

Estresse Oxidativo e Disfunção Endotelial na Doença Renal Crônica

Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease

Valeria Costa-Hong¹, Luiz Aparecido Bortolotto¹, Vanda Jorgetti², Fernanda Consolim-Colombo¹, Eduardo M Krieger¹, Jose Jayme Galvão de Lima¹

Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração (InCor)¹; Disciplina de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo², São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se pela alta prevalência de aterosclerose. Uma vez que o estresse oxidativo e a disfunção endotelial são promotores da aterosclerose, é interessante verificar se as duas condições estão associadas em pacientes com DRC, ainda sem doença cardiovascular (DCV) clínica.

Objetivo: Avaliar as relações entre o estresse oxidativo e a função endotelial em pacientes com DRC estágio 5, sem DCV.

Métodos: Foram estudados 22 pacientes com DRC, não-diabéticos, não-fumantes, sem DCV e tratados por hemodiálise; além de 22 indivíduos normais. Em todos os indivíduos foram avaliados a reatividade vascular, dependente e independente de endotélio (ultra-som de alta resolução da artéria braquial), e o estresse oxidativo (níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS).

Resultados: A reatividade vascular dependente de endotélio ($6,0 \pm 4,25\%$ vs. $11,3 \pm 4,46\%$, $p < 0,001$) e a reatividade independente de endotélio ($11,9 \pm 7,68\%$ vs. $19,1 \pm 6,43\%$, $p < 0,001$) foram reduzidas na DRC, enquanto o estresse oxidativo ($2,63 \pm 0,51$ vs. $1,49 \pm 0,43$, $p < 0,001$) foi aumentado. Os níveis de TBARS, quando utilizado na totalidade de indivíduos do estudo (pacientes e controles), correlacionaram-se com a reatividade vascular dependente de endotélio ($r = -0,56$, $p < 0,001$) e com a pressão arterial sistólica ($r = 0,48$, $p = 0,002$).

Conclusão: O estresse oxidativo é associado à disfunção endotelial. Pacientes com DRC apresentam aumento do estresse oxidativo e comprometimento da reatividade vascular. Os resultados sugerem ainda que o estresse oxidativo e a disfunção endotelial podem estar envolvidos na susceptibilidade exagerada da DRC às complicações cardiovasculares. (Arq Bras Cardiol 2009;92(5):413-418)

Palavras-chave: Estresse oxidativo, aterosclerose, falência renal crônica, insuficiência renal, diálise renal.

Summary

Background: Chronic kidney disease (CKD) is characterized by the high prevalence of atherosclerosis. Considering that endothelial dysfunction and oxidative stress are promoters of atherosclerosis, it is of interest to verify whether the two conditions are associated in CKD patients still free of clinical cardiovascular disease (CVD).

Objective: To evaluate the association between oxidative stress and endothelial function in end-stage CKD patients without clinically evident CVD.

Methods: We studied 22 nondiabetic, nonsmoker CKD patients without clinical CVD treated by maintenance hemodialysis and 22 healthy controls. Endothelium-dependent and independent vascular reactivity and oxidative stress, as determined by the plasma levels of thiobarbituric acid-reactive substances – TBARS, were evaluated in all subjects.

Results: Endothelium-dependent (6.0 ± 4.25 vs. $11.3 \pm 4.46\%$, $p < 0.001$) and endothelium-independent (11.9 ± 7.68 vs. $19.1 \pm 6.43\%$, $p < 0.001$) vascular reactivity were reduced, while TBARS (2.63 ± 0.51 vs. 1.49 ± 0.42 nmols/mL) was increased in CKD patients when compared to controls. TBARS levels were significantly related to endothelium-dependent vascular reactivity ($r = -0.56$, $p < 0.001$) and to systolic blood pressure ($r = -0.48$, $p = 0.002$).

