



## ESTUDI DE L'ESTRÈS OXIDATIU I DEL PERFIL METABÒLIC DE MALALTS RENALS CRÒNICS NO DIALITZATS I DIALITZATS

**Mónica Muñoz Cortés**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Tesi doctoral:

# Estudi de l'estrès oxidatiu i del perfil metabòlic de malalts renals crònics no dialitzats i dialitzats

Mónica Muñoz Cortés

Directors de tesi: Dra. Marta Romeu Ferran  
Dr. Alberto Martínez Veá



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus  
2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DE L'ESTRÈS OXIDATIU I DEL PERFIL METABÒLIC DE MALALTS RENALS CRÒNICS  
NO DIALITZATS I DIALITZATS  
Mónica Muñoz Cortés



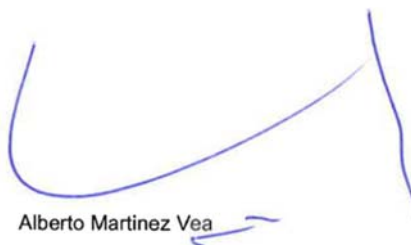
FEM CONSTAR que aquest treball, titulat “Estudi de l’estrès oxidatiu i del perfil metabòlic de malalts renals crònics no dialitzats i dialitzats”, que presenta Mónica Muñoz Cortés per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d’aquesta universitat.

Reus, 29 de Juliol de 2016

Els directors de la tesi doctoral



Marta Romeu Ferran



Alberto Martínez Vea

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DE L'ESTRÈS OXIDATIU I DEL PERFIL METABÒLIC DE MALALTS RENALS CRÒNICS  
NO DIALITZATS I DIALITZATS  
Mónica Muñoz Cortés

Vull agrair a la Universitat Rovira i Virgili que em concedís la beca predoctoral per poder realitzar aquest treball i a les Dres. Maria Rosa Nogués i Montse Giralt la seva acollida a la unitat i tot el suport que m'han donat. També als meus directors de tesi, els estic molt agraïda pel que m'han ensenyat i pel temps invertit.

Aquest treball ha estat fruit de moltes hores de laboratori i ordinador que no haurien sigut possible sense el vostre ajut Vane i Nuri. Sou unes grans companyes i amigues. També vull recordar les rialles i anècdotes amb Francesc, sempre disposat a ajudar i ensenyar, gràcies.

Sergi, gràcies per la paciència, gràcies per estar amb mi, gràcies per la serenitat i per tot el que em dones. A Maria i Antonio, gràcies pel vostre temps, sense ell no hagués pogut ser possible. També vull agrair als meus pares i al meu germà –«Siempre estás ahí. Os quiero muchísimo.»

I, finalment, vull dedicar aquest treball als meus tresors: Mariona i Pau, vosaltres també heu sigut part d'aquesta feina i, per això, us la vull dedicar. Heu canviat tant la meva vida que no la sabria viure sense vosaltres.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DE L'ESTRÈS OXIDATIU I DEL PERFIL METABÒLIC DE MALALTS RENALS CRÒNICS  
NO DIALITZATS I DIALITZATS  
Mónica Muñoz Cortés

# ÍNDIX

|  | Pàg. |
|--|------|
| Índex de figures i taules                        | 6    |
| Abreviatures                                     | 11   |
| <b>INTRODUCCIÓ</b>                               | 17   |
| 1. Malaltia renal crònica                        | 19   |
| 1.1 Fisiopatologia de la malaltia renal crònica  | 19   |
| Progressió i adaptació en la MRC                 | 19   |
| Complicacions metabòliques en la MRC             | 25   |
| - Equilibri àcid-base                            | 26   |
| - Metabolisme dels hidrats de carboni            | 27   |
| - Metabolisme de les proteïnes                   | 29   |
| - Metabolisme lipídic                            | 30   |
| 2. Alteracions concomitants a la MRC             | 32   |
| 2.1 Malaltia Cardiovascular                      | 32   |
| 2.2 Lesions de la substància blanca              | 34   |
| 3. Estrès oxidatiu i malaltia renal crònica      | 35   |
| 3.1 Estrès oxidatiu                              | 35   |
| 3.2 Estrès oxidatiu en la malaltia renal crònica | 42   |
| 4. Tractament de la malaltia renal crònica       | 44   |
| 4.1 Tractament farmacològic                      | 44   |
| 4.2 Hemodiàlisi                                  | 47   |
| 5. Metabolòmica i malaltia renal crònica         | 49   |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>HIPÒTESI I OBJECTIUS</b>                     | <b>57</b> |
| <b>MATERIAL I MÈTODES</b>                       | <b>61</b> |
| 1. Disseny de l'estudi                          | 63        |
| 1.1 Tipus d'estudi                              | 63        |
| 1.2 Ètica                                       | 63        |
| 2. Població d'estudi                            | 64        |
| 2.1 Voluntaris sans. Controls                   | 64        |
| 2.2 Malalts renals crònics no dialitzats        | 64        |
| 2.3 Malalts renals crònics dialitzats           | 65        |
| 3. Variables d'estudi                           | 66        |
| 3.1 Variables clíniques                         | 66        |
| 3.2 Extracció i processament de les mostres     | 66        |
| 3.3 Paràmetres d'estrès oxidatiu                | 68        |
| Determinació d'enzims antioxidants              | 68        |
| Catalasa  | 68        |
| Superòxid-dismutasa                             | 69        |
| Glutatió peroxidasa                             | 72        |
| Sistema glutatió: glutatió reduït i oxidat      | 73        |
| Capacitat antioxidant total                     | 76        |
| ORAC i ORAC NP                                  | 76        |
| FRAP  | 78        |
| Dany oxidatiu                                   | 80        |
| Carbonilació proteica                           | 80        |
| Oxidació de lípids. LDLox                       | 83        |
| 3.4 Perfil metabòlic                            | 85        |
| Preparació de la mostra                         | 85        |
| Ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-1H) | 86        |
| Identificació i quantificació de metabòlits     | 88        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4. Anàlisi estadística   | 89        |
| 4.1 Anàlisi de les variables d'EO i dades clíniques                          | 89        |
| 4.2 Anàlisi estadístic del perfil metabòlic                                  | 89        |
| <b>RESULTATS</b>   | <b>93</b> |
| 1. Flux de participants  | 95        |
| 1.1 Controls sans  | 95        |
| 1.2 Malalts renals crònics no dialitzats                                     | 96        |
| 1.3 Malalts renals crònics dialitzats  | 97        |
| 2. Dades demogràfiques   | 99        |
| 3. Resultats d'estrès oxidatiu   | 101       |
| 3.1 Diferències generals entre controls sans, MRC no dialitzats i dialitzats | 101       |
| Enzims antioxidants  | 101       |
| Sistema glutatió   | 103       |
| Capacitat antioxidant total  | 104       |
| Dany oxidatiu  | 106       |
| 3.2 Anàlisi de l'EO en funció de l'etiologia de la MRC                       | 108       |
| 3.3 Anàlisi de l'EO en funció de les alteracions concomitants de la MRC      | 111       |
| Hipertensió arterial   | 111       |
| Dislipèmia   | 114       |
| Malaltia cardiovascular  | 117       |
| Consum de tabac  | 120       |
| Lesió de la substància blanca  | 123       |
| 4. Resultats del perfil metabòlic  | 126       |
| 4.1 Diferències generals entre malalts renals crònics dialitzats i controls  | 126       |
| 4.2 Anàlisi del perfil metabòlic en funció de l'etiologia                    | 135       |

|  |            |
|--|------------|
| Etiologia vascular   | 135        |
| Etiologia glomerular   | 139        |
| Etiologia diabètica  | 142        |
| Etiologia intersticial-quística  | 145        |
| 4.3 Anàlisi del perfil metabolòmic en funció de les alteracions concomitants de la MRC                 | 148        |
| Hipertensió arterial   | 148        |
| Dislipèmia   | 150        |
| Malaltia cardiovascular  | 150        |
| Consum de tabac  | 150        |
| Lesió de la substància blanca  | 153        |
| 5. Correlació entre els paràmetres d'EO i els de metabolòmica  | 154        |
| <b>DISCUSSIÓ</b>   | <b>159</b> |
| 1. Discussió dels resultats d'EO   | 161        |
| 1.1 Discussió de les diferències generals  | 161        |
| 1.2 Discussió dels resultats de l'EO en funció de l'etiologia de la MRC                                | 170        |
| 1.3 Discussió dels resultats de l'EO en funció de les alteracions concomitants de la MRC               | 176        |
| 2. Discussió dels resultats del perfil metabolòmic   | 182        |
| 2.1 Discussió de les diferències generals  | 182        |
| 2.2 Discussió dels resultats del perfil metabolòmic en funció de l'etiologia de la MRC                 | 188        |
| 2.3 Discussió dels resultats del perfil metabolòmic en funció de les alteracions concomitants a la MRC | 190        |
| 3. Discussió de la correlació entre els paràmetres d'EO i els de metabolòmica                          | 190        |

|   |     |
|---|-----|
| 4. Fortaleses i limitacions de l'estudi | 192 |
| <b>CONCLUSIONS</b>                      | 195 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>                     | 201 |
| <b>ANNEX</b>                            | 231 |
| Articles publicats                      | 233 |

## ÍNDEX DE FIGURES I TAULES

| FIGURES   |   | Pàg. |
|-----------|---|------|
| Figura 1  | Mecanismes de progressió renal  | 21   |
| Figura 2  | Representació dels sistemes antioxidants cel·lulars i la seva localització  | 38   |
| Figura 3  | Fonament i procediment per a la determinació de la CAT  | 69   |
| Figura 4  | Fonament i procediment per a la determinació de la SOD  | 70   |
| Figura 5  | Fonament de la determinació de la GPx   | 72   |
| Figura 6  | Procediment per a la determinació de la GPx   | 73   |
| Figura 7  | Procediment i fonament per a la determinació del GSH i GSSG   | 75   |
| Figura 8  | Fonament de l'ORAC  | 77   |
| Figura 9  | Procediment per a la determinació de l'ORAC   | 78   |
| Figura 10 | Procediment i fonament de la tècnica del FRAP   | 79   |
| Figura 11 | Fonament i procediment per a la determinació del dany en proteïnes  | 82   |
| Figura 12 | Fonament tècnica ELISA per a la detecció de LDLox   | 84   |
| Figura 13 | Procediment d'extracció aquosa i lipídica dels sèrums per a la determinació metabòlica  | 86   |
| Figura 14 | Diagrama de flux dels voluntaris sans   | 95   |
| Figura 15 | Diagrama de flux dels MRCs no dialitzats  | 96   |
| Figura 16 | Diagrama de flux dels MRCs dialitzats   | 97   |
| Figura 17 | Representació dels resultats dels enzims antioxidants dels MRCs no dialitzats i els MRCs dialitzats respecte del grup control | 102  |

|                  |   |            |
|------------------|---|------------|
| <b>Figura 18</b> | Representació dels resultats del sistema glutatió dels MRCs no dialitzats i els MRCs dialitzats respecte del grup control   | <b>103</b> |
| <b>Figura 19</b> | Representació dels resultats de les proves de capacitat antioxidant total dels MRCs no dialitzats i els MRCs dialitzats respecte del grup control                         | <b>105</b> |
| <b>Figura 20</b> | Representació gràfica dels resultats dels paràmetres d'EO en funció de l'etiologia dels MRCs no dialitzats i els MRCs dialitzats respecte del grup control en percentatge | <b>110</b> |
| <b>Figura 21</b> | Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats amb HTA respecte dels que no en tenen   | <b>113</b> |
| <b>Figura 22</b> | Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats amb dislipèmia versus sense dislipèmia  | <b>116</b> |
| <b>Figura 23</b> | Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats amb MCV versus sense MCV  | <b>119</b> |
| <b>Figura 24</b> | Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats fumadors i exfumadors respecte del grup no fumador, respectivament  | <b>122</b> |
| <b>Figura 25</b> | Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats amb LSB respecte dels no LSB  | <b>125</b> |
| <b>Figura 26</b> | Mapa de tendència de les diferències en els aminoàcids detectats entre el grup de MRCs dialitzats i el grup control   | <b>128</b> |
| <b>Figura 27</b> | Resultats PCA per als aminoàcids analitzats entre el grup de MRCs dialitzats i el grup control  | <b>129</b> |
| <b>Figura 28</b> | Mapa de tendència de les diferències en els metabòlits entre el grup de MRCs dialitzats i el grup control   | <b>130</b> |
| <b>Figura 29</b> | Resultats PCA per als metabòlits  | <b>132</b> |
| <b>Figura 30</b> | Mapa de tendència de les diferències en els metabòlits de perfil lipídic entre el grup dels MRCs dialitzats i el grup control   | <b>133</b> |
| <b>Figura 31</b> | Resultats PCA per als metabòlits de perfil lipídic  | <b>134</b> |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 32 | Representació gràfica dels metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia vascular amb el grup control                 | 138 |
| Figura 33 | Representació gràfica dels metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia glomerular amb el grup control               | 141 |
| Figura 34 | Representació gràfica dels metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia diabètica amb el grup control                | 144 |
| Figura 35 | Representació gràfica dels metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia intersticial/quística amb el grup control    | 147 |
| Figura 36 | Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats amb HTA respecte dels que no tenien HTA                        | 149 |
| Figura 37 | Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats amb dislipèmia respecte dels que no en tenien                  | 151 |
| Figura 38 | Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats fumadors respecte dels no fumadors                             | 152 |
| Figura 39 | Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats fumadors respecte dels no fumadors                             | 153 |
| Figura 40 | Representació esquemàtica de les alteracions en els sistemes antioxidants que s'observen en comparar els MRCs amb els controls sans i els MRCs dialitzats amb els no dialitzats | 162 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Figura 41 | Esquema simplificat de la cadena de reacció d'autooxidació | 169 |
| Figura 42 | Metabòlits del catabolisme muscular en els MRCs dialitzats | 183 |
| Figura 43 | Cicle dels àcids tricarboxílics en els MRCs dialitzats     | 186 |

| TAULES   |  | Pàg. |
|----------|--|------|
| Taula 1  | Estratificació de la MRC segons la National Kidney Foundation  | 24   |
| Taula 2  | Resum dels metabòlits afectats en la MRC detectats per metabolòmica  | 54   |
| Taula 3  | Dades demogràfiques dels grups d'estudi  | 96   |
| Taula 4  | Resultats dels enzims antioxidants en funció del grup d'estudi   | 102  |
| Taula 5  | Resultats del sistema antioxidant tant eritrocitari com plasmàtic per a cada grup d'estudi                                   | 104  |
| Taula 6  | Resultats de les proves de capacitat antioxidant per a cada grup d'estudi  | 106  |
| Taula 7  | Resultats de la determinació del dany a proteïnes i lípids per a cada grup d'estudi  | 107  |
| Taula 8  | Resultats dels paràmetres d'EO en funció de l'etiologia de la MRC  | 109  |
| Taula 9  | Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRC dialitzats amb hipertensió arterial amb el grup control i MRC no dialitzats | 112  |
| Taula 10 | Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRC dialitzats que presenten dislipèmia amb el grup control i MRC no dialitzats | 115  |
| Taula 11 | Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRC dialitzats que presenten MCV amb el grup control i MRC no dialitzats        | 118  |



|          |   |     |
|----------|---|-----|
| Taula 12 | Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRC dialitzats en funció del consum de tabac amb el grup control i MRC no dialitzats   | 121 |
| Taula 13 | Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRC dialitzats que presenten o no LSB amb el grup control i MRC no dialitzats  | 124 |
| Taula 14 | Classificació dels metabòlits detectats per metabolòmica  | 127 |
| Taula 15 | Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia vascular amb la resta d'etiologies i el grup control.             | 136 |
| Taula 16 | Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia glomerular amb la resta d'etiologies i el grup control.           | 140 |
| Taula 17 | Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia diabètica amb la resta d'etiologies i el grup control.            | 143 |
| Taula 18 | Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia intersticial-quística amb la resta d'etiologies i el grup control | 146 |
| Taula 19 | Coeficients de Pearson per a les correlacions entre els paràmetres d'EO i els aminoàcids detectats per metabolòmica   | 155 |
| Taula 20 | Coeficients de Pearson per a les correlacions entre els paràmetres d'EO i els altres metabòlits detectats per metabolòmica  | 156 |
| Taula 21 | Coeficients de Pearson per a les correlacions entre els paràmetres d'EO i els metabòlits del perfil lipídic detectats per metabolòmica                                    | 157 |

## ABREVIATURES

### A

|      |   |
|------|---|
| AAPH | 2,2'-azo-bis (2-amidinopropà) dihidroclorur |
| ADMA | dimetilarginina asimètrica                  |
| ADN  | àcid desoxiribonucleic                      |
| AGEs | productes finals de glicació avançada       |
| ALA  | àcid lipòic                                 |
| AMP  | adenina monofosfat                          |
| APO  | apolipoproteïna                             |
| ARA  | àcid araquidònic                            |
| ATP  | adenosina trifosfat                         |

### C

|                  |  |
|------------------|--|
| Ca <sup>2+</sup> | calci  |
| CAT              | catalasa                                       |
| CMP              | cèl·lules mononuclears perifèriques            |
| COS              | servei de recursos científicotècnics de la URV |
| Cu               | coure  |

### D

|      |                           |
|------|---------------------------|
| DE   | desviació estàndard       |
| DHA  | àcid docosahexaenoic      |
| DNPH | 2,4-dinitrofenilhidrazina |
| Dp   | dany a proteïnes          |

### E

|       |   |
|-------|---|
| ECA   | l'enzim transformador d'angiotensina            |
| EDTA  | àcid etilendiamintetraacètic                    |
| ELISA | de l'anglès "enzyme-linked immunosorbent assay" |
| EO    | estrès oxidatiu                                 |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| EPA                           | àcid eicosapentaenoic   |
| EPO                           | eritropoetina   |
| ERO                           | espècies reactives d'oxigen   |
| ET                            | trolox equivalent   |
| <b>F</b>                      |   |
| FL                            | fluoresceïna sòdica   |
| FRAP                          | de l'anglès "ferric reducing ability of plasma"   |
| <b>G</b>                      |   |
| GPx                           | glutatió peroxidasa   |
| GR                            | glutatió reductasa  |
| GSH                           | glutatió reduït   |
| GSSG                          | glutatió oxidat   |
| <b>H</b>                      |   |
| H <sub>2</sub>                | hidrogen  |
| H <sub>2</sub> O              | aigua   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | peròxid d'hidrògen  |
| HAD                           | hormona antidiürètica   |
| Hb                            | hemoglobina   |
| HC                            | hidrats de carboni  |
| HD                            | hemodiàlisi   |
| HDL                           | de l'anglès "high Density Lipoprotein Cholesterol"  |
| HRP                           | de l'anglès "horseradish peroxidase"  |
| HTA                           | hipertensió arterial  |
| HTC                           | hematòcrit  |
| <b>I</b>                      |   |
| IC <sub>50</sub>              | concentració inhibidora 50<br>de l'anglès "Intermediate Density Lipoprotein<br>cholesterol" |
| IDLC                          |   |
| IRC                           | insuficiència renal crònica   |
| <b>K</b>                      |   |
| K <sup>+</sup>                | potassi   |
| <b>L</b>                      |   |

|       |  |
|-------|--|
| LDL   | lipoproteïna de baixa densitat         |
| LDLox | lipoproteïna de baixa densitat oxidada |
| LSB   | lesions de la substància blanca        |

## M

|      |                             |
|------|-----------------------------|
| MCV  | malalties cardiovasculars   |
| mEq  | miliequivalents             |
| Mn   | manganès                    |
| MPO  | mieloperòxidas              |
| MRC  | malaltia renal crònica      |
| MRCs | malalts renals crònics      |
| MUFA | monounsaturated fatty acids |

## N

|                   |   |
|-------------------|---|
| N <sub>2</sub>    | nitrogen  |
| Na <sup>+</sup>   | sodi  |
| NADP <sup>+</sup> | nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat oxidat            |
| NADPH             | nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduït            |
| NaOH              | hidròxid de sodi  |
| ND                | nefropatia diabètica                                      |
| NEM               | N-metilmaleimida  |
| NO                | òxid nítric   |
| NOESY             | de l'anglès "nuclear Overhauser effect spectroscopy"      |
| NRF2              | de l'anglès "Nuclear factor erythroid-2 related factor 2" |

## O

|                              |  |
|------------------------------|--|
| O <sub>2</sub>               | oxigen   |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | anió superòxid   |
| O <sub>2</sub> <sup>-2</sup> | peròxid  |
| OAT                          | transportador renal específic d'anions orgànics        |
| OH <sup>-</sup>              | ió hidroxil  |
| ·OH                          | radical hidroxil                                       |
| ONOO <sup>-</sup>            | anió peroxinitrit                                      |
| OPT                          | O-phtalaldehid   |
| ORAC                         | de l'anglès "total oxygen radical absorbance capacity" |

|          |   |
|----------|---|
| ORAC     | de l'anglès "oxygen radical absorbance capacity" fracció                |
| NP       | plasmàtica no proteica  |
| <b>P</b> |   |
| PCA      | anàlisi de components principals  |
| PI       | inositol fosfat   |
| PKC      | proteïnquinasa C  |
| pI       | plasma  |
| PTH      | hormona paratioridea  |
| PUFA     | polyunsaturated fatty acids   |
| <b>R</b> |   |
| RLL      | radical lliure  |
| RMN      | ressonància magnètica nuclear   |
| RMN-1H   | ressonància magnètica nuclear de protó                                  |
| ROO·     | radicals peroxils   |
| ROS      | espècies reactives de l'oxigen  |
| <b>S</b> |   |
| SDMA     | dimetilarginina simètrica   |
| SOD      | superòxid dismutasa   |
| SOD-EC   | superòxid dismutasa extracèl·lular                                      |
| SPACE    | estudi prevenció secundària amb antioxidants de la MCV en MRC terminals |
| <b>T</b> |   |
| TAC      | capacitat antioxidant total   |
| TCA      | àcid tricloroacètic   |
| TFG      | taxa de filtració glomerular  |
| TGF-β    | factor transformador del creixement beta                                |
| TMB      | 3,3',5,5'tetrametil-benzidina   |
| <b>U</b> |   |
| U        | unitat  |
| <b>V</b> |   |
| VLDLC    | de l'anglès "Very Low Density Lipoprotein Cholesterol"                  |
| τm       | temps de mescla   |







# Introducció





# 1. Malaltia renal crònica (MRC)

## 1.1 Fisiopatologia de la MRC

La MRC és una síndrome amb manifestacions clíniques molt variades causada per un procés de disminució irreversible, intens i incessant del nombre de nefrones. Aquesta disminució provoca l'afectació de la major part d'òrgans i sistemes i és un reflex de la complexitat de les funcions que el ronyó desenvolupa en condicions fisiològiques, així com de les severes conseqüències que comporta la seva disfunció (Ribes, 2004). Les principals causes de la MRC són degudes a altres malalties com la diabetis, la nefroangiosclerosi i la glomerulonefritis<sup>1</sup> (Hernando Avedaño et al., 2003) o per alteracions vasculars o intersticials<sup>2</sup>-quístiques. Malgrat tot, en un nombre molt elevat de casos, l'etiologia és incerta o no filiada, a causa de la dificultat elevada d'establir-la quan el grau de MRC és molt avançat.

