

DEBORA ANDREA GRAHL

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS
AO ESTRESSE OXIDATIVO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A
DOENÇA CARDIOVASCULAR EM PACIENTES PORTADORES DE
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Dissertação apresentada para apreciação e parecer da comissão examinadora, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC-PR.

Orientador: Miguel Carlos Riella

Co-orientador: Roberto Pecoits Filho

CURITIBA

2006

GRAHL Debora Andrea.// *Análise de polimorfismos genéticos relacionados ao estresse oxidativo e sua associação com a doença cardiovascular em pacientes portadores de doença renal crônica.*// Curitiba, 2006.// (Dissertação - Mestrado - Ciências da Saúde — Pontifícia Universidade Católica do Paraná).

ORIENTADOR: Miguel Carlos Riella

DESCRITORES: 1. Estresse Oxidativo 2. NADPH oxidase
3. Mieloperoxidase 4. Doença Cardiovascular 5. Mortalidade
6. Doença renal crônica

DEDICATÓRIA

A minha família, em especial meus pais, Márcia e Helvio, pelo amor e carinho, pelo exemplo de vida, pela constante dedicação e apoio, e sobretudo pelos valores a mim ensinados.

AGRADECIMENTOS

A minha família, amigos, e ao meu namorado Guilherme, pela paciência e incentivo, e por compreenderem meus momentos de ausência.

A Deus, por me abençoar com esta oportunidade de crescimento intelectual e profissional, e de conhecer pessoas tão especiais que muito me ajudaram durante esta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Miguel Riella, por apoiar este projeto, e tantos outros trabalhos importantes na área da nefrologia.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho, por todo o seu profissionalismo e estimulante produtividade científica, por sempre me incentivar com uma visão positiva e prática das coisas, por todas as oportunidades e ajuda, e por ser hoje, quem considero meu mentor.

À Fundação Pró-Renal, pelo suporte dado a este projeto, através da bolsa de auxílio à pesquisa, sem a qual não teria a possibilidade de permanecer os sete meses em Estocolmo para desenvolver este trabalho.

Ao Karolinska Institutet (Estocolmo, Suécia) que apoiou esta pesquisa com o suporte da Baxter Healthcare Corporation (Deerfield, Illinois, EUA).

Ao Prof. Dr. Bengt Lindholm, por todo apoio dado a este projeto, por estar sempre de portas abertas, não só ouvindo, mas também perguntando a minha opinião, me integrando ao grupo de nefrogenética não como espectadora, mas como membro atuante. Por nunca ter deixado que a minha pouca, ou melhor, nenhuma experiência nesta área fosse um obstáculo, mas por sempre ter tido a iniciativa de me colocar a par dos fatos, e me mostrar o que é, e como é fazer parte de um grupo de pesquisas. Por me fazer sentir tão bem vinda em seu grupo e em seu país, que tive vontade de ficar trabalhando por lá mesmo!

À Louise Nordfors, por me receber de forma tão calorosa e por dividir comigo seus conhecimentos, em especial sobre genes e SNPs candidatos e sobre Piroseqüenciamento.

Aos colegas que conheci durante o período na Suécia, especialmente Tony Qureshi, pelas análises estatísticas (e por estar sempre pegando no meu pé!); Olof Heimbürger, Peter Stenvinkel, Peter Bárány, Mohamed Suliman, Björn Anderstam, Martin Schalling e Alicia Bergsten por contribuírem com este projeto; Jonas Axelsson, por nunca hesitar em ajudar e

pelas sugestões turísticas; Elvia López e Sawako Kato, por terem sempre uma palavra amiga; Yao Qiang, por ter sido tão atenciosa comigo desde a minha chegada, e companheira de revigorantes caminhadas nos finais de tarde (no verão, é claro!); Sivonne Arvidsson, por tudo o que me ensinou dentro do laboratório.

Ao Prof. Dr. Salmo Raskin, por sua contagiante paixão pela genética e por me dar a oportunidade do primeiro emprego.

A todos os meus colegas de trabalho, especialmente Tatiana Branco e Dr. Salmo, pelo apoio e por respeitarem os meus “tempos”, fundamentais para mim e para a minha fase de mestranda, mesmo tenham me rendido os apelidos de “funcionária turista” e de “tartaruginha”.

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	7
ARTIGO.....	8
CONCLUSÃO.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
REFERÊNCIAS.....	39

RESUMO

O estresse oxidativo está envolvido com o desenvolvimento de doença cardiovascular (CV) em pacientes com doença renal crônica (DRC). O aumento da atividade de enzimas como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e a mieloperoxidase (MPO) leva ao estresse oxidativo. Neste estudo, avaliamos a hipótese de que variações genéticas funcionais no sistema NADPH/MPO podem estar associadas com estresse oxidativo e conseqüentemente com o desenvolvimento de doença cardiovascular em pacientes renais crônicos. O objetivo deste estudo prospectivo foi de avaliar a influência do polimorfismo 242C/T CYBA (gene codificador da subunidade p22phox da NADPH) e do polimorfismo -463G/A da MPO, sobre o nível plasmático de marcadores de estresse oxidativo, características clínicas de doença cardiovascular e risco de mortalidade em um grupo de pacientes apresentando doença renal crônica de estágio 5, ao iniciarem a terapia de reposição da função renal. A população estudada foi de 257 pacientes com doença renal crônica de estágio 5 (idade média 55 anos – entre 22 a 70 anos; 61% sexo masculino), que foram recrutados e acompanhados em média por 42 meses. Os níveis de plasmalogênio eritrocitário (DMA 16/C16:0), pentosidina e 8-oxoDG foram utilizados como marcadores de estresse oxidativo. A doença cardiovascular foi determinada através do histórico e sintomas clínicos dos pacientes. A mortalidade cardiovascular foi monitorizada durante o seguimento do estudo. A genotipagem foi realizada por Piroseqüenciamento. Em uma avaliação transversal, no momento do recrutamento (tomado como período basal neste estudo) a prevalência de doença cardiovascular em pacientes com o genótipo GG para o polimorfismo -463G/A da MPO foi significativamente mais alta (35%) quando comparada com os pacientes com genótipos AG (26%) e AA (0%) ($p < 0.01$). Pacientes com o genótipo CC para o polimorfismo 242C/T do gene CYBA apresentaram níveis mais baixos de DMA 16/C16:0 (0.071 ± 0.003) quando comparados com os pacientes com genótipo TT (0.089 ± 0.006) ($p < 0.05$). Estes pacientes também apresentaram maior mortalidade cardiovascular quando comparados aos pacientes de genótipos CT e TT (Qui-quadrado 2.19; $p < 0.05$). Concluímos que as variações genéticas no sistema NADPH/MPO estão associadas com estresse oxidativo, presença de doença cardiovascular e mortalidade (relacionada à doença cardiovascular) em pacientes com doença renal crônica.

ABSTRACT

Oxidative stress (OS) is involved in the development of cardiovascular disease (CVD) in chronic kidney disease (CKD) patients. Up-regulation of enzymes such as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and myeloperoxidase (MPO) results in OS. We hypothesize that functional genetic variations in the NADPH/MPO system may be associated with oxidative stress and as a consequence with the development of CVD in CKD patients. In the present study, we evaluated the influence of 242C/T CYBA (gene encoding a subunit of NADPH) and MPO -463G/A polymorphisms on OS and clinical overt CVD and CVD mortality in a group of incident patients with stage 5 CKD starting renal replacement therapy. Two hundred fifty seven stage 5 CKD patients (156 males, mean age of 55 years; range 22-70 years) were recruited and followed up for a mean of 42 months. The fasting ratio of erythrocyte levels of plasmalogen (DMA 16/C16:0), pentosidine and 8-OHdG were used as OS markers. CVD was assessed from patient history and clinical symptoms. Genotyping was performed using Pyrosequencing. By cross-sectional analysis at recruitment time (defined in this study as the baseline), the prevalence of clinical overt CVD at the baseline in patients with the GG genotype for the MPO G-463A polymorphism was significantly higher (35%) when compared to patients with the AG (26%) and AA (0%) genotypes ($p < 0.01$). Patients with the CC genotype for the CYBA 242C/T polymorphism presented lower levels of DMA 16/C16:0 (0.071 ± 0.003) when compared to patients with the TT genotype (0.089 ± 0.006) ($p < 0.05$). These patients also had an increased cardiovascular mortality when compared to patients with the CT and TT genotypes (Chi square 2.19; $p < 0.05$). We conclude that genetic variations in the NADPH/MPO system are associated with oxidative stress, presence of CVD, and CVD-related mortality in CKD patients.

INTRODUÇÃO

Ao desempenhar normalmente sua função de filtrar o sangue, o rim excreta os resíduos metabólicos, regula a concentração corporal de água e sais, mantém o equilíbrio ácido apropriado do plasma e ainda funciona como um órgão endócrino, secretando hormônios tais como eritropoetina, renina e prostaglandinas (1). A doença renal crônica (DRC) consiste de uma lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins, e pode ser dividida em estágios funcionais (de 0 a 5) de acordo com o grau da função renal. A DRC de estágio 5 é uma desordem multifatorial complexa com uma elevada taxa de mortalidade, e caracteriza pacientes com insuficiência renal terminal ou dialítica e com filtração glomerular menor que 15 ml/min. A taxa de mortalidade devido a doença cardiovascular (DCV) em pacientes com DRC é muito maior do que na população geral, mesmo quando ajustadas para idade, sexo, raça e presença de diabetes mellitus (2). Fatores de risco clássicos para DCV como dislipidemia, hipertensão arterial e tabagismo são de alta prevalência em pacientes com doença renal crônica terminal, porém estudos têm demonstrado que estes fatores sozinhos não conseguem explicar a alta taxa de mortalidade cardiovascular observada nesta população (3). De acordo com recentes evidências, fatores de risco não tradicionais como estresse oxidativo (um demonstrativo do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade antioxidante) parecem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da DCV neste grupo de pacientes (4).

