

Valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y de peroxidación lipídica en pacientes con insuficiencia cardiaca

Miguel Rivera^a, Esther Roselló-Lletí^a, Fernando García de Burgos^b, Vicente Bertomeu^c, Rafael Payá^d, Raquel Cortés^a, Luís Martínez-Dolz^e, Alejandro Jordán^b, Jose L. Pérez-Boscá^d, Antonio Salvador^e, Francisco Marín^f, Francisco Sogorb^f, Ricardo Valero^c, Vicente Miró^e y Manuel Portolés^g

^aUnidad de Cardiología. Centro de Investigación Hospital La Fe. Valencia. España.

^bUnidad de Cardiología. Hospital de Elche. Alicante. España.

^cUnidad de Cardiología. Hospital San Juan. Alicante. España.

^dUnidad de Cardiología. Hospital General. Valencia. España.

^eUnidad de Cardiología. Hospital La Fe. Valencia. España.

^fUnidad de Cardiología. Hospital General. Alicante. España.

^gUnidad de Biología y Patología Celular. Centro de Investigación Hospital La Fe. Valencia. España.

Introducción y objetivos. La insuficiencia cardiaca está asociada con un incremento en la producción de radicales libres, llegando al estado de estrés oxidativo. Se conocen diversos marcadores de estrés oxidativo, como la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, marcador del daño oxidativo en el ADN, y la peroxidación lipídica que permite cuantificar el daño en las estructuras ricas en lípidos. El propósito de este estudio es comparar los valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y de peroxidación lipídica en pacientes con insuficiencia cardiaca y sujetos sanos, y evaluar la influencia de la etiología.

Métodos. Estudiamos a 78 pacientes (57 varones, edad 64 ± 14 años) diagnosticados de insuficiencia cardiaca y a 12 controles. Los pacientes completaron un cuestionario y fueron clasificados de acuerdo con la New York Heart Association. Se les realizó un estudio eco-Doppler y extracción de sangre. Medimos las concentraciones de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y de peroxidación lipídica.

Resultados. Al comparar los valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y peroxidación lipídica entre pacientes y controles obtuvimos diferencias significativas ($0,34 \pm 0,54$ frente a $0,04 \pm 0,07$ ng/ml, $p < 0,05$ y 18 ± 10 frente a 8 ± 3 mol/l, $p < 0,01$, respectivamente). Cuando comparamos las concentraciones de los 2 marcadores según la etiología de la insuficiencia cardiaca encontramos diferencias significativas en ambos ($p < 0,05$), que fueron mayores en la miocardiopatía hipertensiva.

Conclusiones. Los valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y peroxidación lipídica se encuentran aumentados en los pacientes con insuficiencia cardiaca al compararlos con los controles. El incremento más importante lo encontramos en pacientes con miocardiopatía hipertensiva.

Palabras clave: Estrés oxidativo. Insuficiencia cardiaca. Radicales libres.

8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and Lipid Peroxidation in Patients With Heart Failure

Introduction and objectives. Heart failure is associated with increased free radical production, which leads to a state of oxidative stress. Known markers of oxidative stress include 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, which reflects oxidative damage to DNA, and lipid peroxidation, which can be used to quantify damage to lipid-rich structures. The aims of this study were to compare 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and lipid peroxidation levels in heart failure patients and healthy subjects and to assess how these levels are influenced by heart failure etiology.

Methods. The study included 78 patients (57 male, age $64 [14]$ years) with heart failure and 12 control subjects. Patients completed a questionnaire and were graded according to the New York Heart Association classification. Doppler echocardiography was performed and blood samples were obtained. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and lipid peroxidation levels were determined.

Results. Significant differences were observed between patients and control subjects in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and lipid peroxidation levels, at $0.34 (0.54)$ ng/mL vs $0.04 (0.07)$ ng/mL ($P < .05$), and $18 (10)$ M vs $8 (3)$ M ($P < .01$), respectively. Subsequent analysis showed that heart failure etiology had a significant effect on the levels of the two markers ($P < .05$), which were highest in patients with hypertensive cardiomyopathy.

Conclusions. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and lipid peroxidation were higher in heart failure patients than in control subjects. The most significant increases were found in patients with hypertensive cardiomyopathy.

Key words: Oxidative stress. Heart failure. Free radicals.

Este Proyecto ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III, Proyecto FIS 01/0943.