Conclusion: Oxidative stress is increased in CKD patients free of CVD and is associated with endothelial dysfunction in patients and controls. The results suggest that oxidative stress and endothelial dysfunction may be involved in the increased susceptibility of CKD patients to CVD and cardiovascular complications. (Arq Bras Cardiol 2009;92(5):381-386)

Key words: Oxidative stress; atherosclerosis; kidney failure chronic; renal insufficiency; renal dialysis.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Luiz Aparecido Bortolotto •

Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração (InCor) - Rua Enéas Carvalho Aguiar, 44, 05.403-000, São Paulo, SP - Brasil

E-mail: luiz.bortolotto@incor.usp.br, luizab@cardiol.br

Artigo recebido em 16/07/08; revisado recebido em 27/08/08; aceito em 04/09/08

Introdução

O estresse oxidativo é definido como um dano tissular causado pelo desequilíbrio entre os fatores pró e antioxidantes. Ele está presente em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogênico em muitas dessas condições. Um dos principais efeitos do estresse oxidativo é a redução da atividade biológica do NO¹. Este efeito se expressa através da disfunção endotelial, que, por sua vez, é considerado um precursor da aterosclerose².

A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se por um estado de vasculopatia generalizada, acompanhada por uma elevada mortalidade cardiovascular, causada, sobretudo, pela aterosclerose³. Uma vez que a disfunção endotelial está envolvida na gênese da aterosclerose, e que o estresse oxidativo pode causar esta disfunção, é interessante verificar se as duas condições estão associadas em pacientes com DRC, ainda sem doença cardiovascular (DCV) clínica. Esta abordagem pode permitir a identificação precoce dos pacientes com maior risco de sofrer complicações futuras.

O objetivo desta investigação foi avaliar as possíveis relações entre o estresse oxidativo e a disfunção endotelial em um grupo de pacientes com DRC avançada (estágio 5), livres de DCV clinicamente evidente.

Métodos

Os participantes (pacientes e controles) assinaram o termo de consentimento informado e a investigação foi aprovada pela Comissão de Ética da instituição. Os pacientes foram selecionados no Ambulatório de Osteodistrofia Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e encaminhados ao Instituto do Coração (InCor) para avaliação cardiovascular.

Foram estudados 22 pacientes com DRC, tratados por hemodiálise, de ambos os sexos e com fístula arteriovenosa para acesso vascular para diálise apenas em um dos membros superiores. Os critérios de exclusão foram os seguintes: diabetes; câncer; doença cardiovascular clinicamente evidente; tabagismo; doença hepática ou da tireóide; uso de anticoncepcional ou de drogas para o tratamento de dislipidemia; antecedentes de infarto do miocárdio; acidente vascular cerebral; revascularização miocárdica ou vascular periférica; transplante renal e paratiroidectomia.

Avaliação clínica e laboratorial

Todos os pacientes foram submetidos a uma avaliação cardiovascular e laboratorial abrangente que incluiu radiografia de tórax, ecocardiograma bi-dimensional e eletrocardiograma em repouso. A doença arterial coronária foi investigada e excluída, em todos os casos, pela cintilografia miocárdica com estresse farmacológico com dipiridamol. O colesterol (total e frações), triglicerídeos, albumina, hematócrito e creatinina foram determinados por métodos convencionais.

O estresse oxidativo foi avaliado no plasma pela determinação, através do método colorimétrico, dos produtos da peroxidação de lípidos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). As determinações das TBARS foram

realizadas no Laboratório de Pesquisa Básica em Doença Renal (LIM 12, Disciplina de Nefrologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). A ação das espécies reativas de oxigênio sobre os lípidos leva à produção de várias substâncias, que reagem com o ácido tiobarbitúrico e podem ser dosadas por espectrofotometria. As amostras de plasma foram tratadas por ácido tricloroacético antes da adição de ácido tiobarbitúrico a 0,6%. A densidade ótica do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria e a concentração dos produtos de peroxidação lipídica foi então calculada. Os níveis de TBARS foram expressos em nanomoles/mL⁴.

A Tabela 1 contém os principais dados clínicos e laboratoriais dos pacientes.

Hemodiálise

Os pacientes vinham sendo tratados por hemodiálise por períodos que variavam de 17 a 148 meses (mediana de 67 meses) através de fístula arteriovenosa, três vezes por semana, durante 4 horas.