Fatores genéticos envolvidos nas vias relacionadas ao estresse oxidativo parecem exercer um papel relevante mediando o risco destes pacientes em desenvolver complicações (5).

A coexistência de alelos múltiplos em um locus do genoma humano é chamada de polimorfismo genético. Qualquer sítio no qual existam alelos múltiplos como componentes estáveis da população é, por definição, polimórfico. Um alelo é geralmente definido como polimórfico se ele estiver presente em uma frequência $> 1\%$ na população (6). Um fenótipo específico pode ser resultante do impacto de polimorfismos como, por exemplo, certos SNPs (polimorfismos de troca de base única). Sendo a DRC uma desordem multifatorial, onde várias condições e complicações contribuem para o fenótipo observado, de forma geral um único polimorfismo deve ter um efeito modesto, porém se exposto a uma condição específica

e adversa poderá talvez apresentar um efeito relevante. Para determinar se um polimorfismo realmente interfere em um fenótipo, estudos funcionais devem ser realizados, como os estudos de expressão *in vitro* e estudos em animais de experimentação. Em um estudo de associação, a escolha de um gene e SNP candidato pode ter como base a análise da via fisiopatológica associada à doença (estratégia do gene candidato). Na análise de complicações da DRC, inúmeros genes podem ser considerados candidatos devido à complexa interação gênica envolvida. Com base na literatura foram escolhidos para este estudo dois SNPs relacionados ao estresse oxidativo.

Tem se tornado claro que o estresse oxidativo tem importante contribuição na morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes com DRC (7). Espécies reativas de oxigênio (ERO), como superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, são metabólitos intermediários normalmente produzidos durante o metabolismo do oxigênio, e que podem reagir avidamente com proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e outras moléculas desnaturando-os. Em condições normais, as espécies reativas de oxigênio são contidas naturalmente pelo sistema antioxidante (enzimas antioxidantes e antioxidantes endógenos e exógenos capazes de reagir com EROs provocando sua inativação) que protege as moléculas estruturais e funcionais contra alterações mediadas por EROs, prevenindo assim citotoxicidade e dano tecidual. Além disso, espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante como moléculas sinalizadoras, e EROs produzidas por leucócitos e macrófagos ativados são essenciais na defesa contra microorganismos invasores. Porém sob uma série de condições anormais, a taxa de espécies reativas de oxigênio produzidas pode exceder a capacidade natural dos antioxidantes conduzindo ao estresse oxidativo, onde as EROs podem atacar moléculas estruturais ou funcionais e assim produzir dano e disfunção tecidual. Na DRC, o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de distúrbios a ela associados, como a hipertensão (inativação do óxido nítrico e oxidação ácido araquidônico) (8, 9), desordens neurológicas (nitração de proteínas cerebrais, oxidação da mielina) (10), anemia (redução do tempo de vida dos eritrócitos) (11), inflamação (ativação do fator kappa B nuclear) e doença cardiovascular (oxidação de lipoproteínas, aterogênese) (7). O desequilíbrio entre o dano endotelial e a capacidade de reparo da parede vascular faz parte da fisiopatologia de várias doenças, mas se torna particularmente importante na DRC, dado que o ambiente urêmico por si só deve aumentar a geração de pró-oxidantes e diminuir os níveis séricos de

antioxidantes que por sua vez aumenta a carga oxidativa com a progressão da falência renal (7).

Embora várias substâncias e produtos metabólicos já tenham sido descritos como marcadores de estresse oxidativo, não há um marcador padrão estabelecido. A 8-hidróxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) resulta da oxidação da base guanina e é um dos produtos mais comuns do dano oxidativo do DNA, podendo ser usada como um indicador deste dano (12). Na DRC o dano oxidativo no ácido nucléico de leucócitos foi demonstrado através da mensuração da 8-OHdG por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que se encontrava mais elevada em pacientes com DRC comparada a indivíduos saudáveis (13). A pentosidina pode ser gerada como resultado do aumento da atividade da mieloperoxidase através do aumento da produção de aldeídos (14), podendo assim ser utilizada como um marcador indireto do dano oxidativo de proteínas. Além disso, os plasmalogênios são subgrupos de fosfolipídios encontrados na membrana celular e em lipoproteínas plasmáticas, e estudos sugerem que eles tenham efeito protetor servindo como anti-oxidantes durante a oxidação de lipoproteínas (15), e que atuem como elementos estruturais estabilizando proteínas transmembrânicas (16). Concentrações diminuídas de plasmalogênios fosfolipídicos foram relatadas em pacientes com DRC, confirmando a presença de um aumento no estresse oxidativo em tal grupo de pacientes e validando seu uso como marcador de estresse oxidativo nestes pacientes (17, 18).

Tem sido descrito recentemente que o aumento da atividade de enzimas como a NADPH oxidase e da MPO resultam na produção de grande quantidade de oxidantes, e por isso levariam ao estresse oxidativo. Além disso, este complexo enzimático foi descrito como sendo o maior sistema oxidante em neutrófilos (19). A MPO é uma hemoproteína abundante encontrada em neutrófilos e em menor quantidade também em monócitos. A principal função biológica da MPO é a defesa do organismo, catalisando a produção de ácido hipocloroso (HOCl) para eliminar microorganismos invasores. Seu mecanismo de ação se baseia no seguinte ciclo de eventos: o neutrófilo sintetiza peróxido de hidrogênio por ação da enzima superóxido desmutase (SOD) a partir de duas moléculas de superóxido. A MPO converte o peróxido de hidrogênio em presença de íons haletos como o cloreto (Cl⁻) em HOCl⁻, que é um poderoso oxidante. Isto leva a destruição do agente invasor por oxidar sua membrana plasmática e criar ligações moleculares prejudiciais (faz união dos radicais sulfidríla dos aminoácidos cisteína das proteínas superficiais). A MPO tem atraído significativa atenção

recentemente, pois parece estar envolvida em grande quantidade de doenças não infecciosas como o câncer de pulmão, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, aterosclerose e vasculite (20). O gene MPO, que codifica a proteína mieloperoxidase, está localizado em 17q23.1 no genoma humano. Na região promotora do gene MPO foi identificado um importante e funcional polimorfismo em um único nucleotídeo (SNP), sendo este SNP a substituição de uma guanina (G) por uma adenosina (A) na região -463 (-463G/A). Estudos demonstraram que o alelo G (em contraste ao alelo A) cria um forte sítio de ligação SP1, que está relacionado com a dobra transcricional do gene onde o alelo alternativo confere uma transcrição reduzida (21). Existem crescentes evidências de que a MPO está envolvida na patogênese da aterosclerose, iniciando com a identificação desta enzima em placas ateroscleróticas, onde é cataliticamente ativa e responsável pela oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (22). De fato, vários produtos distintos da MPO, como a 3-clorotirosina, são abundantes em lesões ateroscleróticas humanas e em lipoproteínas de baixa densidade recuperadas de ateroma humano (23). Além disso, em um estudo recente a MPO foi associada à modulação da sinalização vascular e funções vasodilatadoras do óxido nítrico (NO) (24), enquanto seu genótipo tem demonstrado influenciar o risco cardiovascular em pacientes renais e não-renais (25, 26), sendo que em pacientes com DRC, foi descrito que a presença do alelo G está associada com o aumento da prevalência de DCV e dos sinais de estresse oxidativo (27).