### Progressió i adaptació en la MRC

Una de les característiques més importants de la MRC és la seva tendència a la progressió. Aquesta progressió és causada

---

<sup>1</sup> Glomerulonefritis: Lesió glomerular produïda per una cascada de mecanismes immunitaris cel·lulars i humorals.

<sup>2</sup> Nefritis intersticial: Caracteritzada per una disminució de la TFG, oligúria, hematúria, hipertensió arterial i proteinúria. S'observa inflamació intersticial.

## *Introducció*

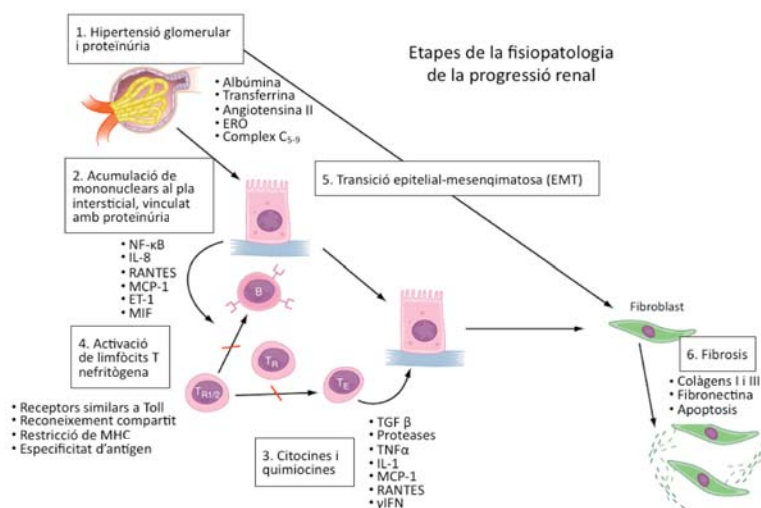
fonamentalment per dos mecanismes: per un costat, el dany específic lligat a la malaltia que l'ha desencadenat (diabetis, nefroangiosclerosi, glomerulonefritis, alteracions vasculars i intersticials quístiques) i, per un altre costat, una progressió inespecífica, independent de la causa inicial, que la gran majoria de les malalties renals semblen compartir.

A les fases inicials de la progressió de la MRC es produeix un deteriorament renal a causa d'una pèrdua progressiva de nefrones. La reacció a aquesta pèrdua de nefrones funcionals fa augmentar la circulació renal amb hiperfiltració glomerular. Això implica una major vasoconstricció de les arterioles eferents postglomerulars de manera que augmenta la pressió capil·lar intraglomerular i augmenta la fracció de filtració. Per tant, el mecanisme central de tots els orígens de dany renal resideix en l'aparició d'hipertensió renal en l'àmbit de la nefrona i, posteriorment, del glomèrul. A més, es produeixen diferents mecanismes vasoconstrictors com el bloqueig de la sintasa de l'àcid nítric i l'activació de receptors d'angiotensina II i tromboxà, que produeixen estrès oxidatiu (EO) en el teixit contigu (Harris & Neilson, 2006).

A tot això, s'ha de afegir que en resposta a la disminució del nombre de nefrones s'alliberen hormones vasoactives, citocines i factors de creixement (figura 1). Aquesta resposta acaba donant lloc als mecanismes d'adaptació, hipertròfia i hiperfiltració, responsables de la predisposició a l'esclerosi i la desaparició de les nefrones restants. La major activitat intrarenal de l'eix renina-angiotensina sembla que contribueix a la hiperfiltració inicial adaptativa i, més endavant, a la

hipertrofia i a l'esclerosi. Aquestes últimes, provenen, en part, de l'estimulació del factor transformador del creixement beta (TGF- $\beta$ ). Aquest procés explica que la disminució de la massa renal per una lesió aïllada pugui donar lloc a un deteriorament progressiu de la funció renal (Harris & Neilson, 2006).

Figura 1: Mecanismes de progressió de dany renal



Els mecanismes generals de la progressió de dany renal en forma seriada inclouen sis fases o etapes que són 1- hiperfiltració, 2- proteinúria, 3- «bany» de citocines, 4- infiltració per mononuclears, 5- transició epitelial mesenquimatos i 6- fibrosi. ERO, espècie reactiva d'oxigen; NF-KB, factor nuclear KB; RANTES, expressada i secretada normalment per l'activació de les cèl·lules T; EMT, transició epitelial mesenquimatos; MCP-1, proteïna quimiotàctica de monòcit 1; MIF, factor inhibidor macrofàgic; MHC, complex d'histocompatibilitat major; TNF $\alpha$ , factor de necrosi tumoral alfa;  $\gamma$ -IFN, interferó gamma; PAI-1, inhibidor de l'activador de plasminogen 1. [Adaptat de (Harris & Neilson, 2006).]

Així, inicialment, el teixit renal perd funció, però hi ha poques anomalies pel fet que el teixit restant augmenta el seu endiment,

## *Introducció*

produint-se una adaptació funcional renal. Per exemple, una pèrdua del 75% de teixit renal provoca un descens de la taxa de filtració glomerular (TFG) d'un 50% respecte del normal.

A mida que progressa la MRC la capacitat per concentrar orina disminueix i va seguida d'una disminució en la capacitat per excretar fosfats, àcids i potassi. Quan la insuficiència renal és avançada (TFG  $\leq 10$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), la capacitat per diluir l'orina es perd, de manera que l'osmolaritat de l'orina es fixa habitualment propera a la del plasma (300-320 mOsm/kg), i el volum urinari no respon fàcilment a les variacions en el consum d'aigua (McMillan, 2012). Aquest fet fa que augmentin les concentracions plasmàtiques dels soluts que depenen de la filtració glomerular. Així soluts com la creatinina i la urea augmenten la seva concentració plasmàtica de manera no lineal amb la disminució de la TFG i són utilitzades per avaluar la capacitat excretora renal. Aquests canvis són mínims a les fases inicials de la malaltia. Quan la TFG cau per sota de 10 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> (normal = 100 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), els nivells de creatinina augmenten ràpidament i s'associen, generalment, a manifestacions sistèmiques (urèmia). La urea i la creatinina no són grans contribuents als símptomes urèmics, però són marcadors de moltes altres substàncies (algunes encara no ben definides) que en causen els símptomes.

A les fases inicials de la progressió de la MRC apareix una acidosi moderada (contingut plasmàtic de HCO<sub>3</sub> de 15 a 20 mmol/L) i anèmia a mida que progressa la MRC. L'anèmia, en aquests casos, és normocròmica normocítica, amb un hematòcrit (HTC) de 20 a 30%

(rang normal 37-47%). Generalment és causada per la producció deficient d'eritropoetina (EPO) a causa d'una reducció de la massa renal funcional. Altres causes són la deficiència de ferro, àcid fòlic i vitamina B12 (McMillan, 2012).

A les últimes etapes de la MRC es produeix una acumulació a la sang de productes tòxics que en situacions normals són eliminats pel ronyó. L'acumulació d'aquests tòxics dona lloc a la urèmia o síndrome urèmica, un conjunt de símptomes cerebrals, respiratoris, circulatoris i digestius.

Les etapes 1 i 2 de la MRC habitualment no s'acompanyen de símptomes que sorgeixen del deteriorament de la filtració glomerular (taula 1). No obstant això, hi pot haver manifestacions de la nefropatia primària per si mateixa. Aquests símptomes inclouen edema en subjectes amb síndrome nefròtica<sup>3</sup> o signes d'hipertensió. Els últims són conseqüència de malaltia del parènquima renal en individus amb nefropatia poliquística,<sup>4</sup> algunes formes de glomerulonefritis i altres malalties del parènquima i vasos renals, encara que molts conserven satisfactòriament la filtració.

---

<sup>3</sup> Síndrome nefròtica: Conjunt de símptomes caracteritzats per proteïnúria massiva, hipoalbuminèmia, dislipidèmia i edema.

<sup>4</sup> Nefropatia poliquística: Malaltia progressiva hereditària consistent en el mal funcionament renal causat per la presència de múltiples quists a ambdós ronyons

## Introducció

Si la disminució de la filtració evoluciona i arriba als estadis 3 i 4, són més notables les complicacions de MRC manifestades clínicament i per mitjà de laboratori. Les complicacions inclouen anèmia i fatiga fàcil, anorèxia amb malnutrició progressiva, anormalitats en el calci, el fòsfor i les hormones que regulen minerals com el calcitriol i la hormona paratiroidea (PTH). També s'observen anormalitats en l'homeòstasi del sodi, el potassi i l'aigua, i de l'equilibri acidobàsic.

Taula 1: Estratificació de la MRC segons la National Kidney Foundation.

| Fases MRC segons TFG         | TFG (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )    | Terminologia                        |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| G1                           | >90                                 | Normal o elevat                     |
| G2                           | 66-89                               | Lleugerament disminuït              |
| G3a                          | 45-59                               | De lleuger a moderadament disminuït |
| G3b                          | 30-44                               | De moderat a severament disminuït   |
| G4                           | 15-29                               | Severament disminuït                |
| G5                           | <15                                 | Fallada renal                       |
| Fases MRC segons albuminúria | Taxa d'excreció d'albumina (mg/dia) | Terminologia                        |
| A1                           | <30                                 | De normal a lleugerament augmentat  |
| A2                           | De 30 a 300                         | Moderadament augmentat              |
| A3                           | >300                                | Severament augmentat                |

MRC: malaltia renal crònica, TFG: taxa de filtració glomerular.

Si la MRC evoluciona fins a l'etapa 5, s'acumulen les toxines al grau en què la persona acostuma a presentar pertorbació extraordinària de les seves activitats de la vida diària, benestar, estat nutricional i hemostàsia d'aigua i electròlits ocasionant la síndrome urèmica. Aquesta situació comprometria la vida del pacient si no es realitzés tractament de reposició de la funció renal (diàlisi o trasplantament) (Longo et al., 2012).

### **Complicacions metabòliques en la MRC**

La MRC s'associa amb molts tipus d'alteracions metabòliques causades per la malaltia renal en si i també atribuïbles al tractament de diàlisi. Fenòmens com l'acumulació o el dèficit de diverses substàncies i la desregulació de les vies metabòliques es combinen i participen en la patogènesi d'aquests canvis. L'augment de la formació de metabòlits a través dels processos catabòlics i les vies metabòliques alternatives també hi influeixen. El tractament de diàlisi disminueix, en part, aquesta acumulació, però no pot evitar el dèficit global. El dèficit d'algunes substàncies importants en la insuficiència renal crònica pot ser causada per la ingesta deficient en la dieta, l'absorció intestinal alterada o l'augment de les pèrdues durant les sessions de diàlisi.

Tots els factors abans esmentats condueixen a moltes complicacions greus per als pacients amb MRC no dialitzats i dialitzats. Tots afecten notablement el pronòstic i la qualitat de vida d'aquests pacients. Les complicacions metabòliques de la insuficiència renal crònica i l'hemodiàlisi inclouen, bàsicament, els canvis en l'equilibri àcid-base i



## Introducció

els canvis en el metabolisme de proteïnes, carbohidrats i lípids que veurem a continuació.

### - Equilibri àcid-base

En el curs de la MRC s'observa amb freqüència un trastorn de l'equilibri àcid-base. Tot i que tenim un sistema de tamponament fisiològic gràcies als fluids extracel·lulars, els teixits tamponadors i els ossos, amb l'empitjorament de la funció renal es pot desenvolupar una acidosi metabòlica progressiva i una acidèmia. La prevalença d'una concentració de bicarbonat  $< 22\text{meq/L}$  en sèrum és  $< 5\%$  en les fases 1 i 2 de la MRC i augmenta linealment fins a aproximadament 25% en els pacients amb MRC no dialitzats en fase G5. Existeix una correlació entre el grau d'acidosi i la severitat de la MRC i, en general, el grau d'acidosi és més severa en una TFG menor. En la MRC lleu, l'acidosi metabòlica és el resultat d'una disminució de la capacitat de reabsorbir bicarbonat, per excretar l'amoniac i per eliminar l'àcid. En la MRC més greu, els anions orgànics conjugats i altres àcids no volàtils no poden ser excretats suficientment, i apareix una acidosi elevada (Racek, 2011). L'acidosi metabòlica resultant de la MRC avançada s'anomena **acidosi urèmica**. El nivell de la TFG en què l'acidosi urèmica es desenvolupa varia en funció de múltiples factors. La producció d'àcid endogen és un factor important, que al seu torn depèn de la dieta. La ingestió de fruites i verdures dona lloc a una producció neta d'àlcali i, per tant, l'augment d'ingestió d'aquests aliments tendirà a retardar l'aparició de l'acidosi metabòlica en la MRC.

Aquesta acidosi urèmica s'ha associat amb conseqüències adverses, per exemple: pèrdua de massa muscular, malaltia dels ossos, anormalitats en l'hormona de creixement i la secreció PTH, alteració de la sensibilitat a la insulina i acumulació de la beta-2 microglobulina (Racek, 2011). Altres complicacions inclouen el balanç de nitrogen negatiu, anorèxia, fatiga, deteriorament de la funció del sistema cardiovascular, hiperpotassèmia, gluconeogènesi alterada i el metabolisme dels triglicèrids alterat.

Existeix una relació entre l'estat d'acidosis cel·lular i un augment de l'EO. Aquest EO induït per l'acidosis ve donat per una disminució en l'activitat de la glutatió peroxidasa (GPx) i per una activació de la reacció de Fenton, que origina un augment del radical hidroxil que pot causar un augment de mort cel·lular (Ying, Han, Miller, & Swanson, 1999).

#### - Metabolisme dels hidrats de carboni

Els trastorns del metabolisme dels hidrats de carboni (HC) són molt freqüents en els pacients amb MRC. D'una banda, la diabetis és la causa més comuna d'insuficiència renal. Però, d'altra banda, la majoria dels pacients dialitzats tenen sovint trastorns del metabolisme dels HC sense ser diabètics.

Aquesta alteració en el metabolisme dels HC es manifesta per una disminució en el metabolisme de la glucosa i per una eliminació més

## *Introducció*

lenta de la glucèmia després que l'individu rebi una càrrega d'aquest carbohidrat, tot i que la glucèmia en dejú acostuma a ser normal.

El ronyó contribueix a l'eliminació de la insulina de la circulació, per això, les concentracions plasmàtiques d'aquesta hormona mostren un lleu o moderat increment en molts subjectes urèmics en dejú i en estat postprandial. Aquest augment és degut tant per la disminució en l'eliminació com per un augment de producció pancreàtica. D'altra banda, es produeix una resistència a la utilització d'insulina en l'àmbit post-receptor. Aquesta resistència a la insulina en l'àmbit perifèric és deguda, possiblement, a les toxines urèmiques derivades del metabolisme nitrogenat, ja que desapareix en començar la diàlisi (on s'observa una normalització de la glucèmia) (Guerrero, 2006). S'ha estudiat que la resistència a la insulina pot estar relacionada amb la hipertensió arterial (Ferrannini et al., 1987) i pot contribuir a l'alta morbiditat i mortalitat en pacients amb MRC (Shinohara et al., 2002). El mecanisme subjacent pot ser una alteració de la síntesi d'òxid nítric (NO) a l'endoteli dels pacients amb MRC, amb el consegüent augment d'EO i el que això implica (Tousoulis et al., 2013). Es va demostrar que el funcionament adequat de la NO sintasa endotelial és important per al control no només de la pressió arterial, sinó també de l'homeòstasi de la glucosa i els lípids (Duplain et al., 2001).

També s'ha vist que una alteració en la síntesi d'adipocitoquines pot contribuir a la resistència a la insulina i als trastorns metabòlics relacionats en pacients amb MRC (Zanetti, Barazzoni, & Guarnieri, 2008).

## - Metabolisme de les proteïnes

Als pacients amb MRC avançada s'observa un cert grau de dèficit proteic valorat tant amb mesures antropomètriques com amb l'albumina sèrica, així com un patró d'aminoàcids anormal. En general s'observen nivells baixos d'aminoàcids essencials i nivells normals o una mica aixecats en els valors d'aminoàcids no essencials.

Les causes d'aquestes alteracions són multifactorials, però és especialment important l'acidosi metabòlica que acompanya de manera invariable els estats avançats de la MRC i que produeix un augment de la destrucció proteica per si mateixa, de manera independent a la MRC. Aquest efecte es produeix a través de dos mecanismes: per una banda, augment de la degradació de les proteïnes i, per l'altra, disminució de la capacitat per limitar l'oxidació dels aminoàcids essencials, amb la qual cosa s'augmenta, també, la destrucció proteica.

En l'àmbit cel·lular, el mecanisme pel qual l'acidosi promou la degradació proteica és a través de l'activació del sistema enzimàtic proteolític ubiquitin i l'activació de la via de la deshidrogenasa dels cetoàcids d'aminoàcids de cadena ramificada (cetoàcids de la valina, leucina i isoleucina). L'acidosi metabòlica és tan important que s'ha demostrat que quan s'aconsegueix acostar a valors normals els nivells de bicarbonat de 15 mEq/L que presenten pacients amb MRC avançada (valors normals de bicarbonat 24-26 mEq/L) s'observa una reducció del 28-30% el catabolisme proteic, gràcies, per exemple, a la diàlisi (Guerrero, 2006).