Medicação

O tratamento baseou-se na redução da ingestão de alimentos ricos em fósforo e na prescrição de calcitriol e sevelamer, além de suplementos de cálcio. Do total, 44% dos pacientes estavam fazendo uso de quelantes de fósforo a base de cálcio, 42% utilizavam sevelamer, 27% tomavam calcitriol e 7% usavam desferal. A medicação anti-hipertensiva baseou-se

Tabela 1 – Características clínicas, laboratoriais, demográficas e valores da avaliação da reatividade vascular e da anatomia e função das grandes artérias dos pacientes e controles

Variável	Pacientes	Controles	p
Número	22	22	
Idade (anos)	42,8 ± 12	40 ± 10,3	0,15
Sexo masculino n (%)	12 (55)	12 (55)	0,33
Caucasóides n (%)	10 (45)	13 (59)	0,52
Afro-brasileiros n (%)	12 (55)	9 (31)	0,45
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	24 ± 4,0	24,7 ± 3,5	0,79
Pressão sistólica (mmHg)	152 ± 33	118 ± 12	0,001
Pressão diastólica (mmHg)	91 ± 17	77 ± 1	0,002
Vasodilatação mediada pelo fluxo (%)	6,00 ± 4,25	11,30 ± 4,46	< 0,001
Vasodilatação endotélio independente (%)	11,9 ± 7,68	19,10 ± 6,43	0,001
TBARS* (nmoles/ml)	2,63 ± 0,51	1,49 ± 0,43	< 0,001
Creatinina (mg/100ml)	10,3 ± 3,7	-	-
Albumina (g/100ml)	4,3 ± 0,3	-	-
Colesterol mg/100ml)	177,7 ± 58	-	-
Triglicerídeos (mg/100ml)	138 ± 82	-	-
Hematócrito (%)	34 ± 4	-	-

* Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

no uso dos inibidores do sistema renina-angiotensina, beta-bloqueadores e inibidores de canais de cálcio, isoladamente ou combinados em, respectivamente, 48%, 44% e 48% dos pacientes. Toda medicação, inclusive a hipotensora, foi suspensa quatro dias antes dos testes.

Avaliação da função endotelial

Os testes foram realizados no período da manhã, após jejum de oito horas, com o indivíduo em repouso, posicionado em decúbito horizontal, em um ambiente calmo, com monitorização eletrocardiográfica e da pressão arterial. A vasodilatação mediada por fluxo (VMF, dependente do endotélio) e a resposta do músculo liso vascular ao vasodilatador nitroglicerina (independente do endotélio) foram avaliadas de forma seqüencial na artéria braquial, no membro contralateral ao da fístula arteriovenosa utilizada na diálise. Os testes foram realizados de acordo com as diretrizes da *International Brachial Artery Reactivity Task Force* (versão 2002)⁵. A artéria braquial foi acessada acima da prega do cotovelo. Em seguida, o diâmetro da artéria foi verificado por aparelho de ultra-sonografia (*Sequoia Echocardiography System, version 6.0, Acuson, Siemens, Ca, USA*), equipado com um transdutor linear de alta resolução (7-12 MHz) e acoplado a um computador especificamente programado para gravar e analisar esse tipo de dado. Foram então selecionadas para análise seis imagens para cada fase do teste coincidindo com a onda R do eletrocardiograma. Os dados foram obtidos em condições basais, depois da indução da hiperemia reativa e após a administração, por aerossol oral, de 0,45 mg de nitroglicerina (*Natrispray; Procter & Gamble Pharmaceuticals, France*). O grau de vasodilatação obtido foi expresso como porcentagem em relação aos valores basais.

As amostras de sangue foram colhidas e todos os exames foram realizados de 20 a 30 horas depois de uma sessão de diálise, em um dia entre duas sessões consecutivas de diálise.

Controles

O grupo controle foi composto por 22 indivíduos normais, que não usavam qualquer medicação e não eram tabagistas. Os controles foram submetidos à avaliação da reatividade vascular na artéria braquial e do estresse oxidativo, observando os mesmos protocolos utilizados nos pacientes.

