-vessel disease ($\geq 70\%$ stenosis in all 3 major epicardial vessels); and (6) significant left main CAD ($\geq 50\%$ stenosis of left main coronary artery). Major epicardial vessels considered were the left anterior descendent artery, the circumflex artery and the right coronary artery. The branches of these arteries could have been contemplated by the severity score if they had similar size and extension of the major epicardial arteries.

Biochemical Analysis:

Samples for MPO measurement were collected in heparinized tubes and stored in a recipient with ice. All samples were stored for less than 4 hours before centrifugation. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with high sensitivity (Invitrogen – ZenMyeloperoxidase, OR, United States) was used to perform MPO measurement, and duplicate samples were made. After they were thawed, plasma samples were diluted in an extraction solvent (acetone, hydrochloric acid, and water) and centrifuged with a specific protocol: 3000 rpm speed for 10 minutes at a temperature of 4°C. The supernatant material was lyophilized in a centrifugal evaporator for approximately 6 hours, reconstituted, and the assay carried out immediately afterward. The standard solutions were prepared according to procedures recommended by the manufacturer. The detection concentration range was 0.2 to 100ng/mL.

MPO Genotypes:

Genomic deoxyribonucleic acid was extracted from peripheral blood by standard protocols. The polymorphic site at position -463 of the MPO gene was amplified with use of forward primer MPOf (5'-CGG TAT AGG CAC ACA ATG GTGAG-3') and reverse primer MPOr (5'-GCA ATG GTT CAA GCGATT CTT C-3') as described in the literature. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with Taq polymerase (PerkinElmer); the cycling condition was 94°C for 5 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 1 minute, 56°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute.

Samples were sequenced in the ACTGene Laboratory (*Centro de Biotecnologia*, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer

(Applied Biosystems). DNA templates (30 to 45 ng) were labeled with 3.2 pmol of the primer 5'- CGG TAT AGG CAC ACA ATG GTGAG -3' and 2 μ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μ L. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler with a initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 sec, 55 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified by isopropanol precipitation followed by 70% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10 μ L formamide, denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) programmed with the following parameters: Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; BioLIMS Project "3100_Project1"; Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"; and Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz".

Statistical Analysis:

Continuous variables are expressed as mean \pm standard deviation or median \pm interquartile amplitudes (IQA) and categorical variables as numbers and percentages.

The distribution of myeloperoxidase levels was Gaussian, and parametric tests were used to analyze data. Differences between groups and associations between categorical variables were evaluated using analyses of variance, Student-T test or chi-square tests, when appropriate. Logistic regression model was used to estimate the relative risk for CAD severity score and patients were categorized according to low or

high levels of MPO or its genotypes, adjusted for the effect of other clinical characteristics (variables with $p < 0.10$ were included in the model). The analysis of MPO was performed using cutoff points at mean (9.7ng/mL) and at tertiles, with similar results. Probability values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed with SPSS 11.5 for Windows.

Results

The sample included 135 patients: 81 patients (60%) were men, the mean age was 60.5 ± 11.3 years, BMI 28.5 ± 5.7 and abdominal circumference 101 ± 14.5 cm. As for comorbidities, 32 (24%) were active smokers, 84 (62%) were dyslipidemic, 94 (70%) had family history of CAD, 40 (30%) had diabetes, 85 (63%) were sedentary, 115 (85%) were hypertensive, and 43 (32%) had history of previous MI. Regarding treatment, 83 (62%) were on use of ACE inhibitors or ARB, 78 (58%) were on beta-blockers and 71 (52%) were using statins. Further characteristics are listed in Table 1. Genotype classification for MPO polymorphism was obtained in 118 patients. MPO plasma levels were obtained in 131 patients. Genotypes were not identified in 17 patients due to DNA extraction difficulties and MPO measurements were not performed in 3 patients due to technical problems related to sample hemolysis. All excluded subjects had matching clinical characteristics.