A NADPH oxidase é um complexo enzimático que catalisa a redução univalente do oxigênio usando NADPH como doador de elétrons de acordo com a reação: $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$. O ânion superóxido (O_2^-) formado atua como oxidante no sistema microbicida fagocitário, prosseguindo por uma série de reações de transferência de elétrons que constitui o metabolismo oxidativo ("*burst oxidativo*") que é caracterizado por um aumento abrupto no consumo de oxigênio (O_2) e sua redução parcial a ânion superóxido (O_2^-). O O_2^- ao agir como um oxidante, é reduzido para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é diretamente tóxico para os microorganismos. Além desta função da NADPH oxidase nos fagócitos, onde esta enzima produz grandes quantidades de superóxido, a NADPH oxidase vascular é uma enzima análoga à NADPH oxidase fagocítica, porém estimativas de produção de O_2^- em células vasculares sugerem que a capacidade desta enzima é aproximadamente um terço da dos neutrófilos (28), e que possui uma função primariamente sinalizadora. Diferentemente da NADPH oxidase leucocitária, que somente é ativa quando estimulada e

que tem uma produção abrupta de EROs, a NADPH oxidase vascular é de baixa produtividade e de liberação branda, e tem uma função constitutiva que é ausente nos fagócitos (29). O complexo NADPH oxidase consiste em duas subunidades de membrana do citocromo b558, a subunidade gp91phox (Cybb) e uma subunidade menor p22phox (Cyba), servindo como transportadores de elétrons da enzima, três componentes citossólicos que são p47phox (*Ncf1*), p67phox (*Ncf2*) e p40phox (*Ncf4*), e duas proteínas G (proteínas de baixo peso molecular que se ligam ao nucleotídeo guanina), Rac2 (em algumas células Rac1) e Rap1A. O gene *CYBA*, codificante da subunidade p22phox da NADPH oxidase, está localizado em 16q24 no genoma humano. A subunidade p22phox é componente essencial da NADPH oxidase, indispensável na produção de superóxido em células fagocitárias, e estudos demonstraram que esta subunidade também é expressa em outros tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais, e em células da musculatura lisa vascular (30) onde a inibição da expressão da p22phox reduz a produção de superóxido (31). O SNP C242T no exon 4 do gene *CYBA*, que resulta na substituição de uma histidina por uma tirosina no aminoácido 72 (His72Tyr) do sítio de ligação heme, foi descrito estar associado com atividade alterada da oxidase (32). Como a histidina é considerada ligante para o grupo prostético heme do citocromo b, foi sugerido que este polimorfismo esteja diretamente relacionado com a função da subunidade p22phox da NADPH oxidase (33). Sendo a p22phox um componente essencial da NADPH oxidase, foi descrito que o polimorfismo C242T está associado com uma menor produção vascular de superóxido em pacientes com doença arterial coronariana (32). Neste estudo, o risco de doença arterial coronariana mostrou-se menor em indivíduos carregando o alelo “T”, porém outros estudos revelaram resultados contraditórios em pacientes com doença arterial coronariana (34, 35) e doença cerebrovascular (36). Existem diversos estudos caso-controle envolvendo o polimorfismo C242T da NADPH oxidase, mas eles apresentam conflito entre seus resultados. Por exemplo, os resultados de Renner et al. (37) mostraram que não existe uma associação entre o polimorfismo C242T e doença arterial periférica oclusiva. Em contraste, outros estudos sugerem que este polimorfismo está associado com um aumento do risco de doença arterial coronariana (38) e de doença cerebrovascular (36) em pacientes jovens, além de se associar com a progressão da aterosclerose coronariana (35). O efeito do polimorfismo C242T do gene *CYBA* sobre a atividade da NADPH oxidase ainda não está totalmente esclarecido, mas em estudos que investigaram os efeitos deste polimorfismo nas funções de células vasculares e endoteliais, os

resultados trazem que este polimorfismo leva a uma perda de atividade da NADPH oxidase em vasos humanos (32, 39).

Como os genes codificantes da MPO e da NADPH oxidase são conhecidamente polimórficos, e variações genéticas funcionais no sistema NADPH/MPO podem interferir na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), é possível que polimorfismos em genes relacionados ao sistema possam estar associados com estresse oxidativo e conseqüentemente ao desenvolvimento de DCV em pacientes com DRC.

OBJETIVO

Analisar as associações entre polimorfismos genéticos relacionados à MPO e à NADPH oxidase e níveis plasmáticos de marcadores de estresse oxidativo, prevalência de DCV e mortalidade em pacientes portadores de DRC.

ARTIGO -

***“ASSOCIATIONS BETWEEN THE CYBA 242C/T AND THE MPO -463G/A
POLYMORPHISMS, OXIDATIVE STRESS AND CARDIOVASCULAR DISEASE IN
CHRONIC KIDNEY DISEASE PATIENTS”***

**Associations between the CYBA 242C/T and the MPO -463G/A
Polymorphisms, Oxidative Stress and Cardiovascular Disease in
Chronic Kidney Disease Patients**

Debora A. Grahl^{1,2}, Jonas Axelsson¹, Louise Nordfors¹, Olof Heimbürger¹, Peter Bányi¹, Abdul Rashid Qureshi¹, Sawako Kato¹, Makoto Watanabe¹, Mohamed Suliman¹, Miguel C. Riella², Bengt Lindholm¹, Peter Stenvinkel¹, Roberto Pecoits-Filho^{1,2}

¹*Divisions of Renal Medicine and Baxter Novum, Department of Clinical Science, Intervention and Technology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden and* ²*Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil*

Address for correspondence:

Bengt Lindholm, MD, PhD

Divisions of Renal Medicine and Baxter Novum

Department of Clinical Science, Intervention and Technology

Karolinska Institutet

K-56, Karolinska University Hospital (Huddinge)

141 86 Stockholm, Sweden

Fax: +46 08 689-7730

E-mail: bengt.lindholm@klinvet.ki.se

Abstract

Oxidative stress (OS) is linked to cardiovascular disease (CVD) in chronic kidney disease (CKD) patients. Up-regulation of enzymes such as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and myeloperoxidase (MPO) results in increased OS. Functional genetic variations in the NADPH/MPO system might lead to altered transcription and/or activity of these enzymes, and thus to altered risk for OS and CVD in CKD patients. We evaluated the impact of the 242C/T *CYBA* (gene encoding a subunit of NADPH) and -463G/A *MPO* polymorphisms on OS and CVD mortality in stage 5 CKD patients starting dialysis.

Two hundred and fifty-seven patients (156 males, mean age of 55 years; range 22-70 years) with mean GFR 7.0 mL/min were followed up for a mean of 42 months. The fasting ratio of erythrocyte levels of plasmalogen (DMA 16/C16:0) was used as marker of OS. CVD was assessed from patient history and clinical symptoms. Genotyping was performed using Pyrosequencing.

By cross-sectional analysis at recruitment time (defined in this study as the baseline), the prevalence of overt CVD was higher (35%) in patients with the GG genotype of *MPO* G-463A polymorphism as compared to patients with the AG (26%) and AA (0%) genotypes ($p < 0.01$). Patients with the CC genotype for the *CYBA* 242C/T polymorphism had lower levels of DMA 16/C16:0 (ratio 0.071 ± 0.003) as compared to patients with the TT genotype (0.089 ± 0.006 ; $p < 0.05$). These patients also had an increased CVD mortality when compared to patients with the CT and TT genotypes (Chi square 2.19; $p < 0.05$). We conclude that genetic variations in the NADPH/MPO system are associated with oxidative stress, presence of CVD and CVD-related mortality in CKD patients.

Key words: oxidative stress, NADPH oxidase, MPO, cardiovascular disease, mortality, CKD patients.

Introduction

The mortality rate of chronic kidney disease (CKD) patients due to cardiovascular disease (CVD) is several-fold higher than in the general population, even after adjustment for age, gender, race and diabetes mellitus (1, 2). Oxidative stress is a reflection of the imbalance between the *in vivo* generation of free radicals and the anti-oxidative capacity of surrounding tissue and has emerged as a contributor to vascular disease (3). Furthermore, oxidative stress is a constant feature of CKD, as evidenced by an abundance of lipid, carbohydrate, and protein oxidation products in the plasma and tissues of uremic patients, although the causes and consequences of these findings are still to be investigated (4). Indeed, oxidative stress may be an important contributor to cardiovascular morbidity and mortality in CKD patients (5). Thus, it is of interest that recent studies have shown that up-regulation of enzymes involved in the controlled production of oxygen radicals inherent to normal physiology, including Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase (NADPH-oxidase) and myeloperoxidase (MPO) are major contributors to systemic oxidative stress *in vivo* (6, 7).

MPO is an abundant hemoprotein found mainly in neutrophils but to a lower extent also in monocytes (7). The main biological function of MPO is the defense of the organism by catalyzing the production of hypochlorous acid (HOCl), a potent pro-oxidant used in host defense. MPO has recently attracted significant attention, since it seems to play a pathophysiological role in a broad range of non-infectious diseases, including lung cancer, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, atherosclerosis, and vasculitis (7). A well-characterized and functional single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of the *MPO* gene, consisting of a G to A substitution (-463G/A) has been shown to be correlated with a 25-fold difference in transcriptional activity, with the greatest transcription in GG homozygotes (8). Also, the presence of the G allele was shown by our group to be associated with increased prevalence of CVD and increased signs of oxidative stress in stage 5 CKD patients (9).

NADPH-oxidase is a plasma membrane-associated enzyme complex that catalyzes the univalent reduction of oxygen using NADPH as an electron donor. The superoxide anion formed acts as an oxidant in the phagocyte microbicidal system, proceeding through a series of electron transfer reactions that form the respiratory burst. In contrast to the high-output phagocytic oxidase, the vascular NADPH-oxidases are low-output, slow-release enzymes and

have a moderate constitutive activity, which is absent in phagocytes (10). It is a multisubunit enzyme complex that comprises a plasma membrane composed of two subunits, gp91phox (Cybb) and p22 phox (Cyba), serving as the electron transfer components of the enzyme, three cytosolic components, and two binding proteins (G proteins). The *CYBA* gene thus encodes the p22 subunit, and the C242T SNP in exon 4 of that gene has been shown to result in the replacement of histidine by tyrosine at amino acid 72 (His72Tyr) of the potential heme binding site, which appears to result in reduced oxidase activity (11). Thus, as MPO and NADPH are both involved in generating oxidative stress, and as oxidative stress is linked to CVD, we hypothesized that the *CYBA* C242T and *MPO* G-463A functional polymorphisms could lead to clinically significant differences in oxidative stress and thus modulate CVD morbidity and mortality in patients with stage 5 CKD.