Estatística

Os resultados são expressos como: média \pm desvio padrão da média, mediana e porcentagens. O valor do $p < 0,05$ foi considerado significativo. As variáveis foram comparadas pelos testes do t de Student, qui-quadrado e análise de covariância (ANCOVA), quando apropriado. As correlações foram verificadas pela análise de correlação de Pearson. Inicialmente, as seguintes variáveis foram avaliadas no modelo univariado: idade; sexo; raça; duração da diálise; índice de massa corpórea; pressões arteriais, sistólica e diastólica; hematócrito e níveis de TBARS; albumina; colesterol total e triglicérides. As variáveis selecionadas pelo modelo univariado foram então testadas em modelo multivariado (regressão logística) para verificar os fatores independentemente associados com as alterações na função

e estrutura vascular. Todos os cálculos foram realizados em um programa estatístico SPSS, versão 10.0.

Resultados

A Tabela 1 mostra as principais características demográficas e clínicas e os valores da reatividade vascular dos pacientes e controles. Idade, sexo, raça e índice de massa corpórea foram semelhantes nos dois grupos. Por outro lado, as pressões arteriais sistólica e diastólica foram mais elevadas nos pacientes.

Reatividade vascular

Tanto a VMF, dependente de endotélio ($6,0 \% \pm 4,3 \%$ vs. $11,3 \% \pm 4,5 \%$; $p < 0,001$), como a vasodilatação independente de endotélio ($11,9 \% \pm 7,7 \%$ vs. $19,1 \% \pm 6,4 \%$; $p < 0,001$) foram reduzidas em comparação aos valores observados nos controles (Tabela 1 e Figura 1). Nos pacientes, os valores obtidos foram cerca de 50% menores que os observados nos controles.

O estresse oxidativo, determinado pela concentração plasmática das TBARS, foi significativamente mais elevado nos pacientes que nos controles ($2,63 \pm 0,51$ vs. $1,49 \pm 0,43$, $p < 0,001$, Tabela 1 e Figura 2).

Na análise univariada (Tabela 2), verificamos que a idade ($r = -0,365$, $p = 0,04$) foi o único preditor da disfunção endotelial nos pacientes. A relação observada foi inversa, isto é, a vasodilatação mediada por fluxo foi reduzida em proporção a idade. Níveis de TBARS, bem como todas as demais variáveis testadas, não se correlacionaram com a VMF. Já a vasodilatação independente de endotélio, avaliada pela resposta ao vasodilatador de ação direta, correlacionou-se unicamente com a VMF ($r = 0,483$, $p < 0,01$). Este resultado sugere que a redução observada na VMF foi devida, primariamente, à disfunção endotelial, e não apenas à incapacidade do músculo vascular em responder a vasodilatadores.

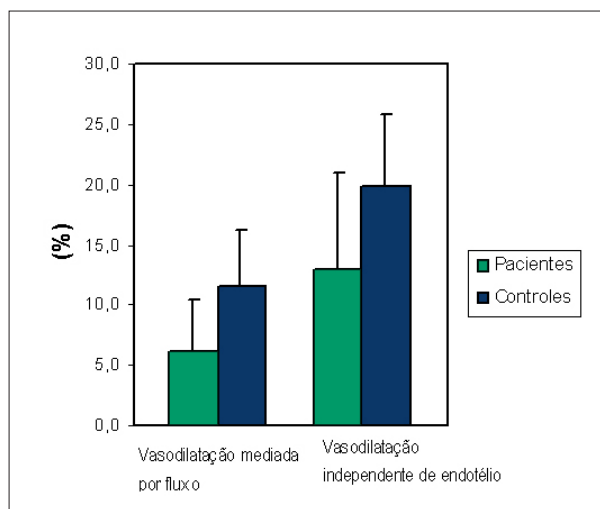


Fig. 1 - Vasodilatação mediada por fluxo e vasodilatação independente de endotélio em pacientes com DRC (n= 22) e controles (n= 22). Diferenças entre os grupos $p < 0,001$.