Correspondencia: Dr. M. Rivera Otero.
José María Haro, 59, puerta 59. 46022 Valencia. España.
Correo electrónico: rivera_jmi@gva.es

Recibido el 1 de febrero de 2006.

Aceptado para su publicación el 22 de junio de 2006.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

ABREVIATURAS

EO: estrés oxidativo.
 ERO: especies reactivas del oxígeno.
 IC: insuficiencia cardíaca.
 LPO: peroxidación lipídica.
 RL: radicales libres.
 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

INTRODUCCIÓN

La insuficiencia cardíaca constituye un síndrome clínico complejo caracterizado por la activación de diversos sistemas neurohormonales y mediadores proinflamatorios^{1,2}.

Diversos estudios han descrito que el estrés oxidativo (EO), a través de la producción de radicales libres (RL), desempeña un papel importante en la fisiopatología y la evolución de la insuficiencia cardíaca³⁻⁵. En este sentido, las especies reactivas del oxígeno (ERO) desempeñarían un papel clave en la génesis y la progresión de la enfermedad coronaria, la necrosis tisular en el marco del infarto de miocardio y la disfunción contráctil^{6,7}. Además, el incremento de estas especies está asociado con daño en el ADN mitocondrial^{8,9} y nuclear¹⁰.

Las ERO, entre los que se incluyen el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($-OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), son productos del metabolismo. Sistemas antioxidantes enzimáticos, como la enzima superóxido dismutasa, y no enzimáticos, como el urato o la ceruloplasmina, mantienen esas especies reactivas en bajas concentraciones en condiciones normales. El EO sobreviene cuando se produce un cambio en este equilibrio a favor de los RL¹¹.

En este contexto, varias moléculas se han erigido como biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo: la peroxidación lipídica (LPO) y la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)¹²⁻¹⁴. La LPO es un marcador de oxidación de los ácidos grasos que ya ha sido estudiado anteriormente en otros trabajos sobre insuficiencia cardíaca⁴. La 8-OHdG es una nueva molécula útil como marcador de daño oxidativo en el material genético y que se ha postulado como un marcador sensible y específico de daño oxidativo en el ADN^{15,16}. Sin embargo, no se dispone de ningún estudio en el que se compare la capacidad de estos biomarcadores en la insuficiencia cardíaca. Se han publicado diferencias en los parámetros de función endotelial y activación inmunológica según la causa de la insuficiencia cardíaca¹⁷. En este trabajo nosotros hipotetizamos que, en una cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca, el nivel de EO podría tener relación con el diagnóstico etiológico.

De esta manera, en nuestro estudio hemos comparado los valores de LPO y 8-OHdG en controles y pacientes con insuficiencia cardíaca, y hemos evaluado la influencia de la etiología en sus concentraciones plasmáticas.

MÉTODOS

Pacientes

Se incluyó en la población de estudio a 78 pacientes consecutivos diagnosticados de insuficiencia cardíaca¹⁸ (57 varones, edad 64 ± 14 años) y 12 controles con similar edad y sexo, que fueron remitidos desde las consultas de medicina interna a la consulta de cardiología, donde tras el estudio de antecedentes clínicos, electrocardiográfico, ecocardiográfico y bioquímico similar al que se realizó a los enfermos de insuficiencia cardíaca, se comprobó que podían ser utilizados como tales. A cada participante se le realizaron exploración física, electrocardiograma, estudio eco-Doppler, radiografía de tórax y extracción de sangre para el análisis hematológico y bioquímico. Los diagnósticos cardiológicos fueron: miocardiopatía isquémica (39%), miocardiopatía dilatada (42%) y miocardiopatía hipertensiva (19%).

Los pacientes fueron clasificados funcionalmente según la New York Heart Association¹⁹ y recibieron tratamiento médico según las pautas de la European Society of Cardiology¹⁸: el 74% con diuréticos, el 73% con inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA), el 51% con bloqueadores beta, el 42% con antialdosterónicos, el 26% con digoxina, el 10% con antagonistas del calcio y el 16% con antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II). Ningún paciente tomaba de forma regular vitaminas A, E o C. Todos los pacientes recibían tratamiento médico estable al menos un mes antes de su inclusión en el estudio, con el fin de evitar el posible efecto de cambios farmacológicos.