CAD Severity Score:

Normal or nonsignificant CAD (score 1 and 2) were found in 51 patients (39%). Significant CAD (score 3 to 6) was found in 80 patients (61%). Among those subjects with significant CAD, 45 patients (56%) had significant 1-vessel disease, 22 (28%) had

significant 2-vessel disease, 8 (10%) had significant 3-vessel CAD, and 5 (6%) had significant left main disease.

MPO polymorphism and CAD Severity Score:

The genotype frequencies were as follows: 69 (58.5%) for GG, 37 (31.5%) for AG and 12 (10%) for AA. The allele frequencies were 0.72 and 0.28 for G and A, respectively. The genotype frequencies were in accordance with previous studies, and the genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium³⁴⁻³⁷.

No statistically significant association was found between MPO polymorphism and CAD severity in the genotypic distribution (Table 2, $p=0.53$) or when analyzed as high and low expression genotypes (Table 3, $p=0.43$). In univariate analysis, male sex, age, dyslipidemia, previous MI and statin use were associated with higher CAD score.

MPO Plasma Levels, MPO Polymorphism and CAD Severity Score:

Results are presented in Figures 1 and 2. Mean MPO plasma levels were 9.65 ± 6.1 ng/mL. MPO plasma levels had no association with different MPO polymorphism: 8.7 ± 4.7 ng/mL for AA, 8.6 ± 7.0 ng/mL for AG and 9.4 ± 5.6 ng/dL for GG genotypes ($p=0.75$). Expression of allele A was not related to significantly lower MPO levels than homozygosis for allele G, 8.6 ± 6.5 ng/mL and 9.4 ± 5.6 ng/mL, respectively ($p=0.28$).

There was a trend towards higher MPO plasma levels and CAD severity score: 9.0 ± 0.7 ng/mL for scores 1 and 2, and 9.6 ± 0.70 ng/mL for more severe CAD ($p=0.15$). When MPO levels were dichotomized in mean levels, a greater proportion of

patients with elevated MPO levels were observed in scores 5 and 6 (Figure 3). In a multivariate analysis, adjusting for gender, dyslipidemia and prior MI, MPO levels were no longer predictive of more severe CAD (for severity score greater than 2, OR 1,035; 95%CI 0.96 to 1.12;p=0.33).

Some clinical variables were related to MPO levels, such as male sex, smoking, dyslipidemia, body mass index, prior MI and statin use. In linear regression analysis, male gender and patients with dyslipidemia had higher MPO levels (r-square=0.06; model p value=0.02). Medications in use were not related to MPO levels.

Discussion

To our knowledge, the present study is the first to investigate the association between MPO polymorphism and MPO plasma levels with CAD severity. We found no significant association of MPO polymorphism or its plasma levels with the extension of coronary atherosclerosis using a severity score.

In recent years, MPO has emerged as a potential participant in the promotion and propagation of atherosclerosis ^{22,23}. The MPO enzyme functions as an antimicrobial agent in neutrophils and monocytes by forming potent oxidants and reactive oxygen species, such as hypochlorous acid. Expression of MPO is restricted to the myeloid lineage and is highest in bone marrow precursors, peaking at the promyelocyte stage. Under normal conditions, MPO is mostly expressed in this stage, and sharply decrease as these progenitors differentiate toward granulocyte or monocyte lineage. Consistent with these, peripheral blood leukocytes lack detectable MPO mRNA, although MPO protein continues to be stored at high levels in cytoplasmatic lysosomes ⁴².

A few polymorphisms are described for the MPO gene, including a functional polymorphism located at the promoter region of this gene that affects its transcription³³. This polymorphism, which is believed to alter an SP1 transcription factor binding site, is a G to A substitution at position 463 bp upstream of the transcription site. Over expression of this polymorphism have been described in some disease and causally related to them, like in myeloid leukemia patients, in whom GG genotypes appeared in 79-82% of leukemia cells⁴². On the other extreme, individuals with total or subtotal MPO deficiency appear less likely to develop atherosclerosis. GG genotypes has been associated with increased incidence of CAD²⁴, worse prognosis in patients with suspected or at high risk for CAD²⁵⁻²⁸.