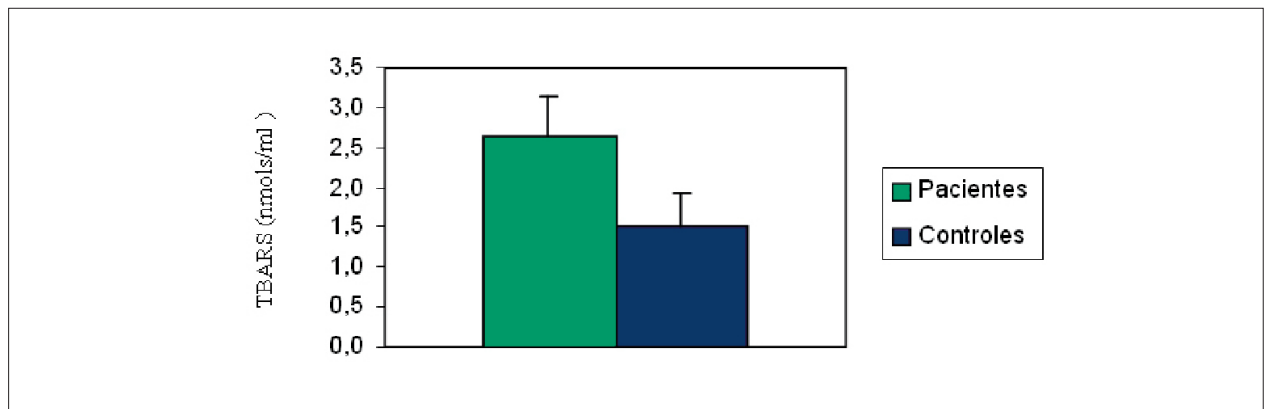


Fig. 2 - Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico em Pacientes com DRC (n=22) e Controles (n= 22). Diferença entre os grupos < 0,001.

Tabela 2 – Correlações entre variáveis clínicas e laboratoriais e vasodilatação mediada por fluxo e vasodilatação independente de endotélio nos pacientes

Variável	Vasodilatação mediada por fluxo		Vasodilatação independente de endotélio	
	r	p	r	p
Idade (anos)	-0,365	0,04	-0,61	0,75
Sexo masculino	-0,155	0,404	-0,252	0,17
Duração da diálise (meses)	-0,189	0,32	-0,154	0,41
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	-0,250	0,18	-0,009	0,96
Pressão arterial sistólica (mmHg)	-0,242	0,19	-0,148	0,42
Pressão arterial diastólica (mmHg)	-0,166	0,37	-0,166	0,37
TBARS* (nmoles/ml)	-0,140	0,54	-0,015	0,95
Albumina (g/100ml)	-0,126	0,515	-0,022	0,91
Colesterol total (mg/100ml)	0,027	0,885	0,020	0,91
Triglicérides (mg/100ml)	0,046	0,805	0,304	0,10
Hematócrito (%)	-0,50	0,793	-0,058	0,76

* Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Fatores como sexo, raça, duração da diálise, índice de massa corpórea, pressões arteriais sistólica e diastólica, hematócrito e níveis de TBARS, albumina, colesterol total e triglicérides não se correlacionaram com a vasodilatação dependente e independente de endotélio nos pacientes. Por outro lado, fazendo uso da totalidade dos indivíduos do estudo (pacientes e controles) observamos, na análise univariada (Tabela 3), que o estresse oxidativo se correlacionou negativamente com a vasodilatação mediada por fluxo ($p < 0,001$) e com a vasodilatação independente de endotélio ($p = 0,004$). Houve também correlações positivas com as pressões sistólica e diastólica. No entanto, na análise multivariada (Tabela 4, Figura 3), apenas a vasodilatação mediada por fluxo ($p = 0,001$) e a pressão arterial sistólica ($p = 0,001$) permaneceram no modelo.