## Introducció

### - Metabolisme lipídic

Els pacients amb MRC tenen una mida de partícula i composició de les lipoproteïnes diferent de les persones sense MRC. Els malalts renals crònics tenen nivells més elevats de triglicèrids acompanyats de nivells elevats de VLDL i IDL, a causa d'una disminució en l'activitat de la lipoproteïnlipasa. També presenten anormalitats en la mida de les LDL i nivells més elevats de LDLox. Tenen aixecats els valors d'ApoB, ApoE i ApoC-III i més baixos els valors d'ApoA-I i ApoA-II (Omran, Al-Dadah, & Dellsperger, 2013). Hi ha estudis que suggereixen que el transport revers del colesterol des dels teixits perifèrics també es troba alterat als pacients amb MRC. Pot ser a causa del defecte quantitatiu i qualitatiu de la maduració de les HDL, fet que tindria un impacte negatiu en el transport revers del colesterol (Keane, Tomassini, & Neff, 2013).

Aquests trastorns lipídics aterogènics que acompanyen la MRC són, probablement, la principal causa de l'elevada freqüència de malaltia cardiovascular (MCV) que presenten aquests pacients. S'han suggerit moltes etiologies per explicar l'augment de l'aterogenicitat de les LDL en aquests pacients com són una disminució de l'afinitat del receptor de les LDL pel seu lligam (el que fa que augmenti la degradació del receptor pels "scavengers"), un augment en la susceptibilitat de les LDL a ser oxidades, un augment de la filtració endotelial a causa de la disminució en mida de les partícules de LDL, així com una major afinitat d'unió als proteoglicans de la paret arterial (Omran et al., 2013).

A més, s'ha de sumar que els MRCs presenten EO i els radicals lliures (RLL) promouen l'angiogènesi, ja sigui directament o a través de la

generació de productes d'oxidació actius, incloent els lípids peroxidats (Kim, Lee, Lee, & Kwak, 2014).

Aquests canvis en el metabolisme dels lípids i les lipoproteïnes que es donen en els malalts renals crònics (MRCs), al seu torn, contribueixen a la progressió de la MRC i les seves complicacions cardiovasculars. Els lípids i metabòlits derivats de lípids exerceixen diversos papers d'importància crítica en l'estructura i funció de les cèl·lules, teixits i fluids biològics. La lipidòmica és una branca de la metabolòmica, que abasta l'estudi global dels lípids i la seva funció biològica en la salut i la malaltia, incloent la identificació de biomarcadors per al diagnòstic, el pronòstic, la prevenció i la resposta terapèutica per a diverses malalties. S'ha vist que en MRCs dialitzats hi ha un augment en els triglicèrids en plasma i en les membranes dels eritròcits, així com també un augment en àcid palmític i àcids monoinsaturats i una disminució dels àcids poliinsaturats. En MRCs d'etiologia glomerular dialitzats s'ha observat una disminució de fosfatidilinositol amb un augment en el diacilglicerol (Zhao, Vaziri, & Lin, 2015). En els MRCs d'etiologia diabètica s'ha observat, també, una disminució en el fosfatidilinositol deguda a una activació de la via metabòlica del sorbitol que dona lloc a una disminució en la síntesis del inositol fosfat (PI) (Zhao et al., 2015).

## *Introducció*

# 2. Alteracions concomitants en la MRC

En la majoria de pacients amb MRC, hi trobem associades altres malalties o alteracions com són la hipertensió arterial, la dislipèmia, les malalties cardiovasculars o les lesions neurològiques.

## 2.1 Malaltia cardiovascular

Existeix una forta associació entre les malalties cardiovasculars (MCV) com són la hipertensió arterial, la dislipèmia, la cardiopatia isquèmica o la vasculopatia perifèrica i la MRC. Les MCV poden ser causa o conseqüència de la MRC.

El fet de patir MRC implica que la TFG va empitjorant i s'ha vist que a mesura que empitjora augmenta el risc de patir MCV, de manera que la mortalitat per MCV és el doble en pacients en fase 3 de MRC i el triple en fase 4 respecte a persones sanes (Consortium et al., 2010; van der Velde et al., 2011). A més, s'ha vist que l'albuminúria causada pel mal funcionament renal també augmenta el risc de patir MCV. En concret, hi ha més risc de patir insuficiència cardíaca, infart, malaltia arterial perifèrica, malaltia coronària i fibril·lació atrial en pacients amb MRC que en persones sanes.

Juntament amb la diabetis, la hipertensió és una de les causes més freqüents de patir MRC. Hi ha estudis que indiquen que existeix una associació entre hipertensió i MRC, de manera que els pacients amb hipertensió i MRC tenen més risc cardiovascular que els que no tenen

MRC, i així, els fàrmacs antihipertensius milloren molt més el risc cardiovascular en els pacients amb MRC que en les persones sense MRC (Hallan et al., 2012).

En pacients amb funció renal afectada i elevada albuminúria, el perfil lipídic esdevé aterogènic a causa d'una disminució en la funció de l'HDL colesterol i un estat oxidatiu excessiu de LDL colesterol.

En els MRCs s'observa alterat el sistema renina-angiotensina, com hem comentat anteriorment. L'augment en els nivells d'angiotensina provoca una estimulació en la producció de superòxid, interleukina-6 i altres citoquines. La biodisponibilitat de l'NO, l'agregació plaquetària i l'adhesió leucocitària es veuen disminuïts. Tots aquests factors vasoactius afecten la funció endotelial en esdevenir MCV (Gansevoort et al., 2013).

Per tant, molts factors de risc cardiovascular i de risc de patir MRC són comuns i el fet de patir una d'aquestes malalties i tenir elevat algun d'aquests factors fa augmentar molt el risc de patir l'altra malaltia.

Diversos estudis observacionals han demostrat que la incidència de la MCV és més gran en pacients amb trasplantament renal que en la població general; de fet, constitueix la principal causa de mortalitat en els pacients trasplantats. L'excessiu risc per la MCV i l'EO en aquesta població s'ha atribuït a una alta prevalença de factors de risc aterogènics tradicionals i no tradicionals, abans i després del trasplantament (Nafar, Sahraei, Salamzadeh, Samavat, & Vaziri, 2011).



## *Introducció*

### 2.2 Lesions de la substància blanca

Les lesions de la substància blanca (LSB) són manifestacions isquèmiques d'una malaltia microvascular que pot progressar ràpidament al llarg del temps. Aquestes lesions s'han relacionat amb un impediment cognitiu i un major risc d'aparició de demència, accident vascular cerebral i episodis cardíacs (Jimenez et al., 2008; Koga et al., 2009; Seliger & Sarnak, 2007). Les lesions de la substància blanca s'observen freqüentment en pacients d'edat avançada i la seva prevalença i severitat augmenten amb l'edat (Hailpern, Melamed, Cohen, & Hostetter, 2007).

Els pacients amb MRC tenen una elevada prevalença, el 33% versus el 5% de la població general, d'LSB (Martinez-Vea et al., 2006).

Existeixen evidències que l'EO podria jugar un paper molt important en l'aparició d'aquestes LSB i que està molt relacionat amb els malalts amb MRC (Dong et al., 2011; Masuda, 2005; Zeis et al., 2009).

## 3. Estrès oxidatiu i malaltia renal crònica

### 3.1 Estrès oxidatiu

Com hem vist fins ara, l'EO està present en diverses etapes de la MRC i també es relaciona amb moltes de les alteracions i malalties concomitants. L'**estrès oxidatiu** es defineix com una alteració en el balanç prooxidant/antioxidant a favor dels prooxidants (Barry Halliwell & Whiteman, 2004). La generació d'espècies reactives de l'oxigen (ERO) i l'activitat de la defensa antioxidant es troba més o menys balancejada *in vivo*. De fet, l'equilibri pot estar lleugerament inclinat a favor dels ERO, fet que genera que hi hagi contínuament un baix nivell de dany oxidatiu en el cos humà. Això crea la necessitat de sistemes de reparació per fer front a molècules danyades oxidativament. No obstant això, si es produeix un major desequilibri entre els radicals lliures i el sistema de defensa antioxidant, a favor dels radicals lliures, ens trobaríem en un estat d'EO.

Un **radical lliure** (RLL) és qualsevol àtom o molècula que contingui un o més electrons no aparellats. La presència d'aquest electró fa que la molècula tingui un increment en la reactivitat i un alt grau d'instabilitat, la qual cosa li genera una vida mitjana molt curta i en dificulta molt la quantificació.

Les **ERO** són espècies derivades de l'oxigen, radicals o no, però que són reactives. Entre elles s'inclouen l'anió superòxid ( $O_2^-$ ), el peròxid ( $O_2^{-2}$ ),

## *Introducció*

el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), i el radical i l'ió hidroxil ( $\cdot OH$ ,  $OH^-$ ). Un dels RLL més reactius trobats en organismes vius és el radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) (B Halliwell, 1987).

De la mateixa manera que amb l'oxigen, al nostre organisme també trobem espècies reactives del nitrogen. Entre elles, hi ha l'òxid nítric (NO) i l'anió peroxinitrit ( $ONOO^-$ ).

En condicions normals, els RLL i les ERO són generats de manera endògena i constant per «accidents químics» o amb finalitats metabòliques específiques. Les conseqüències de la reactivitat dels diferents RLL són diverses, i algunes poden causar danys severos en molècules biològiques, especialment a l'àcid desoxiribonucleic (ADN), als lípids i a les proteïnes.

Dins de les cèl·lules, els RLL poden ser produïts com a conseqüència de l'absorció de l'energia radiant, el metabolisme dels fàrmacs, els processos metabòlics normals i la transició dels metalls. A més, la membrana plasmàtica també és una font de molècules susceptibles a formar radicals (Ames, Shigenaga, & Hagen, 1993; Kasai, Okada, Nishimura, Rao, & Reddy, 1989). Als mitocondris, a través de la cadena de transport d'electrons, s'utilitza l'oxigen per oxidar altres molècules i generar energia en forma d'adenosina trifosfat (ATP). Durant aquest procés, l'oxigen es redueix a aigua, produint RLL com l'anió superòxid. Encara que l'anió superòxid no es considera altament reactiu, pot produir altres ERO com el peròxid d'hidrogen gràcies a l'enzim superòxid-dismutasa (SOD). El peròxid d'hidrogen pot inactivar enzims, creuar les membranes cel·lulars, i reaccionar amb el ferro i els ions de coure per produir el radical hidroxil, un dels radicals més reactius. Els

fagòcits són un altre productor important d'anions superòxid, utilitzen els RLL com una defensa contra organismes estranys.

També existeixen fonts exògenes de RLL i ERO, com són els raigs ultraviolats, o determinats compostos presents en els aliments, el tabac, la pol·lució, etc.

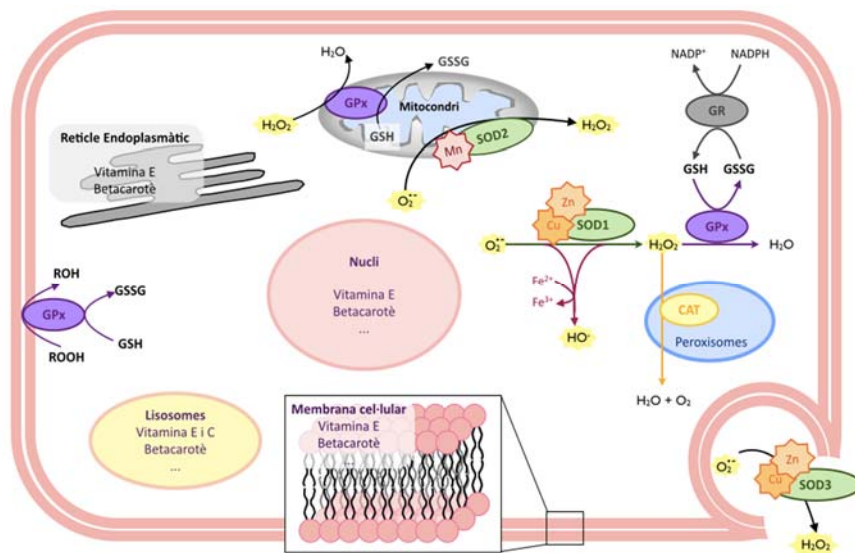
Per tot això, l'organisme disposa de diversos sistemes de protecció. Els sistemes endògens de defensa antioxidant segresten i minimitzen la formació de les ERO, però no són 100% efectius. Per tant, els antioxidants provinents de la dieta poden tenir una particular importància a l'hora de disminuir el dany oxidatiu ja que són capaços de capturar i/o absorbir aquestes espècies reactives (Esterbauer, Gebicki, Puhl, & Jürgens, 1992; B Halliwell, 1994). En casos de malaltia, els fàrmacs antioxidants també poden ser una bona estratègia d'actuació davant de RLL i ERO.

Els principals responsables de la inactivació i la terminació de la cadena de reacció de RLL d'oxigen són la SOD, la catalasa (CAT), i el sistema glutatió. A la següent figura s'observen els sistemes antioxidants cel·lulars i la seva localització (figura 2).

Tant al plasma com els glòbuls vermells existeixen segrestadors d'ERO (o «scavengers» ) amb propietats antioxidants. Quan l'anió superòxid entra a les cèl·lules vermelles de la sang, la CAT pot destruir els RLL. Els glòbuls vermells poden augmentar els nivells de glutatió peroxidasa, d'aquesta manera s'eviten danys causats pels RLL (Goodyear-Bruch & Pierce, 2002).

## Introducció

Figura 2: Representació dels sistemes antioxidants cel·lulars i la seva localització



CAT: catalasa, SOD: superòxid-dismutasa, GPx: glutatió peroxidasa, GR: glutatió-reductasa, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ROOH: peròxid, ROH: alcohol. A les membranes trobaríem tots els antioxidants no enzimàtics de naturalesa lipídica com són les vitamines i el betacarotè, mentre que al citoplasma i a l'interior d'alguns orgànuls trobaríem els enzims antioxidants.  $\bullet O_2^-$ : anió superòxid,  $O_2^{2-}$ : peròxid,  $H_2O_2$ : peròxid d'hidrogen,  $\bullet OH$ : radical hidroxil, OH: ió hidroxil.

1

Els sistemes enzimàtics antioxidants no es consumeixen durant la reacció antioxidant i són la primera barrera per a la reducció de les ERO. Els més importants són:

La **superòxid-dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)** catalitza la transformació del radical superòxid en peròxid d'hidrogen. Als mamífers hi ha tres

isoformes de SOD: SOD1 [CuZnSOD], SOD2 [MnSOD], i SOD3 [ECSOD]. Cada un és un producte de gens diferents i de localització cel·lular diferent, però tots catalitzen la mateixa reacció. El mecanisme de dismutació del superòxid a peròxid d'hidrogen per la SOD implica la reducció i reoxidació alternativa d'un metall de transició actiu redox, tal com el coure (Cu) i el manganès (Mn) al lloc actiu de l'enzim. La SOD ha estat molt estudiada i valorada com a indicador d'EO a diferents malalties com el càncer, la malaltia de Crohn i la MRC (Aziz, Majeed, Diab, & Al-Tamimi, 2015; Kiely et al., 2001).

La **catalasa (EC I.II.1.6)** és un enzim que conté ferro com a cofactor i que es troba principalment als peroxisomes. Aquest enzim té la funció de neutralitzar el peròxid d'hidrogen i altres molècules diverses en catalitzar una reacció entre dues molècules de peròxid d'hidrogen, i dóna com a resultat la formació d'aigua i oxigen. És un dels enzims més abundants a la natura i es troba àmpliament distribuït a l'organisme. La seva activitat varia depenent de la seva localització: és més elevada al fetge i als ronyons, més baixa al teixit connectiu i als epitelis, i pràcticament nul·la al teixit nerviós (Maehly, 1955). A les cèl·lules, es localitza generalment als peroxisomes, excepte als eritròcits, on es troba al citosol. Es caracteritza per la seva alta eficiència catalítica, però relativament poca afinitat pel substrat. És per això que aquest enzim és molt eficient en la reducció d' $\text{H}_2\text{O}_2$  quan la concentració d'aquest substrat és molt elevada.

La **glutatió peroxidasa (EC I.II.1.9)** és un enzim seleni depenent que, juntament amb la CAT, coopera en l'eliminació del peròxid d'hidrogen. La GPx també redueix peròxids lipídics formats durant l'oxidació dels

## *Introducció*

àcids grassos poliinsaturats en una molècula d'àcid gras hidroxil, que no és tòxica i és estable. Té un paper important en la defensa antioxidant per la seva localització al citoplasma i als mitocondris de tots els òrgans i teixits. És molt més activa en hepatòcits i en eritròcits i, a més, té una àmplia especificitat de substrat i una major afinitat per  $H_2O_2$  que l'enzim CAT. Amb la intervenció del glutatió reduït (GSH) catalitza la reducció del peròxid d'hidrogen i dels hidroperòxids, formant glutatió oxidat (GSSG). La seva eficàcia va molt lligada a la de la **glutatió-reductasa (GR) (EC 1.8.1.7)** que catalitza la reducció del GSSG a GSH. La GPx també participa en la reparació de les membranes reciclant els fosfolípids per àcids grassos no peroxidats.

Els sistemes no enzimàtics són compostos, fonamentalment exògens, que es consumeixen durant la seva acció antioxidant; per això, han de ser reemplaçats. Principalment, provenen de la dieta (vitamina E, vitamina C, betacarotens, polifenols, flavonoides i oligoelements) i alguns són components d'origen endogen (glutatió, urat, ubiquinol, melatonina i algunes proteïnes plasmàtiques).

El **glutatió** és un tripèptid constituït per tres aminoàcids: glicina, cisteïna i àcid glutàmic. Es troba a pràcticament tots els teixits encara que és sintetitzat al fetge. Es manté en un cicle d'oxidació reducció amb el GSSG. Quan augmenta l'EO, la capacitat del sistema GPx/GR es pot veure superada i pot produir una acumulació de GSSG intracel·lular. Aquest GSSG intracel·lular serà transportat fora de la cèl·lula i, per tant, les concentracions de GSSG plasmàtiques poden ser considerades un bon índex d'EO intracel·lular. La valoració de la ràtio entre el GSSG/GSH proporciona una idea de l'estat de destoxicació del

sistema, ja que el GSH no només té un paper com a antioxidant sinó que té funcions importants en la catàlisi, el metabolisme i el transport intracel·lular, protegint les cèl·lules de RLL, ERO i compostos tòxics d'origen endogen i exogen.

L'**àcid úric**, o urat, actua com a captador de diferents ERO i quelant d'ions de metalls. S'ha postulat que en nivells plasmàtics elevats funciona com un dels majors antioxidants plasmàtics, protegint les cèl·lules del dany oxidatiu. D'altra banda, nivells elevats d'àcid úric s'associen i, en molts casos, són predictors del desenvolupament de la hipertensió, l'obesitat visceral, la resistència a la insulina, la dislipidèmia, la diabetis tipus II, la malaltia renal i cardiovascular i els fenòmens cerebrovasculars (Sautin & Johnson, 2008).



## Introducció

### 3.2 Estrès oxidatiu en la malaltia renal crònica

L'EO és un factor de risc important i pot accelerar la progressió de la malaltia renal, la diabetis i altres malalties cardiovasculars o neurològiques com l'ateriosclerosi, la insuficiència cardíaca, l'infart de miocardi o el Parkinson, l'Alzheimer, l'esquizofrènia, el desordre bipolar, la síndrome X fràgil i la síndrome de fatiga crònica (de Diego-Otero et al., 2009).

El paper de l'EO en la MRC està encara per dilucidar. L'alteració de l'equilibri oxidatiu que es dona en els malalts renals crònics prové d'una combinació entre un augment de la producció d'ERO i una reducció de la seva eliminació, així com un mecanisme de defensa antioxidant ineficaç. Diversos mecanismes antioxidants importants s'han vist alterats en pacients amb insuficiència renal crònica, incloent-hi la reducció de l'activitat SOD eritrocitària (Vural et al., 2005), una reducció dels grups tiol de plasma (J Himmelfarb, McMenamin, & McMonagle, 2002), una disminució plasmàtica del glutatió i una disminució en l'activitat de la glutatió peroxidasa (Ceballos-Picot et al., 1996; Romeu et al., 2010). No obstant això, la capacitat antioxidant total (TAC) de plasma es manté normal o fins i tot elevada a mesura que avança la MRC (Dounousi et al., 2006). Aquest augment en la TAC s'ha suggerit que podria ser la causa de les concentracions elevades d'àcid úric presents en plasmes de pacients amb MRC (Nguyen-Khoa et al., 1999). L'àcid úric presenta una elevada capacitat de segrestar radicals peroxil, els quals constitueixen el substrat per a l'assaig *in vitro* TAC (Gosmanova & Le, 2011).