However, contrary to these findings, others failed to demonstrate a relation between MPO genetics and atherosclerosis. Makela et al. found no association between aortic atherosclerosis extension and high-expression MPO genotypes (GG)³⁹. The same group demonstrated the absence of association between MPO polymorphism on its high expression genotypes with carotid intima-media thickness measured by high-resolution ultrasonography⁴⁰. Our findings are in accordance with the results of these two studies that correlated atherosclerotic burden with MPO polymorphism in extra-coronary arteries^{39, 40}. Interestingly in all of these populations, genotypes frequencies were similar, patients were heterogeneous and at risk for CAD. It seems reasonable to consider that chance may have played a role in prior studies or the magnitude of association is smaller than expected and our study was no powered to demonstrate it.

The association between MPO plasma levels and its polymorphism is weak and controversial. A pioneer study in patients with acute myeloid leukemia demonstrated

that increased MPO mRNA levels correlate with GG genotype ⁴². In their study, acute myeloid leukemia cells in culture were processed and MPO levels were measured by western blot analysis, and GG genotype had 1-6 times higher relative MPO protein levels. Although this study suggested that GG homozygosis had greater MPO mRNA in immature cells, there is no convincing evidence that peripheral or circulating MPO levels under steady state are higher among these subjects. Hoy et al³⁸, for example, were not able to associate high expression genotype (GG) with more elevated MPO plasma levels in 82 healthy donors. Beyond that, clinical variables such as age and number of white cells explained most of MPO variability, similar findings also observed in our study. Considering that MPO enzymes are stored in intracellular structures and are released under leukocyte activation, it is expected to be more elevated in acute phase settings. Reinforcing this hypothesis, we have recently demonstrated that MPO levels are higher in patients with stable angina compared with AMI patients, and mainly among ST elevation MI ⁴³. From this study, stable subjects scheduled for elective catheterization had low serum MPO levels, although we can not infer on MPO intracellular levels.

Our study has some limitations. We did not perform quantitative coronary angiography, which might have influenced continuous variables of coronary atherosclerosis. However, our CAD score obtained through visual analysis thus reflect the severity of coronary atherosclerotic involvement of studied patients. Another possible limitation was the fact that only a minority of our subjects presented severe CAD (score 5 and 6). Nonetheless, traditional clinical variables related with CAD severity and extension were also identified in our study, suggesting a sample with clinical heterogeneity to point out for significant factors.

In conclusion, the relationship of MPO and CAD severity is still controversial. Despite the fact that there reasonable evidence to support MPO plasma levels and its genotypic presentations as independent predictors of presence and prognosis of CAD, the same factors seem to have no influence on the severity of coronary atherosclerosis in humans.

References

1. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary heart disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
2. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102-1111.
3. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-1143.
4. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:37-42.
5. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1994;94:437–444
6. 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;103:1547–1560.
7. Zhang R, Shen Z, Nauseef WM, Hazen SL. Defects in leukocyte mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood* 2002;99:1802–1810.
8. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1717–1725.
9. Marsche G, Hammer A, Oskolkova O, Kozarsky KF, Sattler W, Malle E. Hypochlorite-modified high density lipoprotein, a high affinity ligand to scavenger receptor class B, type I, impairs high density lipoprotein dependent

- selective lipid uptake and reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* 2002;277:32172–32179.
10. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004;114:529–541.
 11. Zheng L, Settle M, Brubaker G, Schmitt D, Hazen SL, Smith JD, Kinter M. Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem* 2005;280:38–47.
 12. Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, Singh P, Anantharamaiah GM, Chait A, Brunzell J, Geary RL, Oram JF, Heinecke JW. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13032–13037.
 13. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153–2157.
 14. Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J. Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2000;15:409–415.
 15. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002;296: 2391–2394.