La distribución de los tratamientos en las 3 etiologías fue la siguiente: en el grupo con miocardiopatía isquémica, un 11% recibía tratamiento con ARA-II, un 83% con IECA, un 57% con bloqueadores beta y un 76% con diuréticos. En el grupo con miocardiopatía dilatada, un 21% recibía tratamiento con ARA-II, un 78% con IECA, un 46% con bloqueadores beta y un 82% con diuréticos. En el grupo con miocardiopatía hipertensiva, un 14% recibía tratamiento con ARA-II, un 57% con IECA, un 50% con bloqueadores beta y un 64% con diuréticos.

Los sujetos con fibrilación auricular, síndromes coronarios agudos, enfermedad hepática crónica o aguda, infecciones crónicas, enfermedad renal o enfermedad pulmonar obstructiva crónica fueron excluidos.

El estudio se realizó de acuerdo con las líneas directivas de la buena práctica clínica y las normas éticas

para la experimentación humana establecidas por la Declaración de Helsinki. Cada paciente dio su consentimiento informado por escrito para su inclusión en este estudio.

Estudio eco-Doppler

El estudio eco-Doppler se realizó con sistemas de ecocardiografía estándar equipados con transductores de 2,5 MHz. Se obtuvieron proyecciones apicales y paraesternales. Los registros ecocardiográficos y los trazados Doppler fueron grabados en cintas de vídeo para ser analizados posteriormente de manera centralizada y de forma ciega al resto de determinaciones mediante un sistema computarizado (Eco-Dat, Software de Medicina S.A.).

Se utilizó el método de área-longitud para el cálculo de la fracción de eyección (FE) del ventrículo izquierdo²⁰. Mediante Doppler pulsado se midió la velocidad máxima temprana del flujo transmitral (onda E) y se calculó el tiempo de deceleración.

Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Las muestras sanguíneas fueron extraídas por venopunción. Se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min, los sueros a temperatura ambiente y los plasmas a 4 °C, se alicuotaron y se congelaron a -80 °C.

La concentración en suero de 8-OHdG se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA (Bioxytech® 8-OHdG-EIA™ kit). Los resultados se expresaron en nanogramos/mililitro (ng/ml). La determinación plasmática de LPO se realizó mediante un ensayo basado en una reacción colorimétrica (Bioxytech® LPO-560™). Los resultados se expresan en micromoles/litro (mol/l).

Análisis estadístico

Los datos de las variables cuantitativas se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (DE). Se estudió la normalidad de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el test de la U de Mann-Withney para comparar los valores de 8-OHdG y LPO entre pacientes y controles. Para comparar los valores de los marcadores de estrés oxidativo según la etiología se empleó el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis. Se consideraron como umbral de significación estadística los valores de $p < 0,05$. Para todos los análisis de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS 11,5 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

RESULTADOS

Las características clínicas y funcionales de los pacientes estudiados se muestran en la tabla 1. Para toda

TABLA 1. Características clínicas de los pacientes

Variables	Pacientes (n = 78)
Sexo varón (%)	73
Edad (años)	64 $\pm$ 14
PAS (mmHg)	127 $\pm$ 20
FC (lat/min)	78 $\pm$ 13
HDL (mg/dl)	45 $\pm$ 13
Colesterol total (mg/dl)	192 $\pm$ 44
Hematocrito (%)	42 $\pm$ 6
Fumadores (%)	10
Hipertensión (%)	51
Diabetes (%)	37
NYHA (%)	
I	9
II	70
III	21
FE (%)	35 $\pm$ 12
Tiempo de deceleración (ms)	197 $\pm$ 79
Marcadores de estrés oxidativo	
8-OHdG (ng/ml)	0,34 $\pm$ 0,54
LPO (mol/l)	18 $\pm$ 10

FC: frecuencia cardíaca; FE: fracción de eyección; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LPO: peroxidación lipídica; NYHA: New York Heart Association; PAS: presión arterial sistólica; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