Els aminoàcids com la cisteïna i la metionina, així com també els minerals com el zinc són importants per conservar el potencial antioxidant i la seva deficiència fa el pacient més susceptible a malalties en les quals els radicals lliures tenen un paper important, com és el cas de la MRC. No obstant això, els pacients amb MRC han de prendre una dieta baixa en proteïnes, la qual cosa indueix a un baix consum d'aquests aminoàcids, així com de zinc, i en resulta una reducció de la capacitat antioxidant.

En estudiar els mecanismes fisiopatològics bàsics dels trastorns renals, com la isquèmia o el dany glomerular, es veu que en tots hi ha presents factors que predisposen al desequilibri oxidatiu. Les ERO danyen les cèl·lules del ronyó mitjançant la peroxidació de lípids de membrana, la inactivació de receptors de membrana i enzims, la despolimerització de polisacàrids o el dany a altres proteïnes. A més, les ERO actuen normalment com a reguladores de l'expressió de l'EPO, així, nivells alts de peròxid d'hidrogen o d'anió superòxid inhibeixen la producció d'EPO (Goldberg, Dunning, & Bunn, 1988). Quan ens trobem en una situació de MRC, amb nivells alts d'ERO, hi ha una excessiva inhibició de l'EPO i una conseqüent anèmia (Fandrey, Frede, & Jelkmann, 1994). Per això, en molts casos s'administra EPO als individus amb MRC. Per tant, les ERO es relacionen tant amb el dany cel·lular present en la MRC com amb l'anèmia que va lligada a aquesta malaltia.

## *Introducció*

# 4. Tractament de la malaltia renal crònica

## 4.1 Tractament farmacològic

No existeix un tractament farmacològic per a la MRC. Tal com hem esmentat fins ara, la progressió d'aquesta malaltia és inevitable. Tot i això, els pacients poden rebre diferents tractaments per millorar la qualitat de vida així com per minimitzar els efectes de les malalties concomitants de la MRC.

Un control de la pressió arterial retardarà un major dany renal; per tant, molts dels malalts renals crònics tenen tractament per la hipertensió. Els inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina (ECA) i els bloquejadors dels receptors d'angiotensina són els més emprats. Com hem vist, la hipertensió dóna lloc a un augment en l'EO dels malalts; per tant, el tractament amb antihipertensius intentaria disminuir-lo, o si més no, no augmentar-lo. Els diürètics estalviadors de potassi ( $K^+$ ), els inhibidors de l'enzim conversor d'angiotensina, els  $\beta$ -bloquejadors, els antiinflamatoris no esteroïdals, la ciclosporina, el tacrolimus o els bloquejadors dels receptors d'angiotensina II poden elevar els nivells plasmàtics de  $K^+$  en pacients amb MRC menys avançada (McMillan, 2012). Tant la hipopotassèmia com la hiperpotassèmia ocasionen alteracions de la polarització de la membrana cel·lular que donen lloc a diverses manifestacions clíniques,

les més greus de les quals són les que afecten el sistema cardiovascular, com les arítmies ventriculars.

També es prescriuen en molts casos tractaments per l'anèmia, com la ingesta d'aliments rics en ferro, comprimits de ferro o ferro endovenós. No obstant això, aquesta administració de ferro faria augmentar els nivells d'EO en els MRCs (Dogaru et al., 2015). També es pot donar tractament amb EPO o bé transfusions de sang per tal de tractar l'anèmia. El tractament amb EPO fa disminuir els nivells de GSH i augmentar la ràtio GSSG/GSH, la qual cosa implica un empitjorament de l'estat oxidatiu (Martinez-Vea et al., 2012).

Com que hi ha molta evidència de l'associació entre marcadors d'EO amb inflamació i el risc cardiovascular en pacients amb MRC s'ha suggerit que, per intentar minimitzar l'efecte de l'EO, es podrien donar antioxidants en aquests malalts. Els antioxidants més estudiats són els tocoferols (com la vitamina E) i els antioxidants que contenen tiol (com la N-acetilcisteïna).

Els tocoferols han estat reconeguts com a antioxidants potents amb efectes sobre les vies de senyalització intracel·lulars i per tenir efectes metabòlics beneficiosos en els pacients sotmesos a diàlisi (Saran et al., 2003). S'ha reconegut que  $\gamma$ -tocoferol i el seu principal metabòlit són especialment potents en la inhibició de l'activació de cèl·lules inflamatòries i en la producció de citocines proinflamatòries (Jonathan Himmelfarb et al., 2003). L'estudi SPACE (prevenció secundària amb antioxidants de la malaltia cardiovascular en l'etapa final de la malaltia renal) va demostrar una reducció clínica i estadísticament significativa

## Introducció

en l'infart de miocardi i altres esdeveniments cardiovasculars en els pacients tractats amb  $\alpha$ -tocoferol (Vit E) en comparació amb el placebo (Boaz et al., 2000).

L'administració dels antioxidants que contenen grups tiol com la N-acetilcisteïna redueixen la taxa d'esdeveniments cardiovasculars en pacients en hemodiàlisi (Tepel, van der Giet, Statz, Jankowski, & Zidek, 2003). Un altre candidat pot ser l'àcid lipòic (ALA) que és un antioxidant que conté tiols que poden restablir els nivells de glutatió intracel·lular i participar en les reaccions redox de reciclatge de l'ascorbat i els tocoferols (Jones et al., 2002).

Més recentment, s'ha estudiat el NRF2, de l'anglès «*nuclear factor erythroid-2 related factor 2*», com a possible diana en el tractament de l'EO dels MRCs. El NRF2 és un factor de transcripció que regula l'expressió d'una àmplia gamma de gens que codifiquen proteïnes antioxidants, molècules amb grups tiol i els seus enzims generadors, enzims destoxicants, i les proteïnes de resposta a l'estrès, la qual cosa pot contrarestar danys inflamatoris i oxidatius. Hi ha considerable evidència experimental que suggereix que la senyalització NRF2 juga un paper protector en les lesions renals que són causades per diverses condicions patològiques. A més, s'han observat en animals amb MRC que presenten un deteriorament de l'activitat NRF2 i la conseqüent repressió del gen diana. Per tant, una intervenció farmacològica d'activació de la senyalització de NRF2 pot ser beneficiosa en la protecció contra la disfunció renal en la MRC. S'ha vist que els activadors naturals NRF2, incloent el sulforafà, el resveratrol, la curcumina i l'aldehid cinàmic, així com un triterpenoide sintètic, el

metilbardoxolona, tenen un paper renoprotector. Aquestes noves substàncies podrien millorar la progressió de la MRC en prevenir l'EO i el manteniment de l'homeòstasi redox cel·lular (Choi, Kang, & Kwak, 2014).

## 4.2 Hemodiàlisi

L'hemodiàlisi (HD) és un procediment utilitzat com a part del maneig habitual de la MRC en les fases més avançades. Durant aquest procediment poden aparèixer alteracions o malalties que es consideren com un efecte secundari d'aquesta HD a llarg termini. Entre aquestes malalties, les més freqüents són les infeccions, les MCV, l'amiloïdosi per dipòsit de beta-2 microglobulina<sup>5</sup> i la malnutrició proteica. L'EO i la microinflamació són reconegudes com a les principals causes de totes les malalties relacionades amb la diàlisi (Libetta, Sepe, Esposito, Galli, & Dal Canton, 2011).

L'augment de l'EO en pacients en HD sembla ser degut, per una part, a un augment de la producció de RLL durant l'HD per la

---

<sup>5</sup> L'amiloïdosi per dipòsit de beta 2-microglobulina constitueix una complicació freqüent en els pacients amb insuficiència renal crònica tractats amb hemodiàlisi durant llargs períodes de temps (Monge Berruezo et al., 2003).

## *Introducció*

bioincompatibilitat de tractament i, per l'altra, a una reducció neta de molts antioxidants, ja que l'HD és un procés no selectiu basat únicament en el pes molecular dels soluts; per tant, elimina productes de rebuig (toxines urèmiques) i substàncies essencials, és a dir, antioxidants hidrosolubles, com ara la vitamina C. (Libetta et al., 2011). El contacte de la sang amb la membrana de diàlisi pot conduir a l'activació de les cèl·lules mononuclears perifèriques (CMP) i a la generació d'ERO (J Himmelfarb, Ault, Holbrook, Leeber, & Hakim, 1993; Kosch et al., 2003). S'ha vist que l'activitat de la mieloperoxidasa (MPO) pot augmentar durant l'HD, especialment amb l'ús de membranes de diàlisi bioincompatibles (C. C. Wu et al., 2005). D'altra banda, l'heparina que s'utilitza habitualment per l'anticoagulació durant l'hemodiàlisi és coneguda per activar la MPO que condueix a una major producció d'ERO (Gritters et al., 2006). L'heparina administrada per via intravenosa també pot desplaçar la SOD extracel·lular (SOD-EC) de l'endoteli vascular (Faraci & Didion, 2004) ja que interfereix entre la unió de l'enzim antioxidant amb els heparansulfatproteoglicans C (a la membrana vascular). S'ha suggerit que la SOD-EC és el principal determinant de la biodisponibilitat d'òxid nítric en els vasos sanguinis i una pèrdua de la SOD-EC de la paret vascular pot contribuir a la disfunció endotelial (Fukai, Folz, Landmesser, & Harrison, 2002). A més, l'àcid ascòrbic (Vitamina C) present al plasma i l'alfa-tocoferol liposoluble (Vitamina E), dos dels components més potents del sistema de defensa antioxidant, es redueixen significativament després d'una sola sessió d'hemodiàlisi (Jackson, Loughrey, Lightbody, McNamee, & Young, 1995; Morena et al., 2002; Sullivan & Eisenstein, 1970). No obstant això, s'ha vist que el procediment d'hemodiàlisi té efectes

beneficiosos sobre la capacitat antioxidant total del plasma, ja que n'augmenta el contingut de tiols (Gosmanova & Le, 2011).

Estudis recents busquen noves membranes de diàlisi que permetin minimitzar l'augment d'EO associat al procés d'HD i s'estan aconseguint bons resultats com la membrana Vite-PS, que durant un període curt d'HD millora els mecanismes de defensa antioxidants eritròcits i sembla conduir a una reducció de les necessitats d'EPO en aquests pacients (Bargnoux et al., 2013).

## 5. Metabolòmica i malaltia renal crònica

La MRC representa un gran desafiament per als sistemes de salut públics (Brück et al., 2016). Els biomarcadors clínics tradicionals (urea en sang i creatinina sèrica) de la funció renal no són prou sensibles o específics i només augmenten significativament quan la MRC es troba en fases avançades. Per tant, es necessiten biomarcadors més sensibles i primerencs de la MRC. Biomarcadors específics per a cada fase, en una etapa primerenca de la malaltia, i el diagnòstic precoç de la malaltia renal permetrien millorar el tractament terapèutic i la reducció de les càrregues personals i econòmiques.

Els metabòlits representen els productes finals del genoma i el proteoma. La metabolòmica vol proporcionar un fenotip fisiològic



## *Introducció*

integrat d'un sistema, aquest perfil metabolòmic implica una mesura completa dels tipus i les concentracions de metabòlits en un sistema en un moment i una situació determinada. Un perfil de metabòlits pot proporcionar les dades necessàries per a un bon diagnòstic, l'estratificació del risc, el tractament i l'avaluació de la resposta al tractament dels pacients; el pronòstic és el desafiament actual. Això pot aconseguir a través de la identificació de biomarcadors individuals, com en els mètodes més tradicionals, o més probablement per la identificació de patrons a través de molts metabòlits (Shah et al., 2013).

La metabolòmica es pot fer servir de manera més dirigida cap a un grup de metabòlits quan hi ha una sospita del que es voldria detectar o be un enfocament no dirigit on es realitza un anàlisi exhaustiu de tots els metabòlits mesurables en una mostra sense cap tipus de biaix i s'utilitza normalment només per al descobriment de nous biomarcadors (Darshi, Van Espen, & Sharma, 2016).

Les tècniques més emprades per a l'anàlisi del perfil metabolòmic són la ressonància magnètica nuclear (RMN) de protó o de carboni 13 i l'espectroscòpia de masses acoblada amb cromatografia de gasos o líquida. En aquestes tèctiques es poden analitzar mostres, com ara orina, plasma de sang o sèrum, teixits o extractes de cèl·lules. Les dades obtingudes s'han d'analitzar posteriorment mitjançant models estadístics univariants i multivariants per identificar biomarcadors estadísticament significatius associats amb la malaltia. Els avenços en l'espectroscòpia de RMN i de masses ofereixen especificitat i

sensibilitat i això ha millorat la utilitat de l'anàlisi de metabòlits (Darshi et al., 2016).

L'aplicació de la metabolòmica en la investigació en el camp de la nefrologia s'ha expandit des de les primeres anàlisis de la urèmia fins a estudis transversals i longitudinals de les etapes primerenques de la malaltia renal (Zhao, 2013). Tot i que aquests estudis han proposat diversos marcadors potencials d'aparició i progressió de la MRC, la manca de coincidència en els metabòlits detectats ha limitat la capacitat de sintetitzar els resultats entre els grups.

En MRCs s'ha vist alterat el metabolisme de la dimetilarginina, el triptòfan i el cicle de la urea com als més importants (Breit & Weinberger, 2016). En estadis avançats de la malaltia s'ha vist que es troben augmentats els nivells de dimetilarginina simètrica (SDMA) amb un conseqüent augment de citrul·lina (Duranton et al., 2014). Estudis transversals demostren que el metabolisme del triptòfan també es troba alterat, de manera que els MRCs amb fases avançades de la malaltia presenten nivells significativament més baixos de triptòfan sèric (Duranton et al., 2014; Goek et al., 2012). Hi ha autors que valoren relacions entre metabòlits com citrul·lina/arginina, significativament elevat en malalts amb MRC, o la relació fenilalanina/tirosina com a possibles biomarcadors de la malaltia (Breit & Weinberger, 2016). Inclús s'ha relacionat l'EO amb canvis en determinats metabòlits com és el cas de la tirosina, on nivells elevats d'EO impedirien el pas de fenilalanina a tirosina per oxidació d'un cofactor imprescindible per a la reacció de transformació de la fenilalanina a tirosina. Això provoca que els nivells sèrics de la

## *Introducció*

fenilalanina i la tirosina estiguin alterats en els MRC (Duranton et al., 2014)

No hi ha gaires publicacions de treballs en els quals es valori el perfil metabolòmic dels pacients amb MRC i la seva relació amb les característiques clíniques associades (Boudonck et al., 2009; Rhee et al., 2010). No obstant, gràcies a la metabolòmica diferents autors han descrit que canvis en la glucosa, hormones esteroides, purines, NO, triptòfan, així com en el metabolisme lipídic estan associats amb les diferents etapes de la MRC (Scheffold et al., 2009; Shah et al., 2013). També s'han reportat alteracions en la via NO (és a dir, augment d'ADMA i SDMA i la disminució de l'ornitina amb l'augment de les etapes de la malaltia renal crònica) en plasma mitjançant l'aplicació de tècniques de UPLC- i CE-MS (Shah et al., 2013; Toyohara et al., 2010). Aquestes alteracions poden reflectir una alteració de la biodisponibilitat de NO que posteriorment es promouria la càrrega arterioscleròtica. Una altra característica interessant de les investigacions metabolòmiques a la MRC és l'esgotament de triptòfan acompanyat d'un augment de diversos metabòlits de triptòfan, tals com quinurenina, àcid quinurènic i sulfat de indoxil (Scheffold et al., 2009; Toyohara et al., 2010). Una disminució de triptòfan i un augment de quinurenina i àcid quinurènic poden reflectir una activitat augmentada de la indoleamin-2,3-dioxigenasa, que és un component essencial de la inactivació de cèl·lules T. El sulfat de indoxil és un metabòlit triptòfan derivat dels bacteris de l'intestí que s'ha implicat en la disfunció de les cèl·lules tubulars. L'Indoxil sulfat desregula el transportador renal específic d'anions orgànics (OAT), SLCO4C1, (Atzler, Schwedhelm, & Zeller, 2014). El guanidinosuccinat és un substrat

conegut per SLCO4C1, i altres anions carboxilat que s'han vist augmentat en pacients amb MRC.

La metabolòmica també ha estat molt utilitzada per estudiar els perfils metabolòmics dels malalts amb nefropaties diabètiques. Es coneixen biomarcadors metabolòmics de la diabetis, majoritàriament relacionats amb el metabolisme del sucre, com l'1,5-anhidroglucoitol, cossos cetònics, com el 3-hidroxiabutirat, àcids grassos lliures i aminoàcids de cadena ramificada; tots ells han estat replicats en estudis de metabolòmica multiplataforma en malalts diabètics (Han et al., 2011; Suhre et al., 2010). No obstant això, és molt més difícil de discriminar metabòlits relacionats amb la progressió de la malaltia renal en pacients diabètics. S'han identificat fosfolípids, esfingolípids i diferents esfingomielines en sèrum i plasma de pacients amb ND i en pacients diabètics tipus 1 i 2. També s'ha observat que un augment de acilcarnitines i una disminució d'hipurat en l'orina estan associats amb el dany renal primerenc, el que reflecteix les alteracions en la  $\beta$ -oxidació i l'eliminació de toxines urèmica, respectivament (van der Kloet et al., 2012). En pacients amb nefropatia per IgA i nefropatia membranosa s'han caracteritzat per pertorbacions en el cicle de Krebs, alteració en valors de cis-aconitat, augment de la degradació de proteïnes, alteració en valors tirosina, així com el metabolisme de lípids, alteració en nivells de fosfatidilcolines (Gao et al., 2012). A la taula 2 es mostren els metabòlits més representatius i les rutes metabòliques afectades detectats en altres estudis.

La metabolòmica també s'ha fet servir per estudiar la progressió de la MRC. En aquest sentit s'ha vist que ERT és l'etapa final de la malaltia renal crònica.

## Introducció

Taula 2: Resum dels metabòlits afectats en la MRC detectats per metabolòmica

| Metabòlits detectats   | Ruta metabòlica afectada                                    |
|--|---|
| creatinina (↑), acid aspartic (↑), citrul·lina (↑) simetric dimetil arginina (↑), kinurenina (↑), àcid azelaic (↓) | Cicle de la urea, metabolisme del triptòfan                 |
| acid araquidònic (↑), acids grassos no esterificats (↑)  | Inflamació  |
| butenoilcarnitina (↑), histidina (↓), glutamina (↓) i tirosina(↓)  | Oxidació dels acids grassos i metabolisme dels aminoàcids   |
| glicina (↑), dimetilglicina (↑), citrul·lina (↑)   | Metabolisme dels aminoàcids i de l'arginina i la creatinina |
| malat (↑), isocitrat (↑), succinat (↑), acid cítric (↓), 3-hidroxibutirat (↓), 2-metil acetoacetat (↓),            | Cicle dels acids tricarboxílics                             |

Adaptat de (Darshi et al., 2016)

S'ha relacionat a l'àcid p-hidroxi hipúric amb la progressió de la MRC ja que és capaç d'inhibir el transportador transmembrana a nivell tubular de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Jankowski et al., 2001) Amb la progressió de la MRC es produeix una activació neurohormonal i una alteració de la biodisponibilitat de NO, reflectits per l'augment de les concentracions plasmàtiques de norepinefrina, dopamina i metabòlits de serotonina, així com l'augment de les concentracions d'ADMA / SDMA (Rhee et al., 2010). Altres investigadors han trobat un augment del nucleòsids i els seus metabòlits (és a dir, hipo-xantina, (1-metil)iosina i guanosina), probablement indicatiu d'hipòxia cel·lular en pacients en hemodiàlisi. La diàlisi peritoneal es caracteritza per un augment de la glucosa i altres metabòlits dels sucres, probablement atribuïble al contingut de glucosa de la solució utilitzada durant la diàlisi.