Tabela 3 – Correlações entre espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com dados clínicos e variáveis vasculares de pacientes e controles analisados em conjunto (n = 44)

Variável	TBARS	
	r	P
Vasodilatação mediada pelo fluxo (%)	-0,56	< 0,001
Vasodilatação endotélio independente (%)	-0,44	0,004
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	0,35	0,84
Idade (anos)	0,05	0,74
Pressão arterial sistólica (mmHg)	0,48	0,002
Pressão arterial diastólica (mmHg)	0,44	0,004

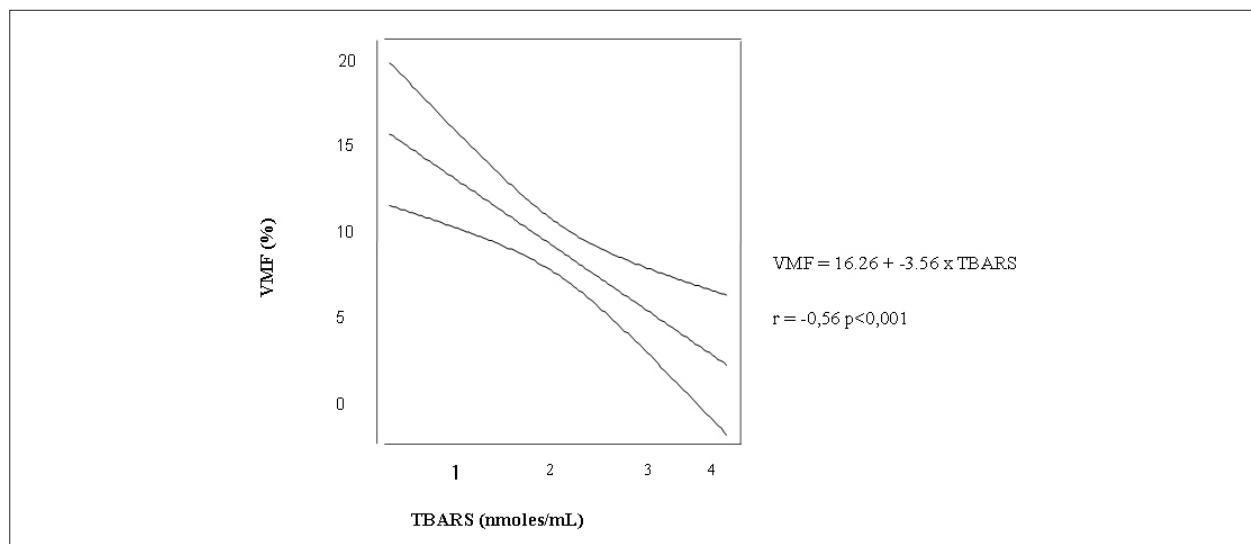


Fig. 3 - Relação da VMF e TBARS.

Tabela 4 – Variáveis associadas à concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no conjunto de pacientes e controles (n= 44) (regressão logística)

	Qui-quadrado	F	P
Vasodilatação mediada pelo fluxo (%)	5,12	11,8	0,001
Pressão arterial sistólica (mmhg)	6,85	8,6	0,001

Discussão

O resultado mais interessante deste trabalho foi a observação da relação inversa entre o estresse oxidativo e a vasodilatação mediada por fluxo dependente de endotélio. Esta correlação, no entanto, só foi observada quando analisamos conjuntamente os pacientes e os controles. Nos pacientes, não detectamos correlações significativas entre o estresse oxidativo e a reatividade vascular, apesar do estresse oxidativo ser mais elevado nos pacientes que nos controles. Interpretamos este resultado negativo como uma consequência da pouca variabilidade dos valores individuais do TBARS em torno do valor médio. Isto pode significar que, em pacientes com DRC avançada, o estresse oxidativo atinge níveis máximos e que outros fatores passam a desempenhar um papel preponderante na disfunção endotelial, embora não seja excluída necessariamente a participação do estresse oxidativo⁶. Finalmente, a ausência de correlação entre o estresse oxidativo e a vasodilatação independente de endotélio, na análise multivariada, está de acordo com a hipótese de que a redução da reatividade vascular nos indivíduos estudados (pacientes e controles) foi devida, primariamente, à disfunção endotelial com a participação do estresse oxidativo⁷⁻⁹.