Material and Methods

Study subjects

Two hundred fifty seven stage 5 CKD patients (156 males, mean age of 55 years - range 22-70 years) from the Karolinska University Hospital at Huddinge (Stockholm, Sweden) were studied close to the start of renal replacement therapy (RRT). Exclusion criteria were age above 70 years, clinical signs of overt infection and/or acute vasculitis, liver dysfunction, known malignancy and unwillingness to participate in this study. Part of this patient material has been described previously (12, 13). The cause of ESRD was chronic glomerulonephritis in 22% of the patients, diabetic nephropathy in 23%, and other or unknown causes in 55% of the patients. Forty eight percent started hemodialysis (HD) whereas 52% had peritoneal dialysis (PD) as initial RRT. Many patients were on antihypertensive medications, such as angiotensin converting enzyme inhibitors (50%), beta-blockers (54%) and calcium-blockers (38%). Subjective global nutritional assessment (SGA) was used to evaluate the overall protein-energy nutritional status. SGA includes six subjective assessments, three based on the patient's history of weight loss, incidence of anorexia and incidence of vomiting and three based on the subjective grading of muscle wasting, presence of oedema and loss of subcutaneous fat. Based on these assessments, each patient was given a score which reflected the nutritional status (14), and malnutrition was defined as a subjective global assessment

(SGA) score >1. Demographic data of the patients are given in Table 1. The Ethics Committee of the Karolinska Institutet at Huddinge University Hospital approved the study protocol, and informed consent was obtained from all patients and control subjects.

Clinical cardiovascular disease at baseline and survival analysis

Clinical cardiovascular disease was defined by clinical symptoms or findings, or a previous history of congestive heart failure, myocardial infarctions, angina, peripheral vascular disease, or cerebrovascular disease. The median follow-up period was 42 months (range, 1-126 months). CVD-related mortality was defined by deaths attributed to CVD (cardiovascular, cerebrovascular, peripheral vascular disease and aortic aneurysm). Patients submitted to a renal transplant were also followed up for the outcome analysis.

Blood sampling and laboratory analysis

Within one week of inclusion, blood samples were obtained on the morning after an overnight fast. Blood hemoglobin (Hb) and serum albumin (using the bromocresol purple method) were analyzed by routine procedures at the Department of Clinical Chemistry, Karolinska University Hospital Huddinge.

Oxidative stress markers

Baseline plasma pentosidine was measured in 245 patients using reverse phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) and adjusted for serum albumin concentration (expressed as pMol/mg alb), while levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) were measured in 151 patients using a commercially available competitive ELISA kit (Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan). The kit can measure 8-OHdG values ranging from 0.125 to 10 ng/ml using a monoclonal specific antibody, N45.1. This antibody does not cross-react with the original four deoxyribonucleosides, 2'-deoxyinosine, 8-hydroxy-27-deoxyadenine or O6-methyl-2'-deoxyguanosine. Also, the fasting ratio of erythrocyte levels of plasmalogen (DMA 16/C16:0) was determined in only 72 patients, due to difficulties in sample logistics. Blood was drawn into tubes containing EDTA, and erythrocytes were separated from plasma by centrifugation and immediately frozen and stored at -70°C or analyzed. The analysis was done essentially as described by Björkhem et al (15), using gas-liquid chromatography. The relative plasmalogen level was calculated from the peak ratios of 16:0 dimethylacetal (DMA) to

methyl palmitate. The precision of the assay was estimated from five replicate measurements of one blood sample. The interassay coefficient of variation for DMA 16:0/C16:0 was 4%.

Genotyping methods

A 5 ml EDTA sample of peripheral blood was obtained as described above, and leukocyte DNA was extracted using a QIAamp® DNA kit. DNA was stored at -20°C.

Myeloperoxidase (-463G/A SNP):

As previously described by Pecoits-Filho et al (9), the design of the sequencing primers was performed using the software Primer Designer 4 for Windows, version 4.1© (Scientific and educational software Inc., Durham, NC) and all oligonucleotides were synthesized by Interactiva® (Ulm, Germany). Sequence amplification was performed using the polymerase chain reaction (PCR) on a PTC-225 Thermocycler (MJ Research, Inc., Cambridge, MA, USA). The PCR reaction volume was 50 µL, containing 20 to 50 ng of DNA, 10 pmol of forward and reverse primers, 0.2 mM of each dNTP, 0.3 U of DyNAzyme™ II (DNA Polymerase; Finnzymes, California, USA), 10 mM of Tris-HCl, 1.5 mM of MgCl₂, 50 mM of KCl, and 0.1% Triton X-100. The primers used for the PCR reaction were 5'-CGGTATAGGCACACAATGGTGAG-3' (forward primer) and 5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTT-3' (reverse primer). After electrophoresis size separation, the PCR product was confirmed by ultraviolet (UV) transillumination of gels stained by EtBr (1.5% agarose). The pyrosequencing reaction was performed on a PSQ96™ Instrument from Pyrosequencing AB (Uppsala, Sweden) as described elsewhere (16), and the sequencing primer used was 5'-CCTGACCTCAAGTGATCCACC-3'.

NADPH Oxidase (242C/T CYBA SNP):

Amplimers and sequencing primer were designed using the **Pyrosequencing™ Assay Design Software** (Uppsala, Sweden), and all oligonucleotides were synthesized by Thermo Electron Corporation® (Ulm, Germany). The DNA fragment containing the C242T polymorphic site was amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) on a PTC-225 Thermocycler (MJ Research, Inc., Cambridge, MA, USA). The PCR reaction volume was 50 µL, containing 10 µL of DNA, 31.6 µL of H₂O, 1µL of forward and reverse primers, 1 µL of

each dNTP, 0.4 μ L of DyNAzyme™ II (DNA Polymerase; Finnzymes, California, USA), and 5 μ L of the 10 x Reaction buffer (1 x is 10 mM of Tris-HCl, 1.5 mM of MgCl₂, 50 mM of KCl, and 0.1% Triton X-100). The amplimers used were 5'-AGGAGTCCCGAGTGGGAGA-3' (forward primer) and 5'-ACGGCCCGAACATAGTAATTCC-3' (reverse primer). After electrophoresis size separation, the PCR product was confirmed by ultraviolet (UV) transillumination of gels stained by EtBr (1% agarose). The pyrosequencing reaction was performed on a PSQ96™ Instrument from Pyrosequencing AB (Uppsala, Sweden) as described elsewhere (16), and the sequencing primer used was 5'-TCACCACGGCGGTCA-3'.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM or median and range as appropriate. A P-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant. Differences between the different genotypes were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using the non-parametric Kruskal-Wallis test whenever appropriated, with an F value less than 0.05 indicating significance. Survival analyses were made with the Cox proportional hazard model. The relative risks for mortality were determined by univariate and multivariate Cox regression analysis and presented as hazard ratio (HR; 95% confidence intervals (CI)). The Cox proportional-hazards model (the PHREG procedure in the SAS System Release 8.2) was used to examine the effects of baseline and follow-up variables on the outcome variables. The goal of the analysis was to assess the hazard ratio (HR; analogous to risk ratio or relative risk) of the particular value compared with a reference value (HR=1). Plots of log [-log (survival rate)] against log (survival time) were performed to establish the validity of the proportionality assumption. Since the proportional-hazards model assumes a constant HR over time, the assumption for each baseline covariate of the Cox proportional-hazards model was tested before the final analysis by evaluating a time-covariate interaction term (SAS Institute, Inc., 2001). The maximum-likelihood test at $p < 0.05$ was considered to accept that the HR of the particular variable depended on time. Survival was measured from the day of examination until death or censoring, which was made at the end of the follow-up. No patient was lost to follow-up. The statistical analysis was performed using statistical software SAS version 9.1 and JMP (version 5.1) for Windows (SAS Campus Drive, Cary, NC, USA 27513). The Hardy-Weinberg

equilibrium for the genotypes distributions was estimated using software available at the Institute of Human Genetics-Munich Website (<http://www.ihg.gsf.de>).

Results

Main characteristics of the population

The study population consisted of 257 incident patients (61% males) with a median age of 55 (range 22-70) years. Seventy-four patients (29%) were diagnosed with either type 1 or type 2 diabetes mellitus. Clinically overt CVD was present in 81 (31%) patients. The baseline values of measured markers of oxidative stress were elevated as compared to normal values reported previously, and are shown in Table 1 and Table 2. When comparing diabetic and non-diabetic patients, there were no significant difference in either pentosidine or 8-OHdG levels. Diabetic patients presented lower levels of S-albumin (30.7 ± 0.7) than the non-diabetic (33.9 ± 0.4 ; $p<0.05$).

Characteristics of the population according to genotype

Of the 257 CKD patients tested for the *MPO* -463G/A polymorphism, 173 (67%) were homozygous for the GG genotype, 7 (3%) for the AA genotype, and 77 (30%) were heterozygous. The *CYBA* C242T polymorphism, was analyzed in the same patients, and 122 (47%) had CC genotype, 23 (9%) TT genotype, and 112 (44%) were heterozygous. Genotype distribution for each polymorphism followed the Hardy-Weinberg equilibrium. Clinical characteristics divided by genotype group appear in Tables 3 and 4. Importantly, there were no significant differences in prevalence of diabetes mellitus, smoking or malnutrition (defined as $SGA>1$). In *CYBA* C242T groups, there were significantly different levels of the oxidative stress marker DMA 16/C16:0, with higher levels in the TT group as compared to compared to CC and CT. Finally, there was a significant difference in CVD prevalence between *MPO* genotypes (Table 3).