Mentre que l'evidència epidemiològica de la relació entre la funció renal i els metabòlits s'origina a partir d'estudis transversals, les dades de cohorts longitudinals són escasses. En dos estudis recents s'ha identificat l'espermidina, la colina, la citrul·lina i la relació de diferents fosfocolines i la relació quinurenina/triptòfan com a marcadors primerencs de MRC (Rhee et al., 2013). La relació entre quinurenina/triptòfan reflecteix un augment de l'activitat indolamin-2,3-dioxigenasa que possiblement indica un procés inflamatori subclínic relacionada amb l'aterosclerosi (Scheffold et al., 2009).

Un altre repte és el diagnòstic i tractament de la insuficiència renal. En els últims anys, diversos estudis s'han centrat en derivats d'arginina com a candidats prometedors per identificar individus en situació de risc de patir MRC, així com per orientar el tractament en malalties renals.

El perfil metabolòmic pot ser font d'informació també per avaluar l'estat oxidatiu i antioxidant del malalt i preveure les conseqüències clíniques d'aquest desequilibri i les necessitats farmacològiques que hi poden estar associades. No hi ha gairestreballs en els quals es relacioni el perfil metabolòmic amb l'estat oxidatiu vinculat a la malaltia renal. Alguns autors han estudiat aquesta relació i s'ha vist que podria haver una ruta en comú, la ruta de les AMP quinases que uniria l'EO amb rutes del metabolisme de la glucosa (Sharma, 2014) i en recerca bàsica s'ha vist que l'EO i el metabolisme energètic, d'aminoàcids i de proteïnes i de la colina podrien ser considerats nexes d'unió entre MRC i disfunció orgànica extra renal (Liu et al., 2014).



*Hipòtesi i objectius*



# Hipòtesi i objectius



## *Hipòtesi i objectius*

## Hipòtesi d'estudi

L'estudi de l'EO i el perfil metabòlic en la malaltia renal crònica permetrà identificar un possible biomarcador diferencial per a cada grau, etiologia i/o alteració concomitant.

## Objectius

- 1.- Comparar l'estat oxidatiu d'un grup de MRCs no dialitzats, dialitzats i un grup de controls sans.
- 2.- Estudiar l'estrès oxidatiu de MRCs en relació amb la seva etiologia.
- 3.- Estudiar l'estrès oxidatiu de MRCs en relació amb les alteracions concomitants de la malaltia.
- 4.- Comparar el perfil metabòlic dels MRCs dialitzats amb el dels controls sans.
- 5.- Estudiar la relació entre l'etiologia de la MRC i el perfil metabòlic.
- 6.- Estudiar la relació entre les alteracions concomitants de la MRC i el perfil metabòlic.
- 7.- Estudiar la relació entre l'estrès oxidatiu i el perfil metabòlic.







# 1. Disseny de l'estudi

## 1.1 Tipus d'estudi

El present treball es tracta d'un estudi clínic observacional transversal per valorar paràmetres d'EO de tres grups de subjectes: un grup amb malalts renals crònics no dialitzats, un altre grup amb malalts crònics dialitzats i un grup amb subjectes sans, que serà el grup control. També es valora el perfil metabolòmic de dos grups: el grup de malalts crònics dialitzats i el grup amb subjectes sans, que serà el grup control. Aquests subjectes pertanyen a tres estudis diferents: CMF (Prats et al., 2014), LSB (Muñoz-Cortés et al., 2013), i PASMED (Pedret et al., 2012), respectivament.

## 1.2 Ètica

Tots els pacients van donar el seu consentiment informat i autorització per utilitzar les dades per a posteriors estudis i van ser aprovats pels comitès d'ètica d'investigació clínica de l'Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII (CMF i LSB) i el de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus (PASMED).

## *Material i mètodes*

# 2. Població d'estudi

## 2.1 Voluntaris sans. Controls

Els subjectes del grup control es van reclutar a l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus del març al juliol de 2008 i del febrer al juliol de 2009. Els subjectes elegibles van ser homes i dones sans d'entre 18 i 75 anys, no fumadors, que no prenen cap medicament o suplement alimentici. Es van excloure de l'estudi tots aquells subjectes amb colesterol LDL >189 mg/dL, triglicèrids (TG) >350 mg/dl, índex de massa corporal (IMC) >30 kg/m<sup>2</sup>, alcoholisme crònic, amb història de malaltia cardiovascular, amb diabetis, amb malaltia renal o qualsevol altra malaltia amb requeriments nutricionals especials, amb història de malaltia gastrointestinal, amb síndrome depressiva o amb anèmia (hemoglobina en dones ≤12 g/dL i en homes ≤14 g/dL). A aquests subjectes se'ls va considerar el grup control.

A tots els integrants, se'ls va fer una extracció de sang per valorar paràmetres d'EO i l'anàlisi del perfil metabòlic mitjançant tècniques de metabòlica, tal com s'indica més endavant.

## 2.2 Malalts renals crònics no dialitzats

Els subjectes MRCs no dialitzats van ser reclutats a les consultes externes de nefrologia de l'Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII de l'abril de 2010 fins a l'octubre de 2011. Els subjectes elegibles van

ser pacients amb edat superior als 18 anys i en fase 3-5 de MRC. Es van excloure de l'estudi els pacients que havien rebut tractament amb ferro en els tres mesos previs a l'estudi i/o transfusió de concentrat d'hematies i/o suplementes amb vitamina C o E.

A aquests pacients, se'ls va fer una extracció de sang per valorar els paràmetres d'EO, tal com s'explica més endavant.

### 2.3 Malalts renals crònics dialitzats

Els MRCs dialitzats van ser reclutats de la població total de pacients en tractament d'hemodiàlisi (HD) dels centres: Llevant de Tarragona, Reus Medical de Reus, Unitat Mixta d'Hemodiàlisi de l'Alt Camp i la Conca de Barberà de Valls, Unitat d'Assistència Nefrològica de l'Hospital de Jesús de Tortosa i del Servei de Nefrologia de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona del juliol al desembre de 2009. Els subjectes elegibles van ser pacients d'edats entre 40-65 anys i en hemodiàlisi durant més de tres mesos. Es van excloure tots els pacients amb alteracions mentals com depressió, demència o presa de fàrmacs psicòtrops.

A aquests voluntaris, se'ls va fer una extracció de sang per valorar els paràmetres d'EO i el perfil metabòlic mitjançant tècniques de metabòlica, tal com s'indica més endavant.



## *Material i mètodes*

# 3. Variables d'estudi

## 3.1 Variables clíniques

Es van registrar dades de tots els subjectes com són el sexe i l'edat, presència de diabetis, hipertensió arterial, dislipèmia, malaltia cardiovascular i consum de tabac. A més, dels subjectes MRCs dialitzats i no dialitzats, es van registrar dades de la història clínica com l'origen de la nefropatia: vascular, glomerular, diabètica o intersticial/quística. La presència de LSB es va determinar mitjançant una RMN cerebral segons la metodologia descrita en un estudi previ (Martinez-Vea et al., 2006)

## 3.2 Extracció i processament de les mostres

Es va fer una extracció de sang a tots els subjectes d'estudi mitjançant una punció venosa. La sang es va recollir en tubs d'EDTA, d'heparina-liti i de sèrum per determinar les diferents variables d'estudi. Es van extreure en tubs diferents per adequar a la tècnica.

A la sang sencera es va determinar l'hematòcrit (HTC) i l'hemoglobina (Hb).

L'hematòcrit es va valorar mitjançant la separació del plasma i els eritròcits del tub d'heparina-liti per centrifugació (8064 xg) en capil·lars. Els resultats es van expressar com a percentatge del volum

## *Material i mètodes*

que ocupen els eritròcits respecte del volum total. Per a la determinació d'hemoglobina total es va utilitzar la reacció de Drabkin (Drabkin & Austin, 1935). El reactiu de Drabkin (QCA ref. 994933) oxida l'hemoglobina a cianometahemoglobina que pot detectar-se en un espectrofotòmetre a 540 nm. Els resultats es van expressar amb grams d'Hb per cada 100 ml de sang. La determinació de l'Hb té com a objectiu poder referir tots els altres paràmetres per gram d'Hb.

El plasma i els eritròcits dels tubs d'EDTA i heparina-liti es van separar per centrifugació durant 15 minuts a 850 xg i a 4 °C. El plasma sobrenedant es va extreure tenint en compte de no aspirar la capa fina de leucòcits que el separa dels eritròcits. Els leucòcits es van descartar. Els eritròcits es van rentar dues vegades amb sèrum fisiològic per centrifugació durant 5 minuts a 1300 xg i a 4 °C.

Es van aliquotar el plasma i els eritròcits en tubs d'Eppendorf i es van emmagatzemar a -80 °C per a la seva posterior anàlisi.

Per a la separació del sèrum de la sang, es va deixar coagular la sang a temperatura ambient i es va centrifugar durant 15 min a 1700 xg i a 20 °C. Es va extreure el sèrum amb cura de no arrossegar coàgul. El sèrum es va emmagatzemar a -80 °C per a la posterior anàlisi del perfil metabolòmic.

## Material i mètodes

### 3.3 Paràmetres d'estrès oxidatiu

Per a l'estudi de l'estrès oxidatiu es van valorar activitats d'enzims antioxidants, el sistema glutatió; i es va determinar la capacitat antioxidant total, així com el dany a proteïnes i lípids, tal com s'especifica a continuació:

#### Determinació d'enzims antioxidants

##### Catalasa

Per determinar l'activitat de la CAT es va utilitzar el mètode descrit per Cohen i col·laboradors (Cohen, Dembiec, & Marcus, 1970). Aquest mètode és una mesura indirecta de l'activitat de la CAT mitjançant la determinació de la degradació de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , duta a terme per la CAT present a la mostra.

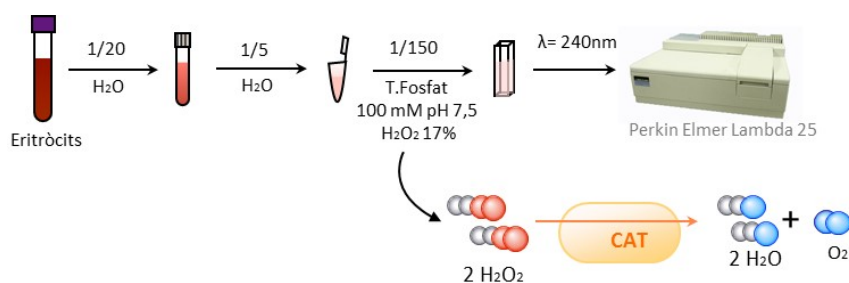
La mostra es va preparar prèviament de manera que la determinació es va realitzar a partir de l'hemolisat dels eritròcits (1:20) provinent del tub d'EDTA. Aquest hemolisat es va diluir 1:5 amb aigua destil·lada.

En una cubeta de quars es va barrejar la solució de tampó fosfat potàssic 100 mM a un pH de 7,5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de Panreac 121509.1210 i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  de Panreac 141512.1210) amb  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peròxid d'hidrogen de Merk ref. 8.599) al 17% (dilució 1:150) amb mostra (figura 3). Es va determinar el grau de desaparició del peròxid d'hidrogen en els

## Material i mètodes

primers 30 s. Per fer-ho, es va utilitzar un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 25) amb lectura a 240 nm. Es va calcular el decrement/minut i els resultats es van expressar en mmol/min/gHb, fent referència als mmols d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transformats.

Figura 3: Fonament i procediment per a la determinació de la CAT



A partir de l'extracció d'eritròcits de la sang sencera, es realitza un lisat dels eritròcits per poder extreure la fracció que conté l'enzim CAT de la mostra. Un cop lisats s'afegeix l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i es fa la lectura de la desaparició d'aquest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a l'espectrofotòmetre a 240 nm.

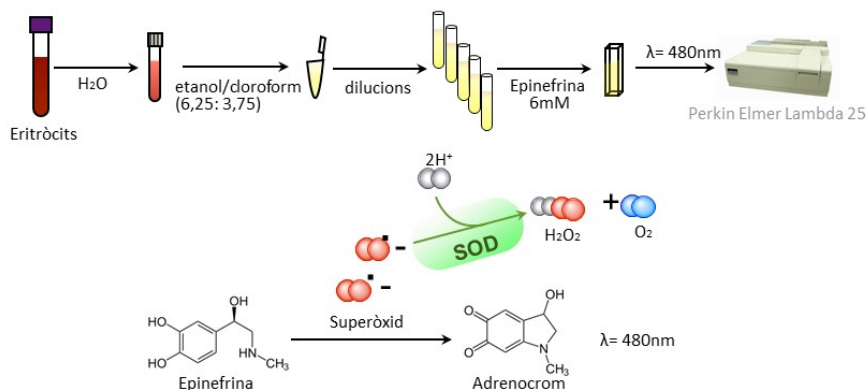
## Superòxid-dismutasa

La determinació de l'activitat enzimàtica de la SOD eritrocitària es va dur a terme mitjançant el mètode de Misra i Fridovich (Misra & Fridovich, 1972). Aquest mètode es basa en la determinació espectrofotomètrica d'un adrenocrom, a una longitud d'ona de 480 nm, que és producte d'oxidació de l'epinefrina en presència de superòxids. La SOD elimina els superòxids i els transforma en peròxid d'hidrogen i oxigen, de manera que evita la formació de l'adrenocrom (figura 4).

## Material i mètodes

Abans de realitzar la determinació es va tractar la mostra per extreure la SOD dels eritròcits del tub d'EDTA. Per això, es va congelar i descongelar dues vegades per afavorir el trencament de les membranes dels eritròcits. Un cop descongelada per segona vegada s'hi va afegir aigua destil·lada freda i es va homogeneïtzar suaument. A aquesta barreja es va afegir etanol/cloroform (6,25: 3,75), i es va agitar enèrgicament durant 2 minuts. Es va centrifugar durant 5 minuts a 1900 xg a 4 °C. Es va separar el sobrenedant i es va guardar en fred per a la seva posterior anàlisi.

Figura 4: Fonament i procediment per a la determinació de la SOD



A partir de l'extracció d'eritròcits de la sang sencera, es realitza un lisat dels eritròcits i una extracció amb etanol/cloroform per poder extreure la SOD de la mostra. Es fan un seguit de dilucions, s'afegeix l'epinefrina i es mesura a 480 nm a l'espectrofotòmetre. Amb els resultats obtinguts es fa una corba per trobar la concentració que inhibeix el 50% de la formació de l'adrenocrom.

Per a la determinació de l'activitat de la SOD es necessita una solució d'epinefrina 6 mM (Sigma ref. E4375) en HCL 1 mM (Panreac ref.

## Material i mètodes

131.020). Aquesta solució es va mantenir en fred perquè l'experiment sigui reproducible durant tot el temps d'avaluació.

Abans d'analitzar les mostres es va avaluar la corba d'autooxidació de l'epinefrina. Per això es va barrejar el tampó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck ref.6392)- $\text{NaHCO}_3$  (Probus ref.2030) 50 mM pH 10,2 EDTA (Titriplex®III Merck ref.8418.0100) 0,1 mM amb aigua bidestil·lada i epinefrina 6 mM (Sigma ref.E-4375) en HCl 1 mM. La lectura es va fer cada 40 s i durant 23 min a 30 °C en un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2) a 480 nm. Seguidament es van fer les dilucions apropiades de la mostra per trobar la concentració que inhibeix el 50% de la formació de l'adrenocrom ( $I_{50}$ ) (en aquest cas es van realitzar les dilucions: 1/100, 1/50, 1/25, 3/50, 2/25).

Per al càlcul de la  $I_{50}$  es va fer una regressió lineal i logarítmica de la representació del percentatge d'activitat respecte als mg Hb/mL eritròcits de cada mostra. Es va extrapolar el 50% d'activitat, a la regressió que millor es va ajustar a la recta o al logaritme, per conèixer quina concentració va donar aquesta inhibició del 50% i, un cop coneguda, els resultats es van expressar com U/g Hb, on una U (unitat) és la quantitat de proteïna que inhibeix en un 50% la transformació de l'epinefrina en adrenocrom.

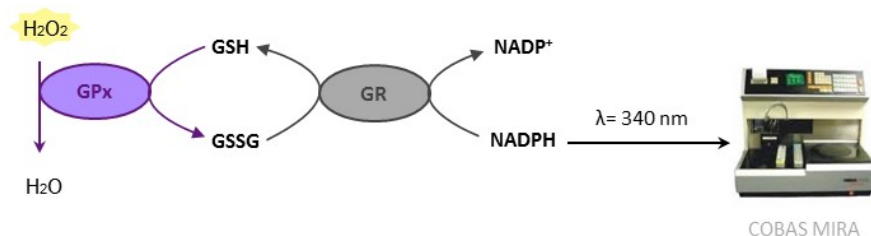
## Glutació peroxidasa

La glutació peroxidasa (GPx) es va determinar segons el mètode descrit per Wheeler *et al.* (Wheeler, Salzman, Elsayed, Omaye, & Korte Jr, 1990) en què es valora el nivell de desaparició del NADPH o  $\text{NADP}^+$ .

### Material i mètodes

Aquest enzim utilitza el glutatió reduït (GSH) per catalitzar la reducció de l'aigua oxigenada i dels hidroperòxids formant glutatió oxidat (GSSG). La seva eficàcia va lligada a la glutatió-reductasa (GR), la qual necessita NADPH per reduir el GSSG (figura 5).

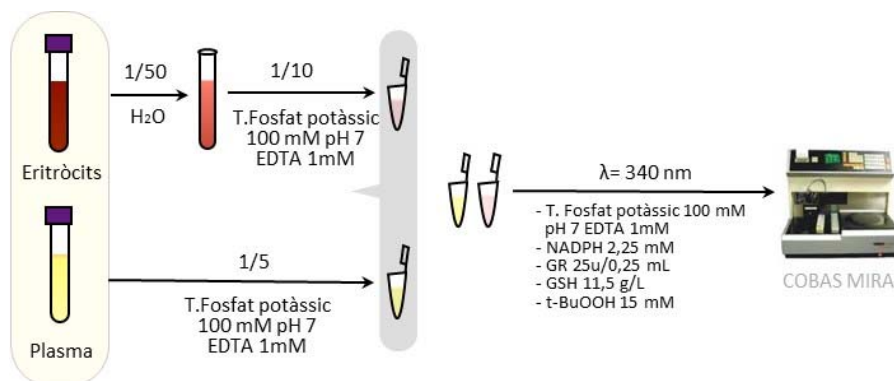
Figura 5: Fonament de la determinació de la GPx



L'eliminació del peroxid d'hidrogen pel sistema GPx/GR implica l'oxidació del glutatió reduït i la posterior recuperació d'aquest glutatió amb la despesa de NADPH que es pot mesurar a 340 nm en un espectròmetre automatitzat. **GPx**: glutatió peroxidasa, **GR**: glutatió-reductasa, **GSSG**: glutatió oxidat, **GSH**: glutatió reduït, **NADP<sup>+</sup>**: nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat oxidat, **NADPH**: nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduït.

La mostra es va preparar prèviament de manera que la determinació es va realitzar a partir de l'hemolisat dels eritròcits (1:20) provinent del tub d'EDTA. Aquest hemolisat es va diluir 1:5 amb aigua destil·lada. Es va afegir NADPH (Sigma ref. N7505 25 MG), GSH (Sigma ref. 64.251-106045K0693) i GR (Sigma ref. G3664-500 UN 060M7405), aportant una U de GR per cubeta. Després d'incubar-lo 5 min a 37 °C es va afegir un hidroperòxid, el t-BuOOH (tert-butilhidroperòxid) (Sigma ref. 458139). En aquestes condicions la GPx redueix l'aigua oxigenada i els peròxids i produeix una desaparició de NADPH del medi. Aquesta desaparició es va mesurar cada minut durant 5 minuts a l'autoanaltzador COBAS Mira a 340 nm (figura 6). Els resultats es van expressar en mmol/min/g Hb.

Figura 6: Procediment per a la determinació de la GPx



La GPx es pot determinar en plasma i en eritròcits hemolisats. En tots dos casos cal afegir NADPH, GR i GSH juntament amb un producteur de radicals com és el t-BuOOH. El que es mesura és la desaparició d'aquest NADPH per acció de la GR que redueix el glutatió oxidat format en eliminar el t-BuOOH per la GPx. La lectura es fa a 340 nm en un autoanàlitzador.