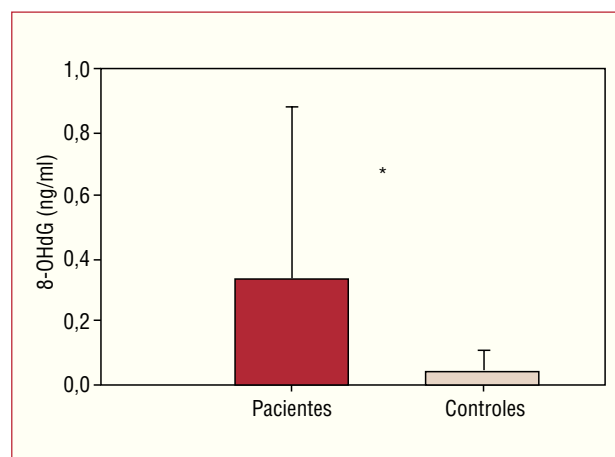


Fig. 1. En este gráfico se muestran los valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en pacientes con insuficiencia cardíaca y sujetos controles. 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

* $p < 0,05$.

Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar.

la población de enfermos de insuficiencia cardíaca, los valores de 8-OHdG fueron $0,34 \pm 0,54$ ng/ml, y los que obtuvimos para la peroxidación lipídica fueron 18 ± 10 mol/l.

Cuando comparamos los valores de 8-OHdG obtenidos en los sujetos con insuficiencia cardíaca con los calculados en sujetos sanos, obtuvimos una cifra significativamente mayor para el grupo de pacientes ($0,34 \pm 0,54$ frente a $0,04 \pm 0,07$ ng/ml; $p < 0,05$) (fig. 1). Hemos comparado también los valores de la peroxidación lipídica en pacientes con insuficiencia cardíaca y

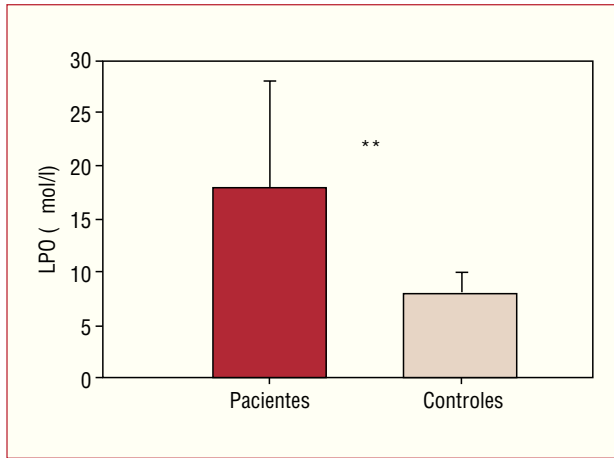


Fig. 2. Valores de LPO en pacientes con insuficiencia cardíaca y sujetos controles.

LPO: peroxidación lipídica.

**p < 0,01.

Los datos representan la media ± desviación estándar.

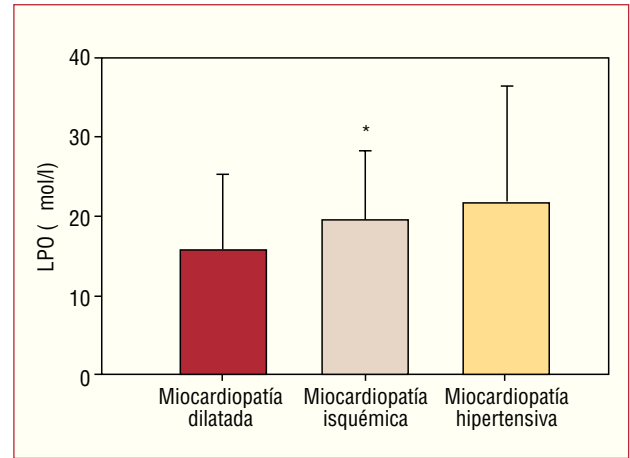


Fig. 4. Valores de peroxidación lipídica (LPO) en las 3 etiologías, miocardiopatía dilatada, isquémica e hipertensiva.

*p < 0,05.

Los datos representan la media ± desviación estándar.

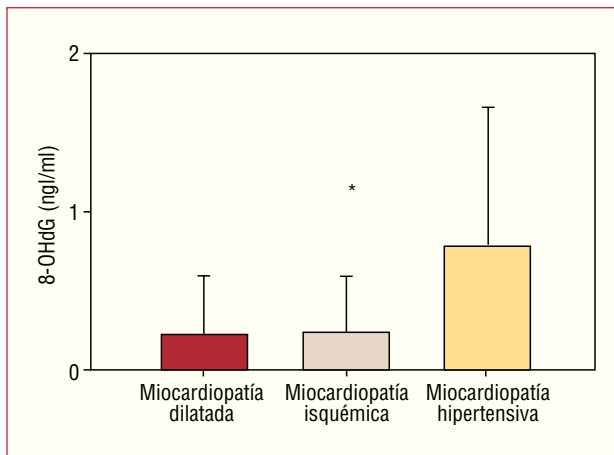


Fig. 3. Valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en los 3 diagnósticos etiológicos, miocardiopatía dilatada, isquémica e hipertensiva.