16. Zhang C, Patel R, Eiserich JP, Zhou F, Kelpke S, Ma W, Parks DA, Darley-Usmar V, White CR. Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1469–H1475.
17. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, Penn MS, Keaney JF, Jr., Hazen SL. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2004;110:1134 –1139.
18. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, Lau D, Mollnau H, Ortak M, Petri S, Goldmann B, Duchstein HJ, Berger J, Helmchen U, Freeman BA, Meinertz T, Munzel T. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004;37:902–911.
19. 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: 41279–41287.
20. Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4322– 4326.
21. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* 2003;278:28403-28409.

22. 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;24:1309–1314.
23. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1143–1146.
24. Zhang R, Brennan ML, Fu X, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; 286:2136–2142.
25. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, Simoons ML, Hamm CW. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108: 1440–1445.
26. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*. 2003;349:1595–1604.
27. Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C. 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;1364-1368.
28. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1993-2000.

29. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112:2812-2820.
30. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal , Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: Risk or benefit? *Acta Haematol* 2000;104:10–15.
31. Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL. Serum Myeloperoxidase Levels are Associated with the Future Risk of Coronary Disease in Apparently Healthy Individuals. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:159-165.
32. Biolo A, Rhode LE. O Impacto dos Polimorfismos Genéticos e da Farmacogenética na Avaliação e Manejo da Insuficiência Cardíaca. *Revista da Sociedade de Cardiologia do RS*. 2004; 3: 1-3
33. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, et al. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroidhormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996;271(24):14412–14420.
34. Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Theroux P, Rouleau GA. A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *Am Heart J* 2001;142:336 –339.
35. Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Marchlewska A, Heimbürger O, Barany P, Hoff CM, Holmes CJ, Suliman M, Lindholm B, Schalling M, Nordfors L. A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney Int Suppl* 2003:S172–S176.

36. Makela R, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, Jaakkola O, Knuuti J, Lehtimäki T. Myeloperoxidase Gene Variation and Coronary Flow Reserve in Young Healthy Men. *J Biomed Sci* 2004; 11:59-64
37. Asselbergs FW, Reynolds WF, Cohen-Tervaert JW, Jessurun GA, Tio RA. Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary artery disease. *Am J Med* 2004;116:429–430.
38. Hoy A, Tregouet D, Leininger-Muller B, Poirier O, Maurice M, Sass C, Siest G, Tiret L, and Visvikis S (2001). Serum myeloperoxidase concentration in a healthy population: Biological variations, familial resemblance and new genetic polymorphisms. *Eur J Hum Genet* 9:780–786.
39. Makela R, Karhunem PJ, Kunnas, TA, et al. Myeloperoxidase gene variation as a determinant of atherosclerosis progression in the abdominal and thoracic aorta: an autopsy study. *Lab Invest* 2003;83(7):919-25
40. Makela R, Loimaala A, Nenonen A, et al. The association of myeloperoxidase promoter polymorphism with carotid atherosclerosis is abolished in patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2008; 41(7-8): 532-537
41. Garcia S, Canoniero M, Peter A, Marchena E, Ferreira A. Correlations of TIMI Risk Score with angiographic severity and extent of coronary artery disease in patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes. *Am J Cardiol* 2004;93:813-816.
42. Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V: An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1997; 90: 2730-2737.

43. Borges FK. Borges FK, Stella SF, Souza JF, Wendland AE, Werres Jr LC, Ribeiro JP, Polanczyk CA. Serial analysis of myeloperoxidase and C-reactive protein in patients with acute coronary syndrome. *Clinical Cardiol* (in press) 2008;

Figure Legends

Figure 1. Association between MPO plasma levels and CAD score.