### Sistema glutatió: glutatió reduït i oxidat

La determinació es va realitzar segons el mètode de Hissin i Hilf (Hissin & Hilf, 1976). La mostra provinent dels eritròcits del tub d'EDTA es va hemolisar (1:20). Aquest hemolisat es va diluir 1:5 amb aigua destil·lada i es va mantenir congelat en un medi àcid fins a la determinació. Per determinar el glutatió reduït (GSH) i oxidat (GSSG), tant en plasma com en eritròcits, es va afegir a les mostres TCA al 70% (àcid tricloroacètic Panreac 131067.1609) per precipitar les proteïnes que podrien interferir en la determinació. Després es va centrifugar per extreure'n aquestes proteïnes i es va conservar en un medi àcid evitant l'oxidació del GSH. Aquest procediment es va realitzar el dia de



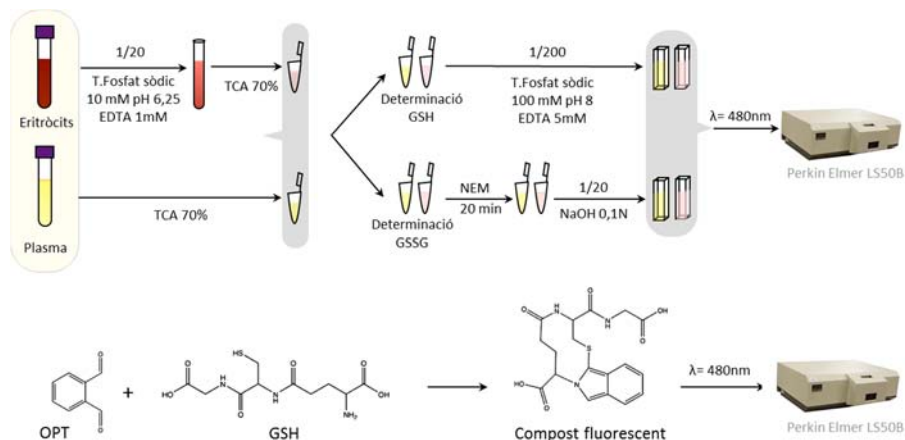
### *Material i mètodes*

l'extracció i es va emmagatzemar el sobrenedant a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fins a fer-ne l'anàlisi.

El GSH reacciona amb l'O-phtalaldehid (OPT Merck ref.11452) a un pH de 8. Abans de fer la determinació es va diluir la mostra 1:10 amb un tampó fosfat sòdic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Panreac ref. 131679 -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Panreac ref. 131677) pH 8 100 mM i EDTA 5 mM. Es va fer una segona dilució, en aquest cas 1:20, a la cubeta de reacció amb mostra i tampó fosfat sòdic. S'hi va afegir l'OPT i després d'una incubació de 15 minuts es va fer la lectura al fluorímetre a una longitud d'ona d'excitació de 350 nm i 420 nm de longitud d'ona d'emissió (figura 7).

El GSSG també reacciona amb l'OPT i dóna fluorescència, però a pH 12. A pH 8, com ja s'ha comentat, el GSH reacciona amb l'OPT; ara bé, per sobre d'aquest pH, el GSH s'oxida i això ens faria augmentar el valor del GSSG. Per tant, el primer que es va fer per determinar el glutatió oxidat va ser incubar la mostra amb N-etil-maleïmida (NEM Merck ref. 1308) durant 25 minuts, la qual cosa en va impedir l'oxidació. Després es va diluir 1:10 amb el tampó NaOH 0,1 N que va aportar el pH bàsic desitjat. La mostra es va tornar a diluir, aquest cop 1:20, a la cubeta, es va afegir l'OPT i, després d'una incubació de 15 minuts, es va fer la lectura al fluorímetre amb les condicions ja descrites (figura 7). Els resultats es van expressar en  $\mu\text{mols/g Hb}$  i  $\text{nmols/ml plasma}$ , i la relació entre tots dos paràmetres es va calcular mitjançant el quocient entre el valor del GSSG i el del GSH. És important, en cada sessió, afegir un estàndard o una recta estàndard, que ens validi els resultats obtinguts per poder determinar la concentració de la mostra. Sempre que va ser possible es van fer totes les determinacions per duplicat.

Figura 7: Procediment i fonament per a la determinació del GSH i GSSG



Per determinar el glutatió reduït (GSH) i oxidat (GSSG), tant en plasma com en eritròcits, cal afegir a les mostres TCA al 70% per precipitar les proteïnes plasmàtiques. El GSH i el GSSG de les mostres es fan reaccionar amb l'O-phtalaldehid durant 15 minuts (OPT) la qual cosa dóna lloc a una molècula fluorescent que pot mesurar-se amb un espectrofluorímetre a 350 nm d'excitació i 420 nm d'emissió. El GSH dóna fluorescència a pH 8 i el GSSG a pH 12. Atès que el GSH s'oxida a GSSG a pH 12, per a la determinació de GSSG cal afegir al medi N-metilmaleimida (NEM) per evitar aquesta oxidació.

## Capacitat antioxidant total

### ORAC i ORAC NP

Les sigles ORAC provenen de l'anglès «*oxygen radical absorption capacity*». Amb aquesta tècnica es valora la capacitat d'una mostra per absorbir radicals peroxils (ROO·) (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). Una variant d'aquesta determinació és l'ORAC NP (NP: no proteic) en la qual es valora la capacitat antioxidant de la mostra que prèviament ha

### *Material i mètodes*

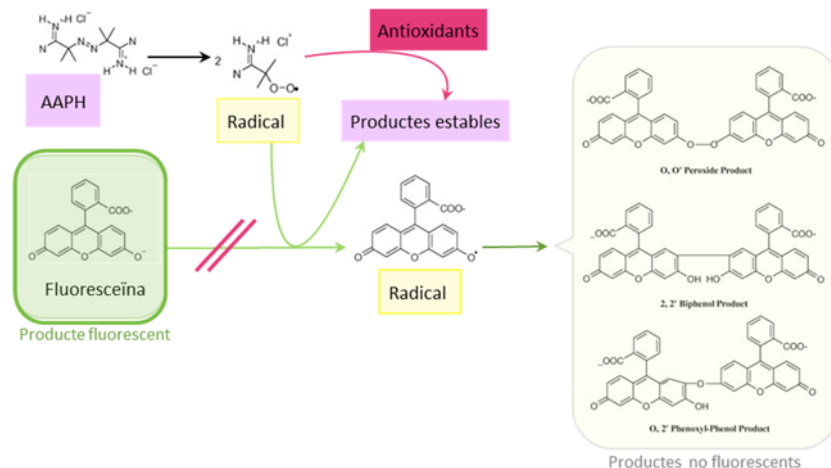
estat tractada per tal d'eliminar les proteïnes. Així, es pot valorar la capacitat antioxidant de les molècules no proteïques presents a la mostra. El procediment és el mateix per a l'ORAC que per a l'ORAC NP.

L'ORAC mesura la disminució de la fluorescència de la fluoresceïna sòdica (FL) (48 nM, ref. Aldrich 16,630-8) en ser danyada per les espècies reactives de l'oxigen (figura 8). Com més capacitat antioxidant té la mostra, més es manté la fluorescència en el temps. El trolox és un anàleg de la vitamina E, i es fa servir per establir la recta patró i per poder extrapolar la capacitat antioxidant de la mostra.

Juntament amb les mostres també es va mesurar el blanc (FL 48 nM, AAPH 0,384 M i tampó fosfat potàssic 75 mM pH 7,4) per establir la pèrdua màxima de fluorescència de la FL a través dels radicals peroxil generats per l'AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)dihidroclorur 0,384 M, ref. Aldrich 44,091-4) sense la presència de substàncies prooxidants o antioxidants a la cubeta. Al mateix temps, es va mesurar una recta patró de trolox (Àcid 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílic, Sigma ref. 23,881-3) que va ser utilitzada per referenciar els resultats expressats en mmol de TE (equivalents en trolox)/mL plasma (figura 9).

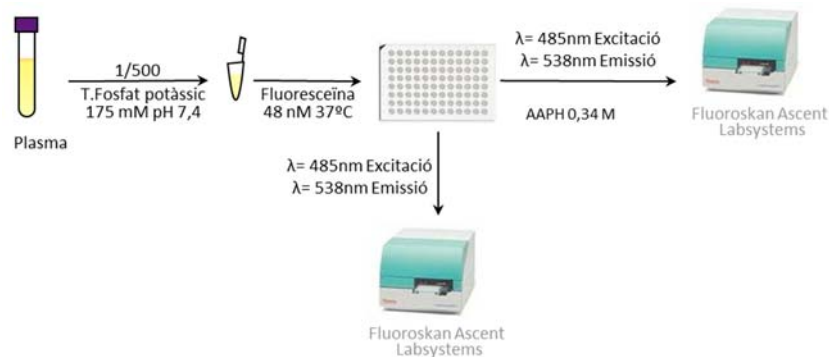
Es va determinar la capacitat antioxidant de les mostres de plasma durant dues hores a intervals d'un minut i es va mesurar la fluorescència en un espectrofluorímetre, lector de plaques Fluoroskan Ascent Labsystems, a una longitud d'ona d'excitació de 485 nm i d'emissió de 538 nm.

Figura 8: Fonament de l'ORAC



Amb aquesta tècnica es determina la capacitat d'una mostra per atrapar radicals peroxils (ROO-) induïts per 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano) dihidroclorur (AAPH) mitjançant la mesura de la disminució de la fluorescència de la fluoresceïna en ser danyada per aquests radicals. La fluoresceïna és un producte fluorescent que si es troba amb un radical reacciona i dona lloc a un altre radical que en combinar-se donarà productes no fluorescents. Si al medi hi ha antioxidants que captin els radicals, la fluoresceïna no serà danyada i es mantindrà la fluorescència.

Figura 9: Procediment per a la determinació de l'ORAC



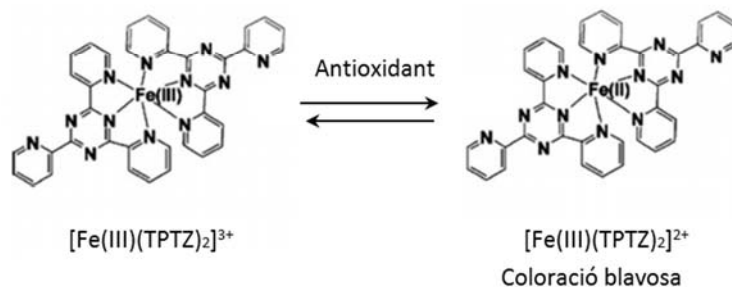
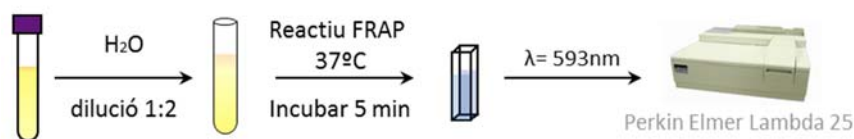
Per determinar la capacitat antioxidant total mitjançant el mètode ORAC, cal afegir a la mostra de plasma diluïda la fluoresceïna. La lectura es fa per duplicat, una sense afegir cap prooxidant i una altra amb l'oxidant AAPH. Les lectures es fan en un fluoroskan a 485 nm d'excitació i a 538 nm d'emissió.

## Material i mètodes

### FRAP

Les sigles FRAP provenen de l'anglès «*ferric reducing ability of plasma*». Amb aquesta tècnica es determina la capacitat antioxidant de la mostra per reduir el ferro del 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a pH baix produint un compost blau que pot quantificar-se per colorimetria a 593 nm (Benzie & Strain, 1996). La capacitat per reduir el ferro es considera un bon índex de poder antioxidant (figura 10).

Figura 10: Procediment i fonament de la tècnica del FRAP



El FRAP determina la capacitat antioxidant de la mostra per reduir el ferro del 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a pH baix produint un compost blau que pot quantificar-se per colorimetria a 593 nm (Benzie & Strain, 1996). Les mostres plasmàtiques es dilueixen 1:2 amb aigua destil·lada, s'addiciona el reactiu FRAP a 37 °C. Es deixen incubar 5 minuts a temperatura ambient i es llegeix a una longitud d'ona de 593 nm amb un espectrofotòmetre.

## Material i mètodes

Per a la determinació del FRAP les mostres plasmàtiques provinents del tub EDTA es van diluir 1:2 amb aigua destil·lada. A la mostra es va afegir el reactiu FRAP [100 mL de tampó acetat 0.3 M (acetat sòdic trihidratat Fluka ref. 71188 en àcid acètic glacial Fluka ref. 45726), 10 mL de TPTZ 10 mM (2,4,6-tripiridil-s-triazina Fluka ref. 93285) en HCl 40 mM (Panreac ref. 131020) i 10 mL de clorur fèrric 20 mM (clorur fèrric hexahidratat Fluka ref. 44944) en tampó acetat 0.3 M]] a 37 °C. Les cubetes es van barrejar per inversió tapades amb parafilm, i es van deixar incubar 5 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es va realitzar la lectura a una longitud d'ona de 593 nm amb un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 25).

Els resultats finals de l'assaig es van obtenir de l'extrapolació de l'absorbància de la mostra amb la del trolox a diferents concentracions (1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 i 0.05 mM) i es van expressar en mmol TE (trolox equivalent)/mL plasma.

## Dany oxidatiu

### Carbonilació proteica

Per la mesura del dany oxidatiu a proteïnes es va escollir la determinació dels seus nivells de carbonilació mitjançant el mètode descrit per Levine i col·laboradors (Levine et al., 1990) amb les variacions introduïdes per Coto-Montes i Hardeland (Coto-Montes & Hardeland, 1999).

### *Material i mètodes*

La introducció de grups carbonil en els residus aminoacídics de les proteïnes és un indicador de modificació oxidativa. La reacció d'aquests grups amb agents carbonilats proporciona un mètode per detectar i quantificar l'oxidació de proteïnes catalitzada per metalls.

La determinació es va dur a terme a partir d'una mostra de plasma provinent d'un tub d'heparina-liti diluïda 1/50 amb tampó fosfat sòdic 10 mM pH 2,3 a la qual es van afegir inhibidors de proteases (leupeptina 0,5 µg/mL Sigma L2023, aprotinina 0,5 µg/mL i pepsatina A 0,7 µg/mL Sigma P4265) per evitar la degradació proteica.

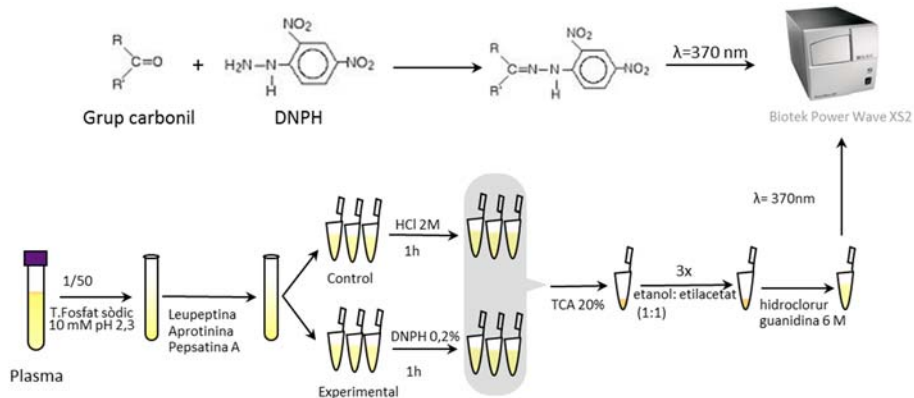
Per cada mostra es realitzen dos grups de determinacions. El primer serà el seu propi «control» i el segon, la prova «experimental».

Als «controls», es va afegir HCl 2M i als «experimentals», 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,2% preparat en HCl 2M. Es van incubar a temperatura ambient durant 1 hora mantenint l'agitació. A continuació es va afegir TCA al 20% a cada tub d'Eppendorf i es va centrifugar a 1700 xg durant 3 min per obtenir pèl·lets de proteïna. El sobrenedant es va aspirar acuradament i es va descartar. Els precipitats es van rentar tres vegades amb d'etanol:acetat d'etil (1:1) per eliminar DNPH sense reaccionar i restes de lípids. Finalment es va dissoldre el pèl·let de proteïna amb una solució 6 M d'hydroclorur de guanidina i es va incubar a 37 °C durant 15 min (figura 11).

El contingut de grups carbonils es va determinar realitzant una lectura a 370 nm en un espectrofotòmetre de plaques Biotek Power Wave XS2. A cada mostra, se li va restar el valor de la seva mostra «control». El contingut de grups carbonil es va calcular utilitzant un coeficient

d'absorció de 22.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Els resultats es van expressar en nmol/mg de proteïna.

Figura 11: Fonament i procediment per a la determinació del dany en proteïnes



La determinació es duu a terme a partir d'una mostra de plasma diluïda 1/50 amb tampó fosfat sòdic a la qual s'afegeixen inhibidors de proteases leupeptina, aprotinina i pepsatina A. Per a cada mostra es realitzen dos grups de triplicats. El primer serà el seu propi «control» i el segon la prova «experimental». Als «controls», se'ls afegeix HCl 2 M i als «experimentals», 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,2% preparat en HCl 2 M. S'incuba durant 1 hora en agitació. S'afegeix TCA al 20% a cada tub d'Eppendorf i es centrifuga a 11.000 rpm. Els precipitats es van rentar tres vegades amb d'etanol:acetat d'etil (1:1) per eliminar DNPH sense reaccionar i restes de lípids. Finalment, es dissol el pèl·let de proteïna amb una solució 6 M d'hidroclozur de guanidina i es llegeix a 370 nm en un espectrofotòmetre per tal de determinar la formació d'una molècula resultant de la reacció dels grups carbonils de les proteïnes danyades amb el DNPH.

Per poder expressar els resultats en mg de proteïna es va avaluar el contingut de proteïna mitjançant el mètode de Bradford (Bradford, 1976). Aquest mètode es basa en la formació d'un complex colorimètric, quantificable espectrofotomètricament, com a conseqüència de la unió de les proteïnes de la mostra amb el reactiu Bradford (Sigma ref. B6916). El reactiu de Bradford està format per un colorant hidrofòbic (blau de Coomassie G-250) que, en una solució aquosa i en presència d'àcid fosfòric, presenta una coloració



### *Material i mètodes*

marronosa. Quan aquest reactiu es troba amb un entorn hidrofòbic, com és el cas de l'interior de les proteïnes, canvia de color i adquireix una tonalitat blavosa intensa fàcilment quantificable.

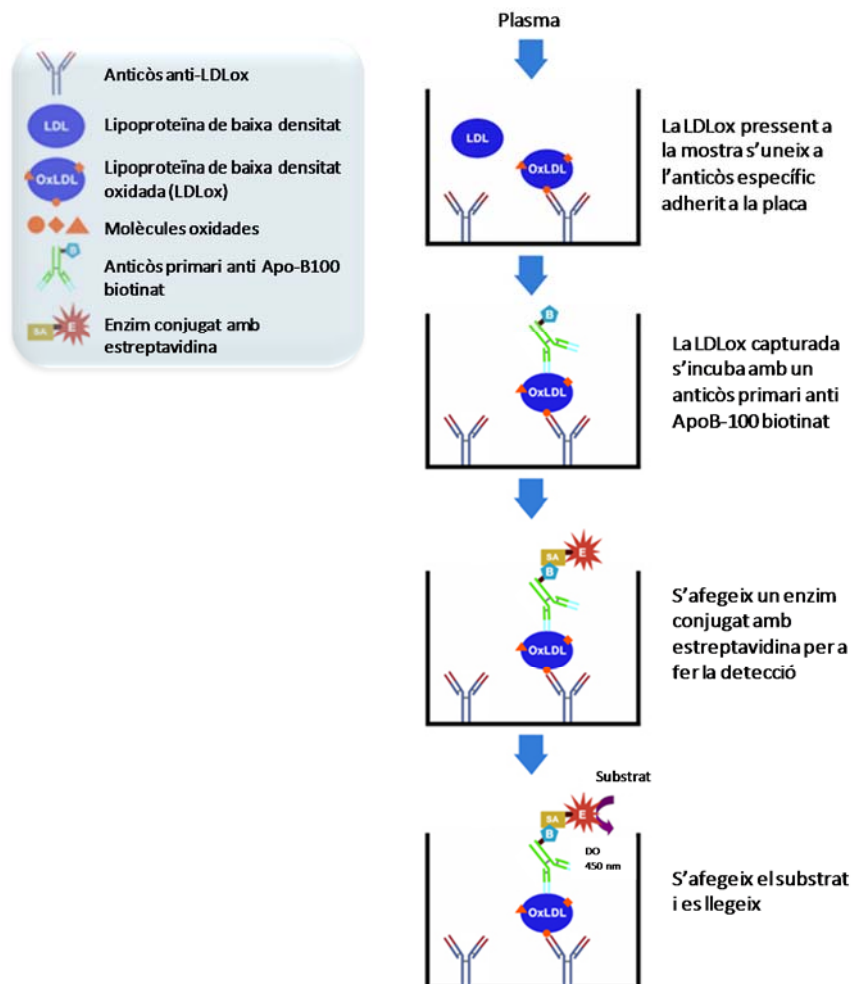
Les mostres plasmàtiques van ser diluïdes 1:100 amb aigua destil·lada i les lectures es van realitzar en un espectrofotòmetre Biowhittaker Kinetic-QCL, a una absorbància de 620 nm. L'absorbància, que és proporcional a la presència de proteïnes, es va comparar amb una recta patró d'albumina (QCA ref. 999523). Els resultats es van expressar en g proteïna per cada 100mL sang.