Outros fatores também devem ser lembrados como

possíveis responsáveis pela redução da reatividade vascular nos nossos pacientes. A dimetilarginina assimétrica (ADMA), cujos níveis são elevados na DRC, interfere com a geração de NO via inibição competitiva com a enzima NO-sintase^{8,10}. Uma inflamação crônica, com elevação de fatores como a proteína C reativa e várias citocinas, também ocorre na DRC e interfere com a função endotelial^{11,12}. Entretanto, não temos dados para verificar a participação destes fatores na presente investigação.

A disfunção endotelial é, atualmente, considerada um marcador precoce de aterosclerose e de doença cardiovascular em geral¹³⁻¹⁵. No nosso trabalho, mostramos que a vasodilatação mediada por fluxo é comprometida em pacientes com DRC sem doença aterosclerótica sistêmica ou coronária. Os dados permitem especular que esta alteração pode ser, em parte, causada pelo estresse oxidativo, tal como já foi demonstrado na população geral¹². Se este é o caso, manobras destinadas a reduzir ou controlar o estresse oxidativo poderiam influenciar o prognóstico destes pacientes, especialmente aqueles ainda livres de lesões ateroscleróticas significativas.

Este trabalho tem algumas limitações. O número de pacientes é relativamente pequeno, utilizamos apenas um marcador de estresse oxidativo e não avaliamos outros fatores potencialmente envolvidos na disfunção endotelial. No entanto, a principal virtude do trabalho reside no fato de termos estudado uma população homogênea de não diabéticos onde a doença cardiovascular foi investigada em profundidade. Por este motivo, podemos afirmar, com razoável segurança, que as alterações observadas foram devidas, primariamente, a DRC, e não a co-morbidades.

Em suma, o trabalho confirma existência de comprometimento da reatividade vascular em pacientes com DRC e sugere que este fenômeno é causado pela uremia, e não por outras condições associadas. O comprometimento da reatividade vascular,

embora envolva a vasodilatação dependente e independente de endotélio, parece ser devido, primariamente, à disfunção endotelial, e o estresse oxidativo está provavelmente envolvido neste processo.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Valéria Aparecida da Costa Hong pela Universidade de São Paulo – Instituto do Coração.

Referências

1. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42: 1149-60.
2. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 168-75.
3. 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: 1296-305.
4. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-8.
5. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 257-65.
6. London GM, Pannier B, Agharazii M, Guerin AP, Verbeke FH, Marchais SJ. Forearm reactive hyperemia and mortality in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2004; 65: 700-4.
7. Ghiadoni L, Cupisti A, Huang Y, Mattei P, Cardinal H, Favilla S, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in chronic renal failure. *J Nephrol.* 2004; 17: 512-9.
8. Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Sonmez A, Ozgurtas T, et al. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47: 42-50.
9. Siems W, Quast S, Carluccio F, Wiswedel I, Hirsch D, Augustin W, et al. Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. *Clin Nephrol.* 2002; 58 (Suppl 1): S12-9.
10. Kocak H, Gumuslu S, Ermis C, Mahsereci E, Sahin E, Gocmen AY, et al. Oxidative stress and asymmetric dimethylarginine is independently associated with carotid intima media thickness in peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol.* 2008; 28: 91-6.
11. Annuk M, Soveri I, Zilmer M, Lind L, Hulthe J, Fellstrom B. Endothelial function, CRP and oxidative stress in chronic kidney disease. *J Nephrol.* 2005; 18: 721-6.
12. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 2747-52.
13. Patel AR, Kuvin JT, Sliney KA, Rand WM, Chiang JC, Udelson JE, et al. Gender-based differences in brachial artery flow-mediated vasodilation as an indicator of significant coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005; 96: 1223-6.
14. Perrone-Filardi P, Cuocolo A, Brevetti G, Silvestro A, Storto G, Dellegrottaglie S, et al. Relation of brachial artery flow-mediated vasodilation to significant coronary artery disease in patients with peripheral arterial disease. *Am J Cardiol.* 2005; 96: 1337-41.
15. Kamycheva E, Sundsfjord J, Jorde R. Serum parathyroid hormone levels predict coronary heart disease: the Tromso Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2004; 11: 69-74.