Figure 2. Association between MPO polymorphism and MPO plasma levels.

Figure 3. Association between CAD severity and MPO above mean levels (>9.7ng/mL).

Table 1. Clinical Characteristics

Characteristics	N=135 (%)
Demographic Data	
Male	81 (60)
Age* (yr)	60.5±11
Anthropometric Data	
Weight*(kg)	76 ± 15
Height*(m)	1.6±0.1
BMI*(kg/m ²)	28.5±5.8
Abdominal circumference (cm)	100.7±14.5
Risk Factors	
Smoking	32 (23.7)
Dyslipidemia	84 (62.2)
Family History	94 (69.6)
Diabetes Mellitus	40 (29.6)
Sedentary	85 (63)
Systemic hypertension	115 (85.2)
Previous myocardial infarction	43 (31.9)
Drugs	
AAS	108 (80)
Ticlopidine	8 (5.9)
Clopidogrel	6 (4.4)
ACEi or ARB	83 (61.5)
Calcium Antagonist	26 (19.3)
Nitrate	56 (41.5)
Beta-blocker	78 (57.8)
Statin	71 (52.6)
Insulin	8 (5.9)
Diuretic	65 (48.1)
Metformin	25 (18.5)
Sulfonylurea	10 (7.4)
Warfarin	2 (1.5)

Data expressed as means ± standard deviation or number (percentages).; ACE inhibitors– angiotensin converting enzyme inhibitors; ARB – angiotensin receptor blocker; BMI – Body mass index.

Table 2: Association between MPO polymorphism and CAD score

CAD severity (score)	MPO Genotype			N
	AA	AG	GG	
Normal (1)	4(13%)	9(30%)	18(58%)	31
Nonsignificant disease (2)	0(0%)	4(34%)	8(66%)	12
1-vessel disease (3)	6(14%)	12(26%)	27(60%)	45
2-vessel disease (4)	1(5%)	10(50%)	9(45%)	20
3-vessel disease (5)	1(16%)	2(34%)	3(50%)	6
Left-main disease (6)	0(0%)	0(0%)	4(100%)	4
	12(10%)	37(31.5%)	69(58.5%)	118

Table 3: Association between high and low expression genotypes with CAD score

		Allele		
		AA e AG	GG	Total
CAD score	1	13(42%)	18(58%)	31
	2	4(33%)	8(67%)	12
	3	18(40%)	27(60%)	45
	4	11(55%)	9(45%)	20
	5	3(50%)	3(50%)	6
	6	0(0%)	4(100%)	4
		49(41.5%)	69(58.5%)	118