*p < 0,05.

Los datos representan la media ± desviación estándar.

sujetos control, obteniendo asimismo valores más elevados en el grupo de pacientes (18 ± 10 frente a 8 ± 3 mol/l; p < 0,01) (fig. 2).

Posteriormente comparamos las concentraciones de 8-OHdG en los 3 grupos etiológicos, miocardiopatía dilatada ($0,22 \pm 0,38$ ng/ml), miocardiopatía isquémica ($0,25 \pm 0,35$ ng/ml) y miocardiopatía hipertensiva ($0,78 \pm 0,87$ ng/ml), y obtuvimos también una diferencia significativa de p < 0,05 (fig. 3), básicamente a expensas de un importante incremento en el grupo de pacientes con miocardiopatía hipertensiva. Finalmente, comparamos también los valores de la peroxidación lipídica en los 3 grupos diagnósticos de nuestra serie, miocardiopatía dilatada ($15,8 \pm 9,4$ mol/l), miocar-

diopatía isquémica ($19,5 \pm 8,8$ mol/l) y miocardiopatía hipertensiva ($21,6 \pm 14,6$ mol/l), obteniéndose también una diferencia significativa de p < 0,05 (fig. 4).

DISCUSIÓN

Los RL son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desemparejado en el orbital externo, lo que les da una configuración espacial que genera inestabilidad. Son extraordinariamente reactivos y de vida media corta. Los RL son elaborados continuamente como productos del metabolismo normal de las células y se inactivan por un conjunto de mecanismos cuya función es que RL y antioxidantes se equilibren en modo tal que se minimice y se retarde la aparición de daños. Las más conocidas de estas ERO son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($-OH$)²¹.

El aumento o la disminución de las concentraciones fisiológicas de ERO puede dar lugar a importantes alteraciones funcionales. Las mitocondrias son las fuentes principales de RL²², que normalmente van produciéndose en cantidades que son controladas por los mecanismos de defensa celulares. En situaciones patológicas como el cáncer²³, la diabetes²⁴, las enfermedades degenerativas^{25,26} o las enfermedades cardiovasculares^{27,28}, esta producción se incrementa sustancialmente y/o hay una deficiencia en los mecanismos antioxidantes, llegando al estado de EO en el que se produce daño celular. La difusión anormal del oxígeno en un miocardio hipertrófico genera un déficit energético progresivo que se vincula con los mecanismos moleculares del EO en condiciones de isquemia/reperusión^{29,30}. Hay evidencias que indican la participación del EO en la fisiopatología de la hipertensión arterial y sus complicaciones³¹.

Debido a la alta inestabilidad atómica de los RL, cuando colisionan con una biomolécula le sustraen un átomo de H⁺ dejándola oxidada y produciéndose a continuación una serie de reacciones en cadena que hacen que determinadas moléculas pierdan su función específica en la célula. Cuando esto ocurre en las membranas lipídicas celulares, la oxidación de un ácido graso lo convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula. Este proceso es conocido como LPO y permite cuantificar la concentración de los lípidos hidroperoxidados, productos de esa peroxidación²¹.

Otra molécula dañada por los RL es el ADN. El daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que puede originar el desarrollo de mutaciones y daño funcional. Como respuesta a este daño, hay una reparación del ADN y en ese proceso se produce 8-OHdG, que también puede usarse como marcador de estrés oxidativo³².

En nuestro estudio, los pacientes con insuficiencia cardíaca presentan unas concentraciones significativamente mayores de 8-OHdG y de LPO respecto al grupo control. Estos valores están en concordancia con los obtenidos por otros grupos^{4,33}. Además, también hemos observado que hay diferencias en los valores de estos 2 marcadores de EO para los 3 diagnósticos etiológicos, miocardiopatía dilatada, isquémica e hipertensiva, y que los valores son mayores en pacientes con diagnóstico etiológico de miocardiopatía hipertensiva para ambos marcadores.