Survival analysis

During the follow-up period, patients with the *CYBA* CC genotype had an increased cardiovascular mortality when compared to patients with the CT and TT genotypes (Chi square 2.19; $p<0.05$) (Figure 2). After adjustment for age, DM and gender, the *CYBA* CC

genotype was still significantly associated with a higher CV mortality (Table 5), while we could not find a similar difference between *MPO* genotypes (Chi square 0.71, $p=ns$ – Figure 1). Furthermore, there was no significant impact between any genotype and all cause mortality survival analysis.

Discussion

In this study, we analyzed the impact of genetic polymorphisms in the NADPH/MPO system on oxidative stress and clinical outcome of CKD patients and observed that genetic variation in the NADPH oxidase' CYBA gene is associated with oxidative stress and CVD-related mortality, and in the MPO gene with the presence of overt CVD in CKD patients.

The likely explanation for this impact on survival most likely lies in the observed differences in pro-oxidative capacity between phenotypes. Oxidative stress appears to be intimately linked to the pathophysiology of CVD (3), particularly in patients such CKD patients, with high production of free radicals and low redox capacity (4). Indeed, it has previously been demonstrated that OS plays an important role in the pathogenesis of several complications of CKD, including hypertension (inactivation of nitric oxide and oxidation arachidonic acid) (17, 18), neurologic dysfunction (nitration of brain proteins, oxidation of myelin) (19), anemia (reduction of erythrocyte lifespan) (20-23) and chronic inflammation (through nuclear factor kappa B activation) (5).

In CKD, oxidative stress is likely caused by multiple factors, including insulin resistance, chronic inflammation, uncontrolled hypertension and dialysis treatment, as well as through acute and chronic infections and excessive parenteral iron administration. Furthermore, anti-oxidative defenses are reduced in CKD, both as a result of loss of water-soluble vitamins during dialysis and because of a lower mass of erythrocytes.

There is growing evidence that MPO is involved in the pathogenesis of atherosclerosis, starting with the identification of the enzyme in the atherosclerotic plaques, where it is catalytically active and responsible for the oxidation of low-density lipoprotein (LDL) (24). In fact, multiple distinct products of MPO, such as 3-chlorotyrosine, are enriched in human atherosclerotic lesions and LDL recovered from human atheroma (25). Moreover, in a recent study MPO was linked to the modulation of the vascular signaling and vasodilatory functions of nitric oxide (NO) (26), while MPO genotype has been shown to influence

cardiovascular risk in both non-renal (27, 28) and renal patients. Indeed, we have previously shown (9) an association between genetic variations related to lower activity of MPO and lower plasma levels of pentosidine and cardiovascular risk in ESRD patients. In the present study, we are thus surprised that we could not find a difference in oxidative stress markers between *MPO* genotypes, although significant differences in the prevalence of CVD were confirmed. A possible explanation for this observation is that oxidative stress is a highly localized process subject to very rapid changes, and it is possible that the methods used could not accurately reflect systemically the local effects of differences in MPO activity in atherosclerotic lesions.

NADPH oxidase is an important source of reactive oxygen species (ROS) in the vasculature and its p22phox (CYBA) subunit, which transfers electrons between other subunits of the NADPH oxidase, plays an important role in the O₂⁻ production process (29). In fact, this enzyme, present in vascular smooth muscle cells and endothelial cells, seems to be a major source of superoxide production in animal models of vascular disease (30) and in human atherosclerosis (31, 32). The biological effects of NADPH oxidase in cardiovascular cells were first described by Griendling *et al* (32). Production of O₂⁻ in the vessel wall has been shown to inactivate nitric oxide, leading to the production of peroxynitrite and impaired endothelium-dependent vasodilatation (33, 34); and O₂⁻ is also involved in oxidizing LDL (35); increases adhesion molecule expression in ECs resulting in monocyte infiltration (36); and activates matrix metalloproteinases, leading to vascular remodeling (37). NADPH oxidase-derived O₂⁻ and H₂O₂ are intimately involved in the growth response of VSMCs and fibroblasts (38-42) and also participate in VSMC migration and, in some cases, cellular apoptosis (43). These ROS function as signaling molecules to initiate specific cellular responses (32). The *CYBA* C242T polymorphism has been studied in different populations, and the T-allele appears to act in a dominant manner (44). Guzik *et al* (11) demonstrated that the presence of at least one T allele is associated with reduced NADPH oxidase activity in human blood vessels and several studies have also been performed in different patient populations (45-49). In our study, the higher levels of DMA 16/C16:0 observed in patients carrying the T allele may be an indirect sign that this genetic variation could result in lower expression of the enzyme (leading to lesser production of ROS), diminished OS and as consequence preserving the plasmalogen in erythrocyte membranes in CKD patients. Indeed,

CKD patients with low levels of DMA 16/C16:0 (higher oxidative stress) presented worse survival than patients with high DMA 16/C16:0 levels in previous studies.

A study by Kirk *et al* (50) showed that a deficiency in NADPH oxidase of phagocytes fails to inhibit atherosclerosis in mice with either diet-induced or genetic forms of hypercholesterolemia, indicating that ROS derived from vascular NADPH oxidase might be more important in the pathogenesis of atherosclerosis than leukocyte NADPH oxidase-derived ROS. Therefore, one could speculate that a better CVD-related-outcome in those T allele carrying patients in the CYBA polymorphism, might be due to their lower vascular-NADPH oxidase activity and subsequent reduced signaling function of vascular NADPH oxidase-derived ROS in mediating redox-sensitive gene expression in the vasculature, such as vascular inflammatory genes like VCAM-1 and MCP-1 that represent a subset of genes implicated in the pathogenesis of atherosclerosis (51). Furthermore, Zhang *et al* (52) have demonstrated that MPO could use the vascular NADPH oxidase-derived H₂O₂ to produce HOCl and its chlorinating species, and that they amplified the H₂O₂-induced vascular injury by additional impairment of endothelium-dependent relaxation, showing that MPO-vascular NADPH oxidase-HOCl-chlorinating species may represent a common pathogenic pathway in vascular diseases and a mechanism involved in exacerbation of vascular diseases under inflammatory conditions.

The main finding of our study was the description linking the *CYBA* genotype to cardiovascular and total mortality, since the presence of the C allele was associated with increased CVD mortality, even after adjusting for age, gender and DM. Our findings, however, contrast with reports from other groups, who have associated the T allele with worse progression of atherosclerosis (44), cerebrovascular disease (53) and an increased risk for coronary artery disease in young individuals (54). Therefore, further studies must replicate our results in other group of CKD patients in order to confirm our findings.

There are some limitations of the present study which need to be emphasized. First, the number of patients included and the number of events are relatively small. The biochemical markers utilized are not a direct measure of the systemic oxidative stress, partly because such a methodology is not yet developed. Finally, evaluation of oxidative stress markers was only performed at baseline, while serial measurements would have been more informative when looking at the effect of the studied genetic variations.

In summary, we reported that common genetic variations in the NADPH/MPO system are associated with higher prevalence of CVD, signs of oxidative stress and confer a higher risk of CVD mortality in a group of CKD patients. Our data provide epidemiological support for the hypothesis that increased oxidative stress is associated with atherosclerotic CVD in CKD patients. We hypothesize that this is due to direct effects on oxidative stress generation on the vascular tissue, suggesting that these genotypes may be of clinical interest in risk stratification and future clinical trials of antioxidative interventions.

Acknowledgements

This study was supported by unconditional grants from Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Illinois, USA, (to the Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) and the Söderbergh Foundation (PS). BL is an employee of Baxter Healthcare. DG was supported by a scholarship from the Pro-Renal Foundation, Brazil. RPF was supported by the Brazilian Council of Research (CNPq).

Table 1. Baseline characteristics of the study population.

Number of patients (<i>n</i>)	257
Male patients (%)	61%
Age (years)	55 (22-70) *
Diabetes mellitus (%)	29%
Malnutrition (SGA >1; %) •	29%
History of cardiovascular disease (%)	31%
Systolic blood pressure (mmHg) ••	151±1 **
Diastolic blood pressure (mmHg) ••	88±1 **
Hemoglobin (g/L) °	103 (67-145) *
Glomerular filtration rate (mL/min) °°	7±0.15 **
Pentosidine <i>pmol/mg albumin</i> ♦	31.7 (7.5-384.2) *
DMA 16/C 16:0 ♦♦	0.071±0.002 **
8-OHdG ▲	0.83±0.03 **
Serum albumin (g/L)	33.0±0.3 **

• Number of patients (*n*) = 246; •• *n* = 229; ° *n* = 250; °° *n* = 226; ♦ *n* = 245; ♦♦ *n* = 72; ▲ *n* = 151.

*Median (range); ** mean±SEM. SGA indicates subjective global assessment; DMA dimethylacetate; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

Table 2. Differences in oxidative stress markers in CVD and non-CVD patients.