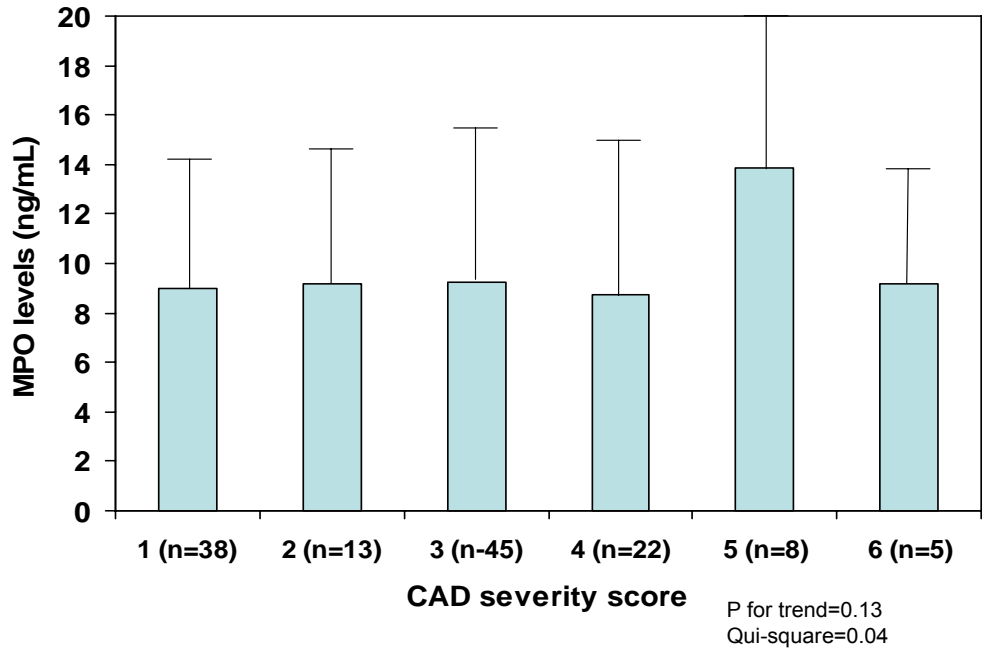


Figure 1. Association between MPO plasma levels and CAD score

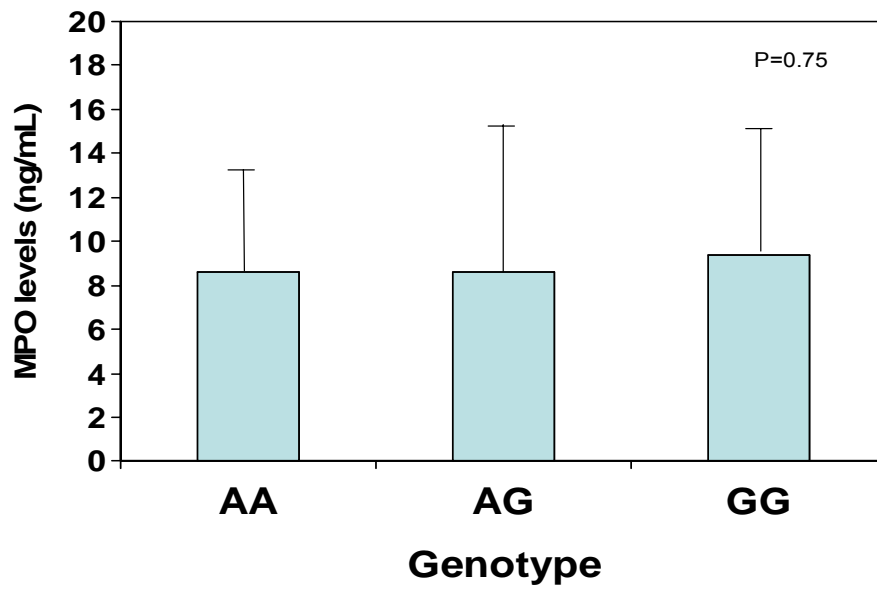


Figure 2. Association between MPO polymorphism and MPO plasma levels

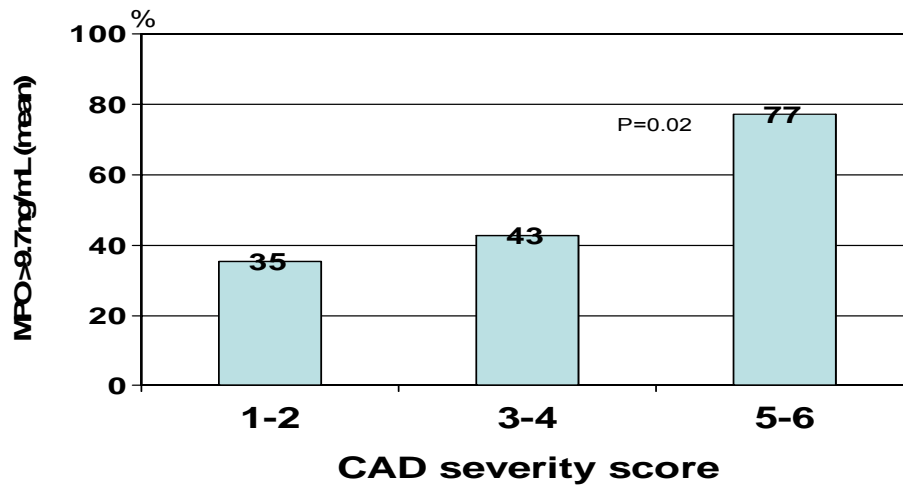


Figure 3. Association between CAD severity and MPO above mean levels (>9.7ng/mL)