### *Oxidació de lípids. LDLox*

Per valorar el dany oxidatiu en lípids es va fer servir la determinació dels nivells de LDLox mitjançant un kit ELISA comercial Mercodia (ref. 10-1143-01).

Es tracta d'un immunoassaig directe en el qual hi ha un anticòs primari específic per detectar LDL oxidada preincubat a una placa al qual s'afegeix la mostra. Un cop es va incorporar la mostra es va afegir l'anticòs per LDLox conjugat amb biotina. A continuació es va afegir la solució d'avidina-HRP i després d'una incubació es va incorporar la solució de substrat de TMB (3,3',5,5'tetrametil-benzidina). D'aquesta manera només les mostres que contenien LDL oxidada van mostrar un canvi de color mesurable per espectrofotometria a una longitud d'ona de 450 nm en un lector de plaques Biotek Power Wave XS2 (figura 12). Els resultats es van expressar en U/L de plasma.

Figura 12: Fonament tècnica ELISA per a la detecció de LDLox



Immunoassaig directe en què, a un anticòs primari específic per detectar LDL oxidada lligat a una placa, se li afegeix la mostra. Tot seguit s'incorpora l'anticòs per LDLox conjugat amb biotina. A continuació s'afegeix la solució d'avidina-HRP i, després d'una incubació, s'incorpora la solució de substrat de TMB (3,3',5,5'tetrametil-benzidina). D'aquesta manera, només les mostres que contenen LDL oxidada mostren un canvi de color detectable per espectrofotometria a una longitud d'ona de 450 nm en un lector de plaques.

## Material i mètodes

### 3.4 Perfil metabolòmic

L'anàlisi no dirigit del perfil metabolòmic es va realitzar a:

- La mostra de sèrum sencera, en què es va determinar el contingut en lipoproteïnes.
- L'extracte aquós, en què es van determinar metabòlits de baix pes molecular.
- L'extracte lipídic, en què es va determinar el perfil lipídic.

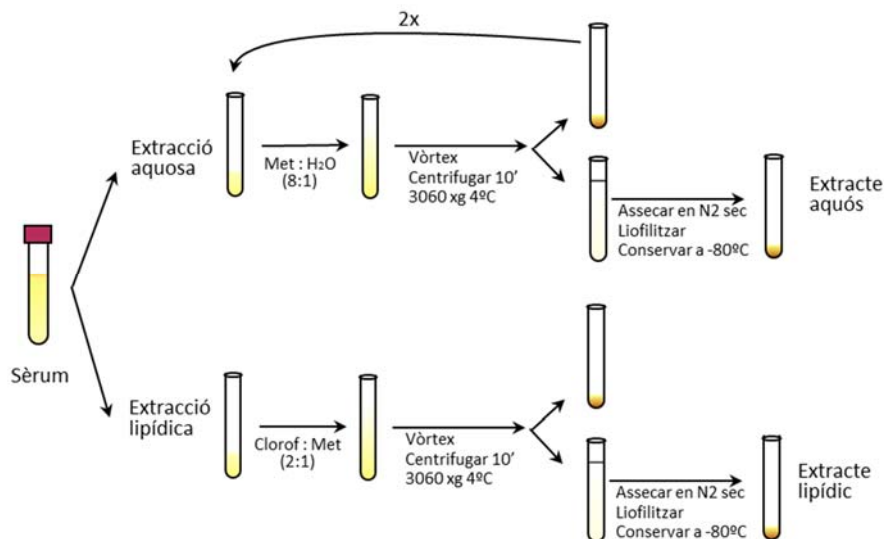
L'anàlisi del perfil metabolòmic es va determinar per als grup de MRCs dialitzats i el grup de controls sans.

#### Preparació de la mostra

Per a l'obtenció de l'extracte aquós es va afegir al sèrum una solució de metanol:aigua (8:1), es va agitar i centrifugar 10 minuts a 3060 xg a 4 °C. El sobrenedant es va reservar i el pèl·let es va rentar dues vegades amb més metanol:aigua (8:1) seguint els mateixos passos anteriorment descrits. Els sobrenedants es van combinar i es van assecar amb N<sub>2</sub> sec fins a la total eliminació de metanol. Tot seguit, es va congelar i liofilitzar i es va mantenir a -80 °C fins a fer-ne l'anàlisi (figura 13).

Per a l'obtenció de l'extracte lipídic es va afegir al sèrum una solució de cloroform:metanol (2:1), es va agitar i centrifugar 10 minuts a 3060 xg a 4 °C. El sobrenedant es va assecar amb N<sub>2</sub> sec fins a la total eliminació del dissolvent. Tot seguit es va congelar i liofilitzar i es va mantenir a -80 °C fins a fer-ne l'anàlisi (figura 13).

Figura 13: Procediment d'extracció aquosa i lipídica dels sèrums per a la determinació metabòlica



Met: metanol, Clorof: cloroform.

## Ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-1H)

La ressonància magnètica nuclear de protó és un mètode espectral basat en les propietats magnètiques del nucli d'hidrogen. Els electrons d'aquest nucli produeixen modificacions, molt dèbils, però mesurables, que permeten l'estudi detallat de l'estructura electrònica de les molècules i la seva identificació.

### *Material i mètodes*

Aquesta part de l'experiment es va realitzar al Servei de Recursos Científics i Tècnics de la Universitat Rovira i Virgili, dintre de la plataforma de metabolòmica COS (Center of Omics Science).

Es van adquirir un conjunt d'espectres de RMN-1H per a cada mostra, i es va registrar a 310 K en un espectròmetre Bruker Avanç 600 III a una freqüència de protons de 600,20 MHz, usant un CPTCI de 5 mm amb gradient de criosonda de triple ressonància (1H, 13C, 31P).

Els espectres de RMN-1H es van realitzar utilitzant Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY)-presaturació seqüència per suprimir el pic d'aigua residual. El moment  $\tau_1$  es va establir en  $4\mu\text{s}$  i el  $\tau_m$  (temps de mescla) va ser de 100 ms. Es va calibrar la longitud de pols  $90^\circ$  per a cada mostra (P. S. Wu & Otting, 2005) i van variar de 9,54 ms a 11,72 ms. El resultat del calibratge pols de  $90^\circ$  de cada mostra es va transferir a altres experiments de RMN-1H en la mateixa mostra. L'amplada espectral va ser de 30 ppm, i es van recollir un total de 64 transitoris en 64 k punts de dades per a cada espectre.

Els espectres de metabòlits de baix pes molecular es van realitzar utilitzant la seqüència de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (Carr & Purcell, 1954), amb un filtre de temps total de 410 ms que atenua els senyals de les macromolècules a un nivell residual. L'amplada espectral va ser de 20 ppm, i un total de 64 trànsits van ser recol·lectats a 64 k punts de dades per a cada espectre CPMG.

## *Material i mètodes*

Els espectres de macromolècules es van mesurar utilitzant un editatge per difusió seqüència de polsos amb gradients bipolar i l'esquema de retard de corrents de Foucault longitudinal (LED).

Els espectres de RMN adquirits van ser fasejats, va ser corregida la línia de base i es va fer referència al desplaçament químic del protó anomèric doblet de l' $\alpha$ -glucosa presa en 5,22. Adicionalment es va introduir un senyal de referència electrònica (ERETIC) amb finalitat de quantificació (Silvestre, Goupry, Trierweiler, Robins, & Akoka, 2001).

### Identificació i quantificació de metabòlits

Les assignacions de ressonància es van realitzar sobre valors de la literatura i les diferents bases de dades de recerca (base de dades Bioref AMIX 3.8 de Bruker®; Chenomx NMRSuite 7.5 de Chenomx Inc i base de dades Metaboloma Humans, HMDB). L'àrea sota les regions identificades dins dels espectres es va integrar usant un paquet de programari AMIX 3.8 (Bruker GmbH, Alemanya). En els extractes lipídics i aquosos, els pics seleccionats en els espectres 1D-RMN també es van integrar utilitzant un paquet de programari AMIX 3.8.

## *Material i mètodes*

# 4. Anàlisi estadística

## 4.1 Anàlisi de les variables d'EO i dades clíniques

L'anàlisi estadística es va realitzar amb el paquet estadístic SPSS (IMC, Chicago, IL). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  desviació estandard (DE). Les diferències en les variables tingudes en compte entre els diferents grups es van analitzar amb proves *t* de Student o U-Mann-Whitney per comparar dues mitjanes normals o no normals, respectivament; o Anova o H-Kruskal Wallys per comparar més de dues mitjanes normals o no normals amb l'ajust de Bonferroni, respectivament. Un valor de *p* per sota de 0,05 es va considerar estadísticament significatiu.

## 4.2 Anàlisi estadística del perfil metabolòmic

L'anàlisi estadística es va realitzar amb el paquet estadístic SPSS/PC + (IMC, Chicago, IL). Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  DE. Les diferències es van analitzar amb proves *t* d'Student o U-Mann-Whitney per comparar dues mitjanes normals o no normals, respectivament; o Anova o H-Kruskal Wallys per comparar més de dues mitjanes normals o no normals amb l'ajust de Bonferroni, respectivament. Un valor de *p* per sota de 0,05 es va considerar estadísticament significatiu.

Per tal d'identificar les variables relacionades amb MRC o les variables més afectades per la MRC es va fer servir l'anàlisi de components

## *Material i mètodes*

principals (PCA). La tècnica serveix per determinar el nombre de factors explicatius d'un conjunt de dades que determinen en major grau la variabilitat d'aquestes mateixes dades. La qualitat dels models va ser descrit per valors de Q i R. R es defineix com la proporció de la variància en les dades explicada pels models i indica bondat d'ajust, i Q es defineix com la proporció de la variància en les dades predites pel model, i indica la previsibilitat.

Per a saber si hi ha relació entre els resultats d'EO i metabolòmica s'han realitzat correlacions de Pearson amb el paquet estadístic SPSS. Les dades que correlacionen són les que tenen una significació  $<0.05$  i aquesta correlació serà positiva o negativa en funció del coeficient de Pearson obtingut, de manera que les que tenen un coeficient negatiu correlacionen inversament i les que tenen un coeficient positiu correlacionen positivament.







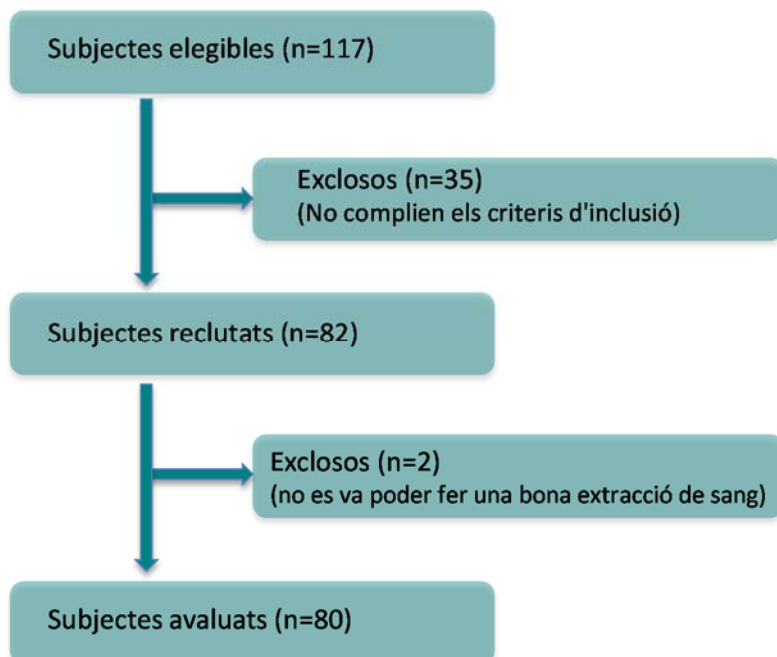
## *Resultats*

# 1. Flux de participants

## 1.1 Controls sans

Dels 117 subjectes elegibles per a ser inclosos en el grup de controls sans, se'n van excloure 35 perquè no complien els criteris d'inclusió i 2 als quals no es va aconseguir una bona extracció de sang. Finalment, van ser reclutats 80 subjectes sans (figura 14).

Figura 14: Diagrama de flux dels controls sans



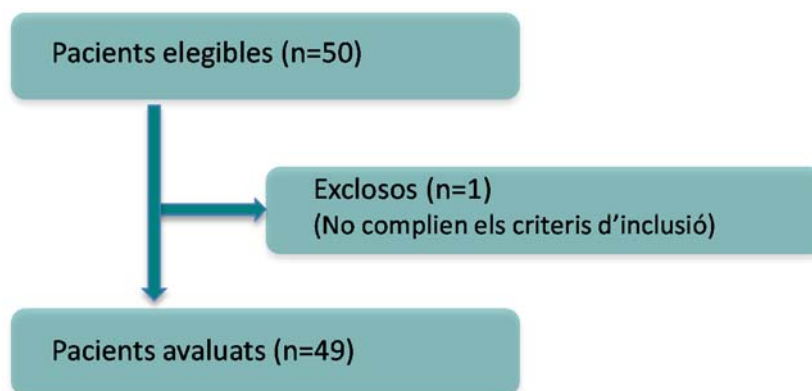
## Resultats

### 1.2 Malalts renals crònics no dialitzats

Els pacients elegibles per a ser inclosos en el grup de MRCs no dialitzats van ser 50, dels quals se'n van reclutar 49, finalment (figura 15).

---

Figura 15: Diagrama de flux dels MRCs no dialitzats



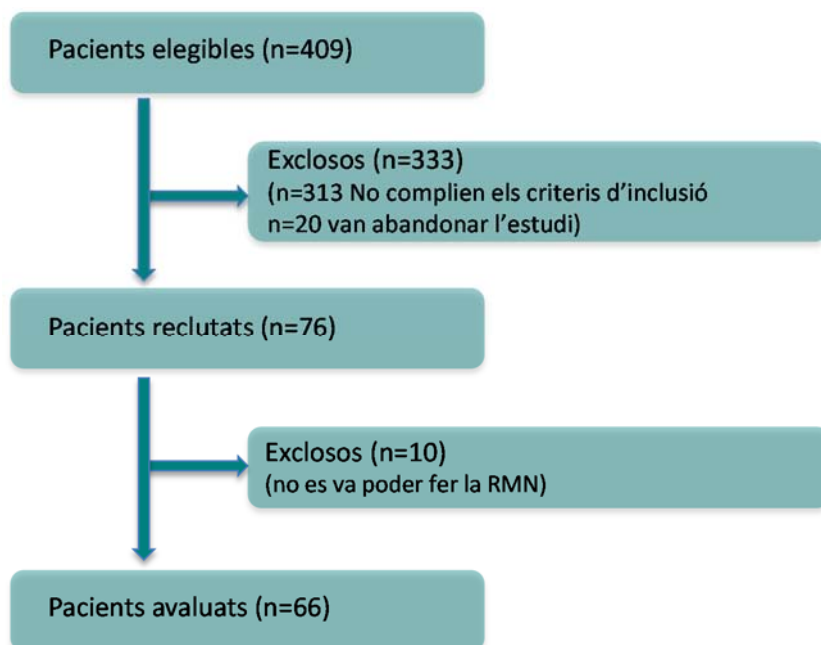
MRCs: malalts renals crònics.

---

### 1.3 Malalts renals crònics dialitzats

Dels 409 pacients elegibles per a ser inclosos en el grup de MRCs dialitzats, finalment es van reclutar 66. 313 pacients es van excloure de l'estudi per no complir els criteris d'inclusió i 20 van abandonar l'estudi. Més tard es van excloure 10 pacients més, ja que no es va poder fer una de les proves de l'estudi, la RMN, per problemes de claustrofòbia (figura 16).

Figura 16. Diagrama de flux dels MRCs dialitzats



MRCs: malalts renals crònics, RMN: ressonància magnètica nuclear.

## *Resultats*

## 2. Dades demogràfiques

De la informació recollida de la història clínica s'obté la següent taula de dades demogràfiques dels individus estudiats (taula 3):

Taula 3: Dades demogràfiques dels grups d'estudi

|                         | Controls sans<br>n= 80 |      | MRC no dialitzats<br>n=49 |      | MRC dialitzats<br>n=66 |      |
|-------------------------|------------------------|------|---------------------------|------|------------------------|------|
|                         | n                      | %    | n                         | %    | n                      | %    |
| SEXE                    |                        |      |                           |      |                        |      |
| Dona                    | 46                     | 57.5 | 26                        | 53.1 | 18                     | 27.3 |
| Home                    | 34                     | 42.5 | 23                        | 46.9 | 48                     | 72.7 |
| EDAT (mitjana ± DE)     | 43 ± 16                |      | 72 ± 11                   |      | 54 ± 7                 |      |
| Etiologia nefropatia    |                        |      |                           |      |                        |      |
| No filiada              | -                      | -    | 9                         | 18.4 | 17                     | 25.8 |
| Vascular                | -                      | -    | 22                        | 44.9 | 5                      | 7.6  |
| Glomerular              | -                      | -    | 2                         | 4.1  | 17                     | 25.8 |
| Diabetis                | -                      | -    | 13                        | 26.5 | 9                      | 13.6 |
| Intersticial/quística   | -                      | -    | 3                         | 6.1  | 15                     | 22.7 |
| Altres                  | -                      | -    | 0                         | 0    | 3                      | 4.5  |
| Dades clíniques         |                        |      |                           |      |                        |      |
| Diabetis                | -                      | -    | -                         | -    | 10                     | 15.2 |
| HTA                     | -                      | -    | -                         | -    | 43                     | 65.2 |
| Dislipèmia              | -                      | -    | -                         | -    | 55                     | 83.3 |
| Malaltia cardiovascular | -                      | -    | -                         | -    | 16                     | 24.2 |
| Consum de tabac         |                        |      |                           |      |                        |      |
| No                      | 80                     | 100  | 45                        | 91.8 | 28                     | 43   |
| Exfumador               | 0                      | 0    | 0                         | 0    | 20                     | 30.3 |
| Fumador                 | 0                      | 0    | 4                         | 8.2  | 18                     | 27.3 |

DE: desviació estàndard, HTA: hipertensió arterial, MRC: malalts renals crònics.

En el grup de controls sans i MRCs no dialitzats el % dones/homes és molt similar mentre que en el grup de MRCs dialitzats trobem 2/3 parts d'homes. La mitjana d'edat dels controls sans i els MRCs no dialitzats és molt similar (40-50 anys), mentre que en el grup dels MRCs dialitzats és més elevada, 72 anys. Es van recollir dades de l'etiologia de la



## *Resultats*

nefropatia per als grups de MRCs no dialitzats i per als dialitzats i dades clíniques, tal com es veu a la taula 2. Per al grup de controls sans aquestes dades no es tenen ja que no patien cap malaltia tal com especificaven els criteris d'inclusió.