	CVD patients	Non-CVD patients	<i>P</i> value
Number of patients (<i>n</i>)	81	176	
Age (years)	62 (31-70) *	50 (22-70) *	<0.05
Prevalence of DM (%)	46%	21%	<0.05
Smoking (%) [◊]	71%	38%	<0.05
Prevalence of malnutrition (%) ^{◊◊}	44%	22%	<0.05
Serum albumin (g/L)	31.0±0.6 **	33.9±0.4 **	<0.05
Oxidative stress markers			
Pentosidine <i>pmol/mg albumin</i> [•]	35.8 (11.7-92.3) *	28.3 (7.5-384.2) *	<0.05
DMA 16/C16:0 ^{••}	0.070±0.003 **	0.071±0.002 **	NS
8-OHdG [▲]	0.976±0.079 **	0.757±0.028 **	<0.05

[◊]Number of patients (*n*) =230; ^{◊◊} *n* =246; [•] *n* = 245; ^{••} *n* = 72; [▲] *n* = 151.

*Median (range); ** mean±SEM. DM indicates Diabetes mellitus; DMA dimethylacetate; 8-OHdG, 8-hydroxy-2' deoxyguanosine.

Table 3. Characteristics of the study population divided according to MPO genotypes.

	Genotype groups			P value
	GG	GA	AA	
Number of patients (<i>n</i>)	173	77	7	
Age (years)	53 (22-70) *	56 (25-70) *	50 (25-66) *	NS
Diabetes mellitus (%)	30%	27%	14%	NS
Smoking (%) [◊]	46%	57%	43%	NS
Malnutrition (SGA >1; %) [•]	29%	32%	14%	NS
CVD (%)	35%	26%	0%	<0.05
Pentosidine <i>pmol/mg albumin</i> ^{••}	32.3 (8.5-123.6) *	28.8 (7.5-384.2) *	36.4 (12.9-45.2) *	NS
DMA 16/C16:0 [◊]	0.071±0.002 **	0.069±0.004**	0.072±0.018**	NS
8-OHdG [▲]	0.806±0.026 **	0.883±0.083 **	0.774±0.348 **	NS
Serum albumin (g/L)	32.8±0.4 **	33.7±0.7 **	30.2±3.8 **	NS

[◊]Number of patients (*n*) = 230; [•] *n* = 246; ^{••} *n* = 245; [◊] *n* = 72; [▲] *n* = 151.

*Median (range); ** mean±SEM. CVD indicates cardiovascular disease; DMA, dimethylacetate; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

Table 4. Characteristics of the study population divided according to CYBA genotypes.

	Genotype groups			<i>P</i> value
	CC	CT	TT	
Number of patients (<i>n</i>)	122	112	23	
Age (years)	56 (22-70) *	54 (23-70) *	50 (25-69) *	NS
Diabetes mellitus (%)	27%	33%	17%	NS
Smoking (%) [◊]	53%	46%	45%	NS
Malnutrition (SGA >1;%) [•]	32%	27%	28%	NS
CVD (%)	32%	32%	26%	NS
Pentosidine <i>pmol/mg albumin</i> ^{••}	36.2 (8.2-123.6) *	29.2 (7.5-94.3) *	35.7 (14.5-384.2) *	NS
DMA 16/C16:0 [◊]	0.071±0.003 **	0.067±0.003 **	0.089±0.006 **	<0.05
8-OHdG (ng/mL) [▲]	0.836±0.052 **	0.821±0.048 **	0.862±0.103 **	NS
Serum albumin (g/L)	33.1±0.5 **	33.5±0.5 **	30±1.8 **	NS

[◊] Number of patients (*n*) = 230; [•] *n* = 246; ^{••} *n* = 245; [◊] *n* = 72; [▲] *n* = 151.

*Median (range); ** mean±SEM. CVD indicates cardiovascular disease; DMA, dimethylacetate; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

Table 5. Adjusted hazard ratios for cardiovascular mortality in patients divided into *CYBA* genotypes.

Variables	Adjusted relative risk (95% CI)	P-value
Age, years	1.10 (1.06-1.14)	<0.0001
Gender, female	1.32 (0.71-2.45)	0.37
Diabetes Mellitus	5.1 (2.78-9.36)	<0.0001
<i>CYBA</i> genotype	2.14 (1.18-3.89)	0.012

Figure 1: Kaplan Meier survival analysis for cardiovascular mortality in patients divided according to *MPO* genotypes.

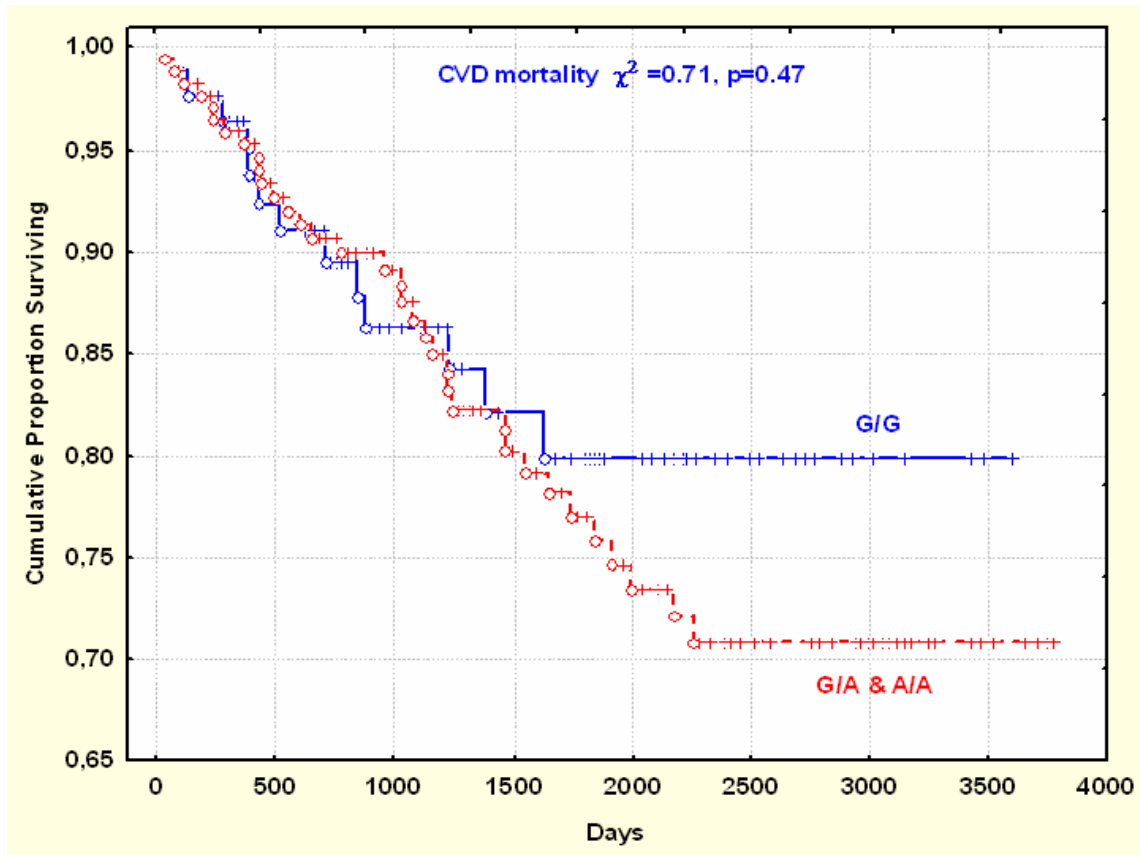
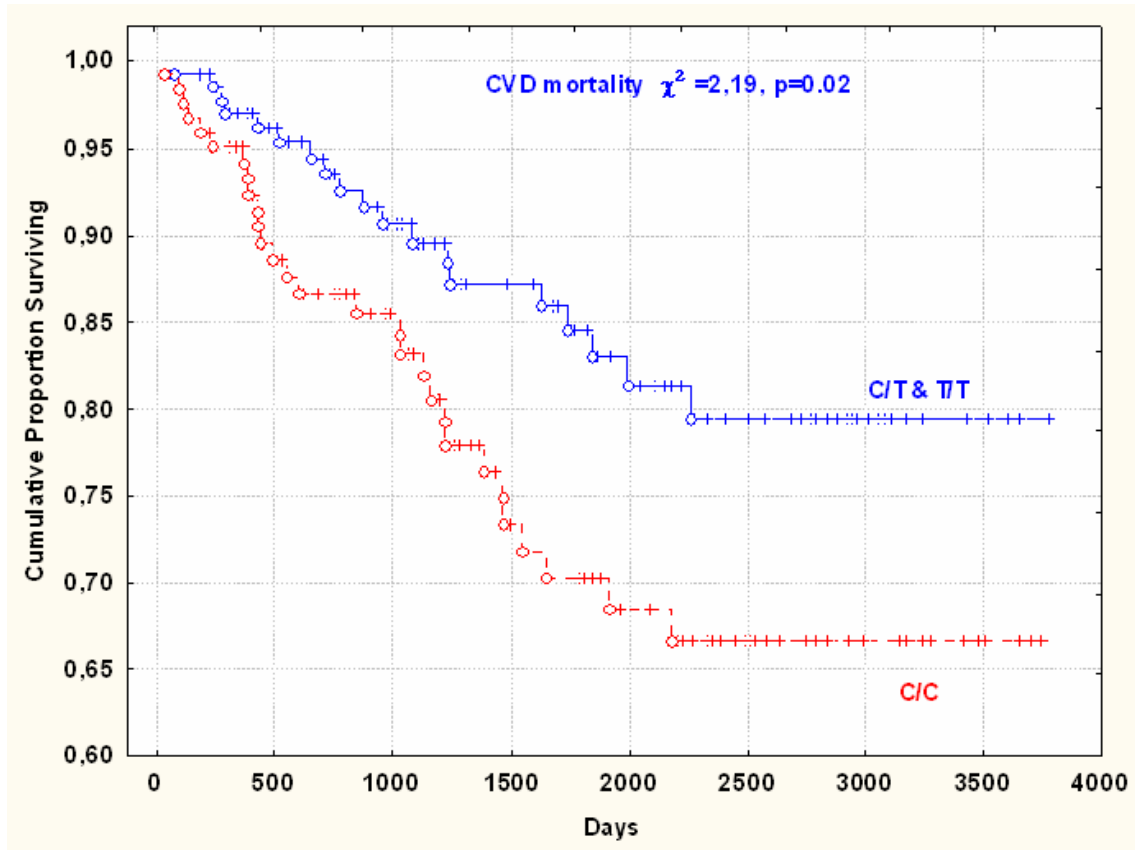


Figure 2: Kaplan Meier survival curve for cardiovascular mortality in patients divided according to *CYBA* genotypes.