Appendix 1

Questionário

Nome:

Prontuário:

Sexo:

Data de Nascimento:

Idade:

Número no projeto:

Peso:

Altura:

IMC:

Circ Abdominal:

Fatores de Risco:

Tabagismo (s) (n)

Dislipidemia (s) (n)

História Familiar de CI (s) (n)

Diabete Melittus (s) (n)

Sedentarismo (s) (n)

HAS (s) (n)

IAM prévio (s) (n)

Medicamentos em uso:

Antiplaquetário (s) (n) AAS () Ticlopidina () Clopidogrel ()

IECA/ARA2 (s) (n) Antagonista do Cálcio (s) (n) Nitrato (s) (n) Beta-bloq (s) (n)

Estatina (s) (n) Insulina (s) (n) Diurético (s) (n)

Hipoglicemiante Oral (s) (n) Metformin () Sulfaniluréia ()

Appendix 2

Appendix 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR EM UM PROJETO DE PESQUISA

ESTUDO: ASSOCIAÇÃO ENTRE A GRAVIDADE DA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E POLIMORFISMOS DA MIELOPEROXIDASE

O senhor (a) está sendo convidado a participar de um protocolo de pesquisa. Este protocolo tem como objetivo obter maior conhecimento a respeito de alterações genéticas relacionadas a doença isquêmica do coração.

1. EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Após a assinatura deste termo, o Sr.(a) responderá um questionário para coleta de dados. Armazenaremos uma amostra do seu sangue (aproximadamente 10 ml) para dosar marcadores inflamatórios e pesquisar a presença de uma alteração genética em uma enzima que pode estar relacionada à presença de lesões nos vasos do coração. Os resultados obtidos com as amostras de sangue serão confrontados com o do cateterismo cardíaco que o Sr(a) está prestes a fazer.

2. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

Não existe potencial risco direto de participar do estudo, pois o sangue será coletado da bainha usada para fazer o cateterismo pelo médico responsável pelo procedimento, não existindo necessidade de punção venosa ou arterial adicional.

3. BENEFÍCIOS DESSE ESTUDO

Não é esperado nenhum benefício direto ao paciente, pois é um trabalho de observação. Contudo, esperamos um benefício para todos os pacientes com doença isquêmica do coração, pois com a conclusão deste trabalho poderemos avaliar melhor pacientes com a mesma condição clínica que o Sr. (a).

Sua participação é voluntária, não havendo qualquer ônus ou gratificações referentes à sua participação no estudo.

4. DIREITO DE DESISTÊNCIA

O Sr. (a) poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento. Sua decisão de não participar não afetará o seu atendimento no Hospital nem trará prejuízos ao senhor (a).

5. CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS:

Todas as informações obtidas através deste estudo podem ser publicadas com finalidade científica, mantendo seu anonimato, isto é, o seu nome não aparecerá. Todas as informações estarão a sua disposição se assim desejar.

6. CONSENTIMENTO

Declaro ter lido (ou foram lidas) e entendido as informações acima antes de assinar esse formulário. Foi-me dada oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo minhas dúvidas. Por este instrumento, tomo parte no presente estudo.

Assinatura do paciente.....

Entrevistador.....

Data...../...../.....

Pesquisadores Responsáveis

Dra. Carisi Polanczyk

Telefone: 2101.8344

Dra. Rodrigo Vugman Wainstein

Telefone: 21018342/ 21018433