Todo esto pone de manifiesto que en los pacientes con insuficiencia cardíaca hay un incremento tanto de LPO como de daño en el ADN. Estos procesos parecen estar más marcados en los pacientes con etiología hipertensiva. En este contexto, la administración de antioxidantes podría tener un papel en estos enfermos de insuficiencia cardíaca³⁴⁻³⁷, aunque la administración de ciertas vitaminas resulta controvertida^{38,39}.

Una limitación de nuestro estudio podría ser el hecho de que las clases funcionales más deterioradas no están muy representadas en nuestro grupo, ya que la mayoría de nuestros pacientes se encuentra en clase funcional II. Aun así, hay un porcentaje relevante de pacientes en clase funcional III (21%) que podría considerarse suficientemente representativo. Por otra parte, sólo un 19% del total presenta etiología hipertensiva. Sin embargo, aun así obtenemos significación estadística al comparar los 3 grupos etiológicos.

Los estrictos criterios de exclusión de nuestro estudio favorecen la consecución de los objetivos planteados. Sin embargo, dado que algunas de las enfermedades excluidas se asocian con frecuencia con el síndrome de insuficiencia cardíaca, podría pensarse que los resultados obtenidos se alejan de lo que se observa en la práctica clínica diaria. Creemos, sin embargo, que aun así, el conocimiento que se aporta sobre esta área en este trabajo tiene un valor fisiopatológico estimable.

El hecho de que el tratamiento no sea exactamente igual en las diferentes etiologías podría influir en el cálculo. Sin embargo, hemos comprobado que no hay diferencias significativas entre pacientes tratados y no tratados con ARA-II, IECA o bloqueadores beta.

Otro aspecto que cabe considerar es que la medida de la función ventricular es más precisa mediante la resonancia magnética, como se ha publicado⁴⁰. Sin embargo, el que nuestros análisis hayan sido realizados de una manera centralizada por un cardiólogo habituado a las medidas eco-Doppler y la variabilidad nos hace confiar en la validez de nuestros resultados.

CONCLUSIONES

Las concentraciones 8-OHdG y de LPO se encuentran aumentadas en los pacientes con insuficiencia cardíaca al compararlas con las del grupo control. Al evaluar la influencia de la etiología, observamos diferencias significativas, obteniéndose los valores más elevados de ambos marcadores de estrés oxidativo en los pacientes con miocardiopatía hipertensiva. Debe valorarse la incorporación del cálculo de estos parámetros a las determinaciones que se realizan en enfermos con este síndrome por sus potenciales consecuencias terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bolger AP, Sharma R, Li W, Leenarts M, Kalra PR, Kemp M, et al. Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circulation*. 2002;106:92-9.
2. Sirera R, Salvador A, Roldán I, Talens R, González-Molina A, Rivera M. Quantification of proinflammatory cytokines in the urine of congestive heart failure patients. Its relationship with plasma levels. *Eur J Heart Fail*. 2003;5:27-31.
3. Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2004;109:544-9.
4. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1352-6.
5. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J*. 1991;65:245-8.
6. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 2005;115:500-8.
7. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*. 1999;85:357-63.
8. Siles E, Martínez-Lara E, Núñez MI, Muñoz-Gómez JA, Martín-Oliva D, Valenzuela MT, et al. PARP-1-dependent 3-nitrotyrosine protein modification after DNA damage. *J Cell Biochem*. 2005;96:709-15.
9. Liu CS, Tsai CS, Kuo CL, Chen HW, Lii CK, Ma YS. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res*. 2003;37:1307-17.