References

1. Foley RN, Parfrey PS. Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *J Nephrol* 1998;11(5):239-45.
2. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351(13):1296-305.
3. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(1):29-38.
4. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7):1927-39.
5. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002;62(5):1524-38.
6. Mosyagin I, Dettling M, Roots I, Mueller-Oerlinghausen B, Cascorbi I. Impact of myeloperoxidase and NADPH-oxidase polymorphisms in drug-induced agranulocytosis. *J Clin Psychopharmacol* 2004;24(6):613-7.
7. Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, Siest G, Visvikis S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(1):2-8.
8. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996;271(24):14412-20.
9. Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Marchlewska A, Heimbürger O, Barany P, Hoff CM, et al. A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney Int Suppl* 2003(84):S172-6.
10. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(26):14483-8.
11. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 2000;102(15):1744-7.

12. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulträ F, Diczfalussy U, Wang T, Berglund L, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;55(5):1899-911.
13. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(7):953-60.
14. Stenvinkel P, Holmberg I, Heimbürger O, Diczfalussy U. A study of plasmalogen as an index of oxidative stress in patients with chronic renal failure. Evidence of increased oxidative stress in malnourished patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(10):2594-600.
15. Björkhem I, Sisfontes L, Bostrom B, Kase BF, Blomstrand R. Simple diagnosis of the Zellweger syndrome by gas-liquid chromatography of dimethylacetals. *J Lipid Res* 1986;27(7):786-91.
16. Nordfors L, Jansson M, Sandberg G, Lavebratt C, Sengul S, Schalling M, et al. Large-scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by Pyrosequencing trade mark and validation against the 5'nuclease (Taqman((R))) assay. *Hum Mutat* 2002;19(4):395-401.
17. Vaziri ND, Oveisi F, Ding Y. Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int* 1998;53(6):1748-54.
18. Hasdan G, Benchetrit S, Rashid G, Green J, Bernheim J, Rathaus M. Endothelial dysfunction and hypertension in 5/6 nephrectomized rats are mediated by vascular superoxide. *Kidney Int* 2002;61(2):586-90.
19. Deng G, Vaziri ND, Jabbari B, Ni Z, Yan XX. Increased tyrosine nitration of the brain in chronic renal insufficiency: reversal by antioxidant therapy and angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(9):1892-9.
20. Shaikin-Kestenbaum R, Caruso C, Berlyne GM. Reduced superoxide dismutase activity in erythrocytes of dialysis patients: a possible factor in the etiology of uremic anemia. *Nephron* 1990;55(3):251-3.
21. Durak I, Akyol O, Basesme E, Canbolat O, Kavutcu M. Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1994;66(1):76-80.

22. Eschbach JW, Adamson JW. Anemia of end-stage renal disease (ESRD). *Kidney Int* 1985;28(1):1-5.
23. Turi S, Nemeth I, Vargha I, Matkovics B, Dobos E. Erythrocyte defense mechanisms against free oxygen radicals in haemodialysed uraemic children. *Pediatr Nephrol* 1991;5(2):179-83.
24. 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(1):437-44.
25. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 1997;99(9):2075-81.
26. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002;296(5577):2391-4.
27. 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(2):336-9.
28. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? *Acta Haematol* 2000;104(1):10-5.
29. Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, et al. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 1999;100(14):1494-8.
30. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999;99(15):2027-33.
31. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000;86(9):E85-90.
32. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86(5):494-501.

33. Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reactive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp* 1995;61:33-45.
34. Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1991;69(5):1293-300.
35. Aviram M, Rosenblat M, Etzioni A, Levy R. Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism* 1996;45(9):1069-79.
36. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92(4):1866-74.
37. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98(11):2572-9.
38. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74(6):1141-8.
39. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998;32(3):488-95.
40. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271(38):23317-21.
41. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997;275(5306):1649-52.

42. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995;270(5234):296-9.
43. Hiraoka W, Vazquez N, Nieves-Neira W, Chanock SJ, Pommier Y. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J Clin Invest* 1998;102(11):1961-8.
44. Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ. A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res* 2000;86(4):391-5.
45. Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 1999;145(2):315-23.
46. Li A, Prasad A, Mincemoyer R, Satorius C, Epstein N, Finkel T, et al. Relationship of the C242T p22phox gene polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *Am J Med Genet* 1999;86(1):57-61.
47. Saha N, Sanghera DK, Kamboh MI. The p22 phox polymorphism C242T is not associated with CHD risk in Asian Indians and Chinese. *Eur J Clin Invest* 1999;29(12):999-1002.
48. Renner W, Schallmoser K, Gallippi P, Krauss C, Toplak H, Wascher TC, et al. C242T polymorphism of the p22 phox gene is not associated with peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 2000;152(1):175-9.
49. Mata-Balaguer T, de la Herran R, Ruiz-Rejon C, Ruiz-Rejon M, Garrido-Ramos MA, Ruiz-Rejon F. Angiotensin-converting enzyme and p22(phox) polymorphisms and the risk of coronary heart disease in a low-risk Spanish population. *Int J Cardiol* 2004;95(2-3):145-51.
50. Kirk EA, Dinauer MC, Rosen H, Chait A, Heinecke JW, LeBoeuf RC. Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(6):1529-35.
51. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85(8):753-66.
52. Zhang C, Yang J, Jacobs JD, Jennings LK. Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature:

implications for vascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(6):H2563-72.

53. Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, et al. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22 PHOX gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke* 2000;31(4):936-9.
54. Cai H, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL. NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur J Clin Invest* 1999;29(9):744-8.

CONCLUSÃO

Em resumo, nosso estudo demonstrou que variações genéticas comuns no sistema NADPH/MPO estão associadas com risco elevado de doença cardiovascular, sinais de estresse oxidativo e conferem um risco aumentado de mortalidade cardiovascular em um grupo de pacientes com doença renal crônica. Estes dados fornecem suporte epidemiológico para a hipótese de que o aumento do estresse oxidativo está associado com doença cardiovascular aterosclerótica em pacientes renais crônicos. Concluimos que variações genéticas no sistema NADPH/MPO estão associadas com estresse oxidativo, presença de DCV, e mortalidade DCV-relacionada em pacientes com DRC e levantamos a hipótese de que isto se deve a efeitos diretos na geração de estresse oxidativo, sugerindo que estes genótipos podem ser de interesse clínico em futuros ensaios clínicos de intervenções antioxidativas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Algumas informações geradas neste estudo merecem uma reflexão crítica. Devemos ressaltar que este é um estudo de associação entre os polimorfismos 242C/T CYBA (gene codificador da subunidade p22phox da NADPH) e -463G/A do promotor da MPO em relação a níveis circulantes de marcadores de estresse oxidativo, a prevalência de DCV clinicamente detectável, e mortalidade por doença cardiovascular em um grupo de 257 pacientes caucasianos (Suecos, da região de Estocolmo) com doença renal crônica de estágio 5, avaliados do ponto de vista laboratorial e genotípico ao iniciarem a terapia de reposição da função renal. A frequência genotípica observada nos pacientes deste estudo para as variantes do polimorfismo do gene MPO e do CYBA foram respectivamente, GG:0,67; GA:0,3 e AA:0,03 e, CC:0,48; CT:0,43 e TT:0,09, sendo que a frequência dos alelos raros tanto do MPO (A:0,18) quanto do CYBA (T:0,31) foi similar ou um pouco menor do que a frequência destes alelos em outras populações caucasianas previamente descrita, como por exemplo, A:0,20(40) e T:0,33(38).

Primeiramente, chama atenção a dificuldade de comprovação de funcionalidade dos polimorfismos em estudos clínicos com um número substancial de pacientes analisados. No presente estudo, não foi possível mensurar diretamente a atividade da NADPH oxidase e da MPO ou a expressão de seus RNAs mensageiros. A evidência de que as variações genotípicas em questão afetam a funcionalidade destas enzimas foi baseada em estudos de modelos *in vitro* previamente realizados por outros grupos (21, 32). A falta de comprovação de funcionalidade observada em nosso estudo pode ser uma limitação, porque não nos permite excluir a possibilidade de que os SNPs CYBA C242T e MPO -463G/A estejam em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos de seus respectivos genes ou de genes vizinhos. Neste caso, outros polimorfismos poderiam na realidade estar afetando o padrão de transcrição ou a própria atividade da enzima, ao invés de serem diretamente os SNPs aqui analisados. Em estudos futuros poderão ser utilizadas também outras ferramentas, como a análise de expressão em tecidos (por imunohistoquímica e Western blotting) e a manipulação *in vitro* da sequência de DNA (utilizando DNA plasmidial e vetores de expressão) que tem sido estratégias usadas para analisar a funcionalidade de um SNP. Da mesma forma, o uso de

outros marcadores genéticos que possam cobrir de forma mais ampla a região do genoma relacionada ao gene poderá trazer informação adicional ao nosso trabalho.

O estresse oxidativo parece estar intimamente ligado com a fisiopatologia da doença cardiovascular (41), especialmente em situações de produção elevada de radicais livres e de baixa capacidade antioxidante como na DRC (42). A combinação do nível de atividade da NADPH oxidase e da MPO, por representar o maior sistema oxidativo de neutrófilos, pode gerar uma grande variação na quantidade de oxidantes. Por isso, mesmo pequenas variações genéticas funcionais que afetam a expressão gênica destas enzimas (como no caso a alteração estrutural por SNPs), podem estar relacionadas com níveis plasmáticos de marcadores de estresse oxidativo e com o desenvolvimento de complicações a ele ligadas. Em nosso estudo analisamos três diferentes marcadores de estresse oxidativo: a pentosidina, o plasmalogênio eritrocitário (DMA 16/C16:0) e a 8-hidroxi-2'deoxiguanosina (8-OHdG), mas estes marcadores bioquímicos não pareceram ser eficazes para nos dar uma medida direta do estresse oxidativo, embora não exista na literatura um consenso sobre um marcador específico de estresse oxidativo. Surpreendentemente neste estudo, não se encontrou diferença nos marcadores de estresse oxidativo entre os genótipos da MPO, apesar da diferença na prevalência de DCV. O estresse oxidativo ser um processo altamente localizado e sujeito a alterações muito rápidas, é uma possível explicação para isto. Também pode ser que os métodos utilizados não puderam refletir precisamente os efeitos em longo prazo da atividade aumentada da MPO em lesões ateroscleróticas. Talvez somente com a iniciação da diálise este fator apareça. Além disso, muitos dados são disponíveis em apenas um subgrupo de pacientes. Ainda fica uma indefinição sobre qual seria o melhor marcador de estresse oxidativo, bem como também está indefinida a melhor forma de se avaliar a funcionalidade dos SNPs analisados. Também seria interessante a avaliação do estresse oxidativo em medições periódicas (e em diferentes fases da doença) para identificar verdadeiramente a funcionalidade das variações genéticas.

Outro ponto a ser enfatizado é a diferença dos achados entre a análise transversal e longitudinal observada em nosso estudo. Em uma análise transversal, foram verificadas diferenças significativas na prevalência de DCV entre os genótipos da MPO, porém para o polimorfismo *CYBA* C242T não foi constatada uma associação entre a presença do alelo T e a prevalência de doença cardiovascular. Já sob um ponto de vista longitudinal, o *CYBA* C242T foi o único polimorfismo a influenciar significativamente a análise da sobrevida, onde se

observou um aumento significativo no risco de mortalidade cardiovascular em pacientes homocigóticos para o alelo C, mesmo depois de ajustes para idade, sexo e DM. Esta diferença nos resultados das análises para os dois polimorfismos pode ser atribuída ao fato de que ainda são desconhecidas as reações específicas de cada um dos genes analisados em nosso estudo a estímulos diferentes. É possível que na trajetória da progressão da DRC, fatores presentes nesta fase da doença possam gerar respostas específicas de uma enzima com impacto na prevalência da DCV na avaliação basal. Na fase analisada no seguimento prospectivo destes pacientes (avaliação de mortalidade) outros fatores de geração de estresse oxidativo estarão presentes, e é possível que outro sistema enzimático seja relevante na dependência de um estímulo específico. Especialmente na resposta do organismo à terapia dialítica, outros fatores podem ser mais relevantes à ativação de outra via de geração de estresse oxidativo.

Na DRC o estresse oxidativo é aparentemente de causa multifatorial, incluindo resistência insulínica, inflamação crônica, hipertensão não controlada e tratamento dialítico, bem como através de infecções agudas e crônicas e da administração parenteral excessiva de ferro, e por isto, é de se esperar que um SNP, mesmo com comprovada funcionalidade em uma via fisiopatológica inerente à doença, tenha um impacto pequeno em uma doença complexa como a DRC, diferentemente do que ocorre em desordens monogênicas, ou mesmo em doenças complexas com menor número de fatores fisiopatológicos envolvidos. Ainda assim, encontramos aspectos fundamentais realizando estudos de associação como este para doenças poligênicas ou complexas, por exemplo, sob um ponto de vista da genética podemos citar a possibilidade de se ter uma estratificação de risco utilizando genética de populações, compreender o funcionamento da interação de vias fisiopatológicas e aplicações da genômica funcional, e futuramente poder utilizar conhecimentos produzidos por estes estudos talvez em aplicações clínicas mais diretas através da farmacogenômica.

REFERÊNCIAS

1. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins Pathologic Basis of Disease. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1994.
2. Foley RN, Parfrey PS. Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *J Nephrol* 1998;11(5):239-45.
3. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, et al. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2000;58(1):353-62.
4. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
5. Yao Q, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. *Scand J Urol Nephrol* 2004;38(5):405-16.
6. Lewin B. Genes VII. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda; 2001.
7. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002;62(5):1524-38.
8. Vaziri ND, Oveisi F, Ding Y. Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int* 1998;53(6):1748-54.
9. Hasdan G, Benchetrit S, Rashid G, Green J, Bernheim J, Rathaus M. Endothelial dysfunction and hypertension in 5/6 nephrectomized rats are mediated by vascular superoxide. *Kidney Int* 2002;61(2):586-90.
10. Deng G, Vaziri ND, Jabbari B, Ni Z, Yan XX. Increased tyrosine nitration of the brain in chronic renal insufficiency: reversal by antioxidant therapy and angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(9):1892-9.
11. Eschbach JW, Adamson JW. Anemia of end-stage renal disease (ESRD). *Kidney Int* 1985;28(1):1-5.
12. Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1997;417(1):150-2.

13. Tarng DC, Huang TP, Wei YH, Liu TY, Chen HW, Wen Chen T, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000;36(5):934-44.
14. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000;28(12):1717-25.
15. Engelmann B, Brautigam C, Thiery J. Plasmalogen phospholipids as potential protectors against lipid peroxidation of low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204(3):1235-42.
16. Ford DA, Gross RW. Plasmenylethanolamine is the major storage depot for arachidonic acid in rabbit vascular smooth muscle and is rapidly hydrolyzed after angiotensin II stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(10):3479-83.
17. Stenvinkel P, Holmberg I, Heimbürger O, Diczfalussy U. A study of plasmalogen as an index of oxidative stress in patients with chronic renal failure. Evidence of increased oxidative stress in malnourished patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(10):2594-600.
18. Brosche T, Platt D, Knopf B. Decreased concentrations of serum phospholipid plasmalogens indicate oxidative burden of uraemic patients undergoing haemodialysis. *Nephron* 2002;90(1):58-63.
19. Mosyagin I, Dettling M, Roots I, Mueller-Oerlinghausen B, Cascorbi I. Impact of myeloperoxidase and NADPH-oxidase polymorphisms in drug-induced agranulocytosis. *J Clin Psychopharmacol* 2004;24(6):613-7.
20. Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, Siest G, Visvikis S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(1):2-8.
21. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996;271(24):14412-20.
22. 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(1):437-44.
23. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 1997;99(9):2075-81.

24. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002;296(5577):2391-4.
25. 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(2):336-9.
26. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta Haematol* 2000;104(1):10-5.
27. Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Marchlewska A, Heimbürger O, Barany P, Hoff CM, et al. A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney Int Suppl* 2003(84):S172-6.
28. Griendling KK, Ushio-Fukai M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med* 1998;132(1):9-15.
29. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(26):14483-8.
30. Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, et al. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 1999;100(14):1494-8.
31. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271(38):23317-21.
32. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 2000;102(15):1744-7.
33. Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1998;97(2):135-7.
34. Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 1999;145(2):315-23.

35. Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ. A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res* 2000;86(4):391-5.
36. Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, et al. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22 PHOX gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke* 2000;31(4):936-9.
37. Renner W, Schallmoser K, Gallippi P, Krauss C, Toplak H, Wascher TC, et al. C242T polymorphism of the p22 phox gene is not associated with peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 2000;152(1):175-9.
38. Cai H, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL. NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur J Clin Invest* 1999;29(9):744-8.
39. Schachinger V, Britten MB, Dimmeler S, Zeiher AM. NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur Heart J* 2001;22(1):96-101.
40. Cascorbi I, Henning S, Brockmoller J, Gephart J, Meisel C, Muller JM, et al. Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant--463A of the myeloperoxidase gene. *Cancer Res* 2000;60(3):644-9.
41. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(1):29-38.
42. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7):1927-39.