10. Kouda K, Nakamura H, Fan W, Horiuchi K, Takeuchi H. The relationship of oxidative DNA damage marker 8-hydroxydeoxyguanosine and glycoxidative damage marker pentosidine. *Clin Biochem.* 2001;34:247-50.
11. Pérez O, Castro P, Díaz-Araya G, Nettle D, Moraga F, Chiong M, et al. Persistencia del estrés oxidativo postrasplante cardíaco: estudio comparativo entre pacientes con trasplante cardíaco y con insuficiencia cardíaca crónica estable. *Rev Esp Cardiol.* 2002; 55:831-7.
12. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCI(4) poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2005;38:698-710.
13. Bergam V, Leanderson P, Starkhammar H, Tagesson C. Urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde after high dose radiochemotherapy preceding stem cell transplantation. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:300-6.
14. Sanguini V, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Nadia T, Saliola M, et al. CD4 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:35-42.
15. Farhanghooe H, Khan ZA, Mukherjee S, Cukiernik M, Barbin YP, Karmazyn M, et al. Heme oxygenase in diabetes-induced oxidative stress in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:1439-48.
16. Morita H, Ikeda H, Haramaki N, Eguchi H, Imaizumi T. Only two-week smoking cessation improves platelet aggregability and intraplatelet redox imbalance of long-term smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:589-94.
17. Tentolouris C, Tousoulis D, Antoniadis C, Bosinakou E, Kotso-poulou M, Trikas A, et al. Endothelial function and proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2004;94:301-5.
18. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2005;26:1115-40.
19. Cohn JN. The management of chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1996;335:490-8.
20. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989;2:358-67.
21. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK. Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1993;30:55-67.
22. Gredilla R, Phaneuf S, Selman C, Kendaiah S, Leeuwenburgh C, Barja G. Short-term caloric restriction and sites of oxygen radical generation in kidney and skeletal muscle mitochondria. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1019:333-42.
23. Gackowski D, Kowalewski J, Siomek A, Olinski R. Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers. *Int J Cancer.* 2005;114:153-6.
24. Park KS, Kim JH, Kim MS, Kim JM, Kim SK, Choi JY, et al. Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 2001;50:2837-41.
25. Zhang W, Wang T, Qin L, Gao HM, Wilson B, Ali SF, et al. Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *FASEB J.* 2004;18:589-91.
26. Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegneri T, Mattioli P, Cattani M, et al. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002;59:794-8.
27. Akbas H, Ozden M, Kanko M, Maral H, Bulbul S, Yavuz S, et al. Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *J Int Med Res.* 2005;33:528-36.
28. Stokes KY, Granger DN. Hypercholesterolemia: its impact on ischemia-reperfusion injury. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2005;3:1061-70.
29. Zimiani K, Guarnier FA, Miranda HC, Watanabe MA, Cecchini R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide.* 2005;13:196-203.
30. Liu P, Xu B, Cavalieri TA, Hock CE. Attenuation of antioxidative capacity enhances reperfusion injury in aged rat myocardium after MI/R. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2719-27.
31. Parik T, Allikmets K, Teesalu R, Zilmer M. Oxidative stress and hyperinsulinaemia in essential hypertension: different facets of increased risk. *J Hypertens.* 1996;14:407-10.
32. Kinoshita A, Wanibuchi H, Imaoka S, Ogawa M, Masuda C, Morimura K, et al. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21 (WAF1/Cip1), cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis.* 2002;23:341-9.
33. Schulpis KH, Tsakiris S, Traeger-Synodinos J, Papassotiropoulos I. Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2005;38:239-42.
34. Godfraind T. Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360:2259-72.
35. Miranda KM, Nagasawa HT, Toscano JP. Donors of HNO. *Curr Top Med Chem.* 2005;5:649-64.
36. Dzhanashvili PKh, Vladyskaya OV, Salibegashvili NV. Efficiency and mechanisms of the antioxidant effect of standard therapy and refractin in the treatment of chronic heart failure in elderly patients with postinfarction cardiosclerosis. *Bull Exp Biol Med.* 2004;138:412-4.
37. Greenberg B. Nonselective versus selective beta-blockers in the management of chronic heart failure: clinical implications of the carvedilol or Metoprolol European Trial. *Rev Cardiovasc Med.* 2004;5 Suppl 1:10-7.
38. Erbs S, Gielen S, Linke A, Mobius-Winkler S, Adams V, Baither Y, et al. Improvement of peripheral endothelial dysfunction by acute vitamin C application: different effects in patients with coronary artery disease, ischemic, and dilated cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2003;146:280-5.
39. Tousoulis D, Antoniadis C, Vassiliadou C, Toutouza M, Pitsavos C, Tentolouris C, et al. Effects of combined administration of low dose atorvastatin and vitamin E on inflammatory markers and endothelial function in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2005;7:1126-32.
40. Eicken A, Fratz S, Gutfried C, Balling G, Schwaiger M, Lange R, et al. Hearts late after fontan operation have normal mass, normal volume, and reduced systolic function: a magnetic resonance imaging study. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1061-5.