## 3. Resultats d'estrès oxidatiu

### 3.1 Diferències generals entre controls sans, MRCs no dialitzats i dialitzats

#### Enzims antioxidants

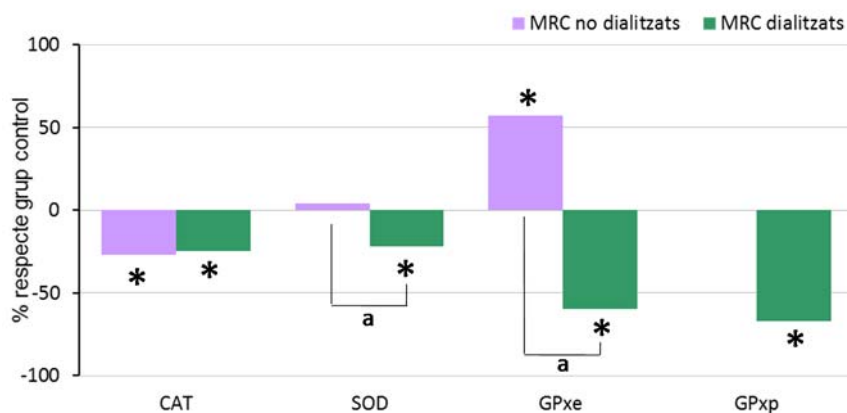
Es van analitzar els paràmetres d'EO, tal com s'explica a l'apartat de materials i mètodes, a les mostres de controls sans, MRCs no dialitzats i dialitzats, i es van comparar entre ells.

Els resultats dels enzims antioxidants es van expressar en percentatge respecte dels resultats del grup control per tal d'estudiar el comportament dels MRCs no dialitzats i dialitzats. Tal com s'observa a la figura 17, els MRCs no dialitzats tenen valors més baixos de CAT i més elevats de GPx que el grup control. S'observa que els MRCs dialitzats també tenen valors més baixos de CAT que el grup control però, a diferència dels MRCs no dialitzats, els valors de SOD i de GPx també són més baixos en els MRCs dialitzats que els controls sans.

Si analitzem els resultats per veure quines diferències hi ha entre els MRCs no dialitzats i els dialitzats observem que no hi ha diferències quant a la CAT, però sí que trobem diferències en la SOD i la GPx. De manera que els MRC dialitzats tenen valors més baixos de SOD i de GPx que els MRCs no dialitzats (taula 4 i figura 17).

## Resultats

Figura 17: Representació dels resultats dels enzims antioxidants dels MRCs no dialitzats i els MRCs dialitzats respecte del grup control



MRC: malalts renals crònics, CAT: catalasa eritrocitària, SOD: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, \*: diferències estadísticament significatives  $p < 0,05$  respecte del grup control. a: diferències estadísticament significatives entre el grup de MRCs no dialitzats i els MRCs dialitzats. La GPxp del grup MRC no dialitzats no es va poder determinar.

Taula 4: Resultats dels enzims antioxidants en funció del grup d'estudi

|                      | Controls            | MRC no dialitzats    | MRC dialitzats      | p valor* |        |        |
|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------|--------|--------|
|                      | n=80 (A)            | n=49 (B)             | n=66 (C)            | p A-B    | p A-C  | p B-C  |
|                      | Mitjana $\pm$ DE    | Mitjana $\pm$ DE     | Mitjana $\pm$ DE    |          |        |        |
| CATe (mmol/min/g Hb) | 240,69 $\pm$ 47,74  | 175,76 $\pm$ 40,13   | 182,09 $\pm$ 43,37  | <0,001   | <0,001 | 2,267  |
| SODe (U/g Hb)        | 1811,9 $\pm$ 573,34 | 1890,10 $\pm$ 723,55 | 1422,3 $\pm$ 607,26 | 2,302    | <0,001 | 0,001  |
| GPxe (U/g Hb)        | 86,46 $\pm$ 37,43   | 135,24 $\pm$ 64,18   | 34,81 $\pm$ 11,63   | <0,001   | <0,001 | <0,001 |
| GPxp (U/L pl)        | 157,87 $\pm$ 51,08  | NA                   | 51,96 $\pm$ 17,86   | --       | <0,001 | --     |

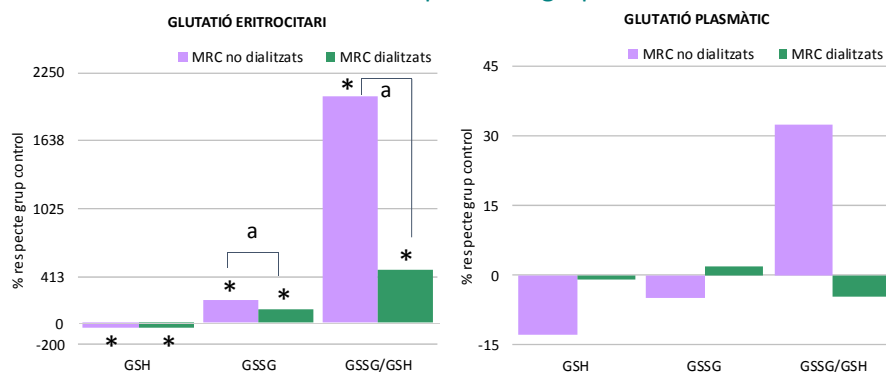
MRC: malalts renals crònics, DE: desviació estàndard, CAT: catalasa eritrocitària, SOD: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, U: unitats, Hb: hemoglobina, pl: plasma, p: valor\* corregit per Bonferroni, NA: no avaluat.

## Sistema glutatió

Es va determinar tant en eritròcits com en plasma el glutatió (GSH) i la seva forma oxidada (GSSG) i la ràtio entre les dues molècules, GSSG/GSH.

Com veiem a la figura 18, quan s'analitzen les dades en percentatge respecte dels controls sans, s'observa que tant els MRCs no dialitzats com els dialitzats presenten valors més baixos de GSH eritrocitari i més elevats de GSSG eritrocitari que els controls sans, amb la conseqüent elevació en els valors de la ràtio GSSG/GSH.

Figura 18: Representació dels resultats del sistema glutatió dels MRCs no dialitzats i els MRCs dialitzats respecte del grup control



MRC: malalts renals crònics, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, \*: diferències estadísticament significatives respecte del grup control, a: diferències estadísticament significatives entre MRCs dialitzats i no dialitzats.

En canvi, tot i que veiem un augment de més d'un 30% de la ràtio GSSG/GSH plasmàtica en el plasma, no observem diferències

## Resultats

estadísticament significatives quan comparem els resultats dels MRCs no dialitzats i dialitzats amb el grup control. Això pot ser degut a la desviació dels resultats entre els individus (taula 5).

**Taula 5: Resultats del sistema antioxidant tant eritrocitari com plasmàtic per a cada grup d'estudi**

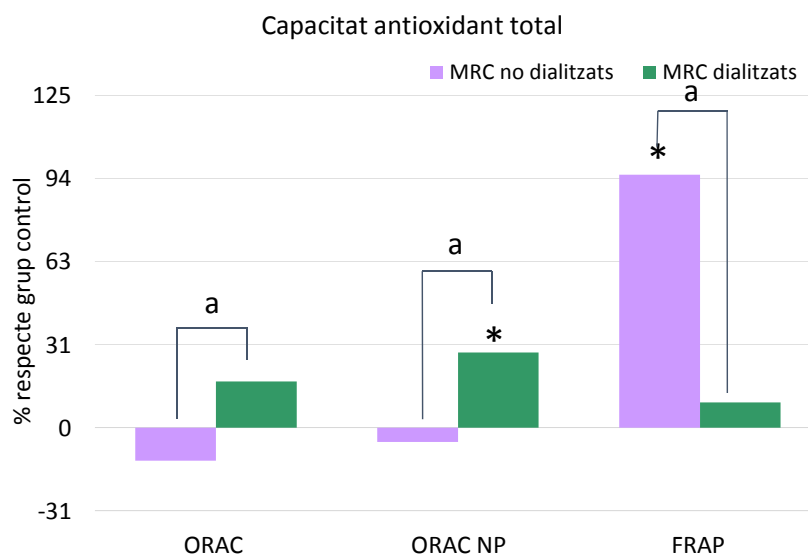
|                     | Controls     | MRC no dialitzats | MRC dialitzats | p valor* |        |        |
|---------------------|--------------|-------------------|----------------|----------|--------|--------|
|                     | n=80 (A)     | n=49 (B)          | n=66 (C)       | p A-B    | p A-C  | p B-C  |
|                     | Mitjana ± DE | Mitjana ± DE      | Mitjana ± DE   |          |        |        |
| <b>Eritrocitari</b> |              |                   |                |          |        |        |
| GSH (µmol/g Hb)     | 4,11 ± 1,07  | 2,24 ± 1,97       | 2,29 ± 1,16    | <0,001   | <0,001 | 0,376  |
| GSSG (µmol/g Hb)    | 0,62 ± 0,25  | 1,86 ± 0,88       | 1,34 ± 0,48    | <0,001   | <0,001 | <0,001 |
| GSSG/GSH            | 0,18 ± 0,15  | 3,72 ± 8,55       | 1,01 ± 1,46    | <0,001   | <0,001 | 0,021  |
| <b>Plasmàtic</b>    |              |                   |                |          |        |        |
| GSH (nmol/ml pl)    | 15,51 ± 8,85 | 13,70 ± 7,23      | 15,52 ± 6,62   | 0,863    | 1,261  | 0,222  |
| GSSG (nmol/ml pl)   | 24,25 ± 3,91 | 23,10 ± 5,17      | 24,76 ± 7,74   | 1,150    | 1,066  | 0,567  |
| GSSG/GSH            | 1,89 ± 0,77  | 2,49 ± 2,67       | 1,79 ± 0,68    | 1,345    | 1,621  | 0,465  |

DE: desviació estàndard, MRC: malalts renals crònics, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, Hb: hemoglobina, pl: plasma, p: valor\* corregit per Bonferroni.

## Capacitat antioxidant total

Si estudiem els resultats respecte del grup control (figura 19), observem els MRCs dialitzats i no dialitzats no hi ha diferències estadísticament significatives en els valors d'ORAC respecte del grup control. No obstant, els MRCs dialitzats tenen valors més elevats d'ORAC NP que el grup control, i els MRCs no dialitzats tenen valors més elevats de FRAP que els controls.

Figura 19: Representació dels resultats de les proves de capacitat antioxidant total dels MRCs no dialitzats i els MRCs dialitzats respecte del grup control



MRCs: malalts renals crònics, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», \*: diferències estadísticament significatives respecte del grup control, a: diferències estadísticament significatives entre MRCs dialitzats i no dialitzats.

Les proves de capacitat antioxidant ens mostren que per a la prova de l'ORAC, els MRCs dialitzats presenten uns valors més elevats que els MRCs no dialitzats. Per al ORAC NP veiem que els MRCs dialitzats són els que tenen els valors més elevats. En canvi, els valors del FRAP són més elevats en els MRCs no dialitzats que en els MRCs dialitzats (taula 6).

## Resultats

Taula 6: Resultats de les proves de capacitat antioxidant per a cada grup d'estudi

|                        | Controls     | MRC no dialitzats | MRC dialitzats | p valor* |        |        |
|------------------------|--------------|-------------------|----------------|----------|--------|--------|
|                        | n=80 (A)     | n=49 (B)          | n=66 (C)       | p A-B    | p A-C  | p B-C  |
|                        | Mitjana ± DE | Mitjana ± DE      | Mitjana ± DE   |          |        |        |
| ORAC (μmolTE/ml pl)    | 25,52 ± 9,97 | 22,53 ± 10,02     | 30,16 ± 11,85  | 0,373    | 0,155  | 0,006  |
| ORAC NP (μmolTE/ml pl) | 1,07 ± 0,35  | 1,01 ± 0,29       | 1,37 ± 0,40    | 0,494    | <0,001 | <0,001 |
| FRAP (μmolTE/ml pl)    | 0,51 ± 0,10  | 1,00 ± 0,51       | 0,56 ± 0,14    | <0,001   | 0,109  | <0,001 |

MRC: malalts renals crònics, DE: desviació estàndard, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», pl: plasma, p: valor\* corregit per Bonferroni.

## Dany oxidatiu

Es va determinar el dany en proteïnes i lípids causat per l'EO mitjançant les tècniques descrites en l'apartat de material i mètodes. No es va poder valorar el dany causat als lípids en els controls sans a causa de falta de mostra.

Es va observar que els nivells de dany causats a proteïnes, valorats com a nivells de carbonilació d'aquestes proteïnes, era més elevat en els malalts renals, tant en els MRCs no dialitzats com en els dialitzats, en comparació amb el grup control sa. No es van trobar diferències estadísticament significatives entre els MRCs no dialitzats i els dialitzats (taula 7).

## Resultats

Quant al dany oxidatiu generat en lípids, només tenim dades dels MRCs no dialitzats i dels dialitzats. En aquest sentit, s'observa que els MRCs dialitzats presenten un dany oxidatiu en lípids, valorat com a quantitat de LDL oxidada, més elevat que els MRCs no dialitzats (taula 7).

Taula 7: Resultats de la determinació del dany a proteïnes i lípids per a cada grup d'estudi

|                    | Controls     | MRC no dialitzats | MRC dialitzats | p valor* |        |        |
|--------------------|--------------|-------------------|----------------|----------|--------|--------|
|                    | n=80 (A)     | n=49 (B)          | n=66 (C)       | p A-B    | p A-C  | p B-C  |
|                    | Mitjana ± DE | Mitjana ± DE      | Mitjana ± DE   |          |        |        |
| DPp (nmol/mg prot) | 0,81 ± 0,51  | 3,25 ± 1,79       | 4,18 ± 4,87    | <0,001   | <0,001 | 0,419  |
| LDLox (U/L pl)     | NA           | 31,10 ± 15,6      | 42,34 ± 15,18  | --       | --     | <0,001 |

MRC: malalts renals crònics, DE: desviació estàndard, DPp: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «*low density lipoprotein oxidized*», prot: proteïnes, pl: plasma. P: valor\* corregit per Bonferroni, NA: no avaluat.



## Resultats

### 3.2 Anàlisi de l'EO en funció de l'etiologia de la MRC

Per tal de conèixer si hi ha diferències en els resultats d'EO en funció de l'etiologia de la MRC es van fer subgrups dintre del grup dels MRCs dialitzats. Es van agrupar els MRCs dialitzats en etiologia vascular (n=5), etiologia glomerular (n=17), etiologia diabètica (n=9) i etiologia intersticial/quística (n=15). Hi va haver 20 MRCs que no tenien l'etiologia a la història clínica o bé era desconeguda i, per tant, no se'n van fer servir les dades per dur a terme aquesta anàlisi. Es van comparar els resultats d'EO entre els diferents grups d'etiologia i amb el grup control (taula 8).

Aquest anàlisi ens proporciona una idea de les diferències entre etiologies en pacients sotmesos a tractament de diàlisi, no obstant, cal observar els resultats amb cautela ja que alguns grups no compleixen amb la robustesa estadística adequada, especialment el grup d'etiologia vascular, amb només 5 pacients.

No s'han observat diferències estadísticament significatives entre les diferents etiologies del grup dels MRCs dialitzats per a les variables d'EO estudiades.

Quan ho comparem amb el grup control veiem que totes les etiologies tenen valors més baixos de CAT, GPxe, GPxp i GSH eritrocitari i més elevats de GSSG, la ràtio GSSG/GSH i el DPP. Les etiologies glomerular i intersticial/quística, a més, tenen valors més baixos de SOD que el grup control i més elevats d'ORAC NP. Els MRCs amb etiologia diabètica tenen valors més elevats d'ORAC que el grup control (taula 8 i figura 20).

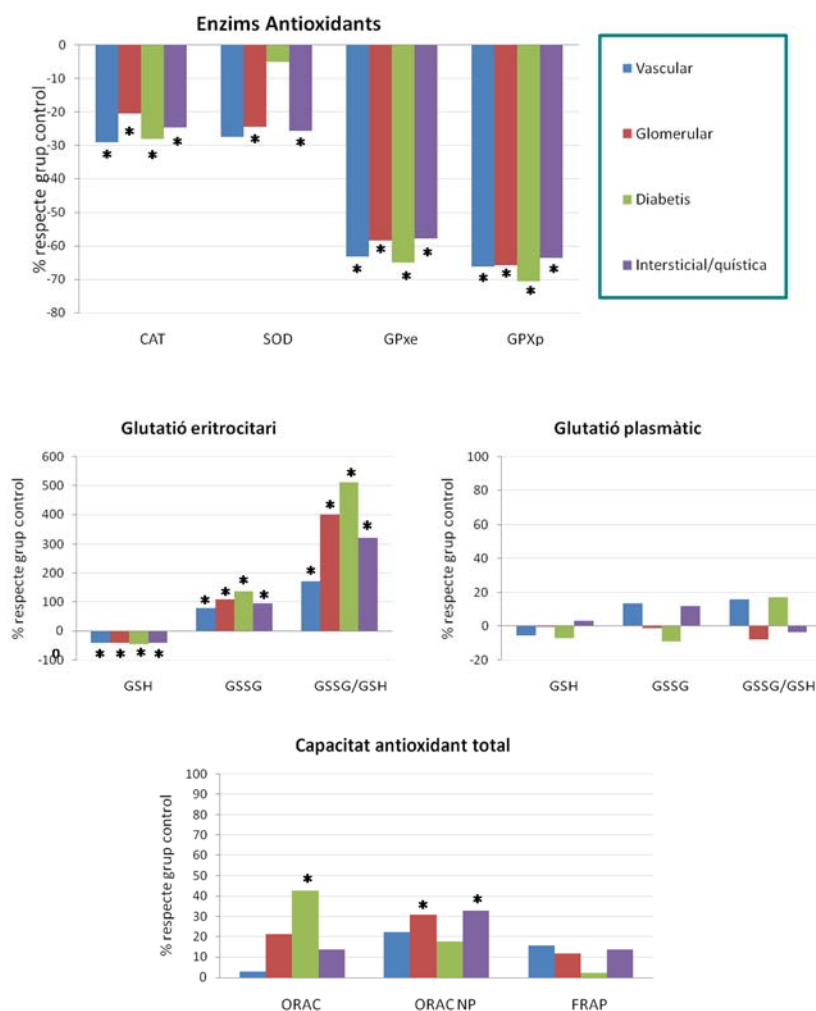
Taula 8. Resultats dels paràmetres d'EO en funció de l'etiologia de la MRC.

| Etiologia MRC                      | MRC dialitzats n=46 |                   |                  |                   |                  |    | Controls<br>n=80<br>Mitjana ± DE |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|----|----------------------------------|
|                                    | Vascular n=5        |                   | Glomerular n=17  |                   | Diabetis n=9     |    |                                  |
|                                    | Mitjana ± DE        | DE                | Mitjana ± DE     | DE                | Mitjana ± DE     | DE |                                  |
| <b>Enzims Antioxidants</b>         |                     |                   |                  |                   |                  |    |                                  |
| CATe (mmol/min/g Hb)               | 170,86 ± 41,63*     | 191,33 ± 35,07*   | 173,14 ± 34,27*  | 181,21 ± 36,48*   | 240,68 ± 47,74   |    |                                  |
| SODe (U/g Hb)                      | 1312,60 ± 582,79    | 1369,06 ± 630,43* | 1720,17 ± 463,31 | 1347,07 ± 617,30* | 1811,92 ± 573,34 |    |                                  |
| GPx <sub>e</sub> (U/g Hb)          | 31,92 ± 4,35*       | 35,96 ± 11,23*    | 30,36 ± 15,23*   | 36,57 ± 10,91*    | 86,46 ± 37,43    |    |                                  |
| GPx <sub>p</sub> (U/L pl)          | 53,33 ± 24,04*      | 54,07 ± 17,72*    | 46,53 ± 15,04*   | 57,51 ± 10,87*    | 157,87 ± 51,08   |    |                                  |
| <b>Glutació eritrocitari</b>       |                     |                   |                  |                   |                  |    |                                  |
| GSH (µmol/g Hb)                    | 2,35 ± 0,74*        | 2,38 ± 1,22*      | 2,18 ± 1,26*     | 2,40 ± 1,04*      | 4,11 ± 1,07      |    |                                  |
| GSSG (µmol/g Hb)                   | 1,11 ± 0,36*        | 1,29 ± 0,46*      | 1,46 ± 0,57*     | 1,21 ± 0,44*      | 0,62 ± 0,25      |    |                                  |
| GSSG/GSH                           | 0,49 ± 0,15*        | 0,90 ± 0,90*      | 1,10 ± 0,92*     | 0,76 ± 0,73*      | 0,18 ± 0,15      |    |                                  |
| <b>Glutació plasmàtic</b>          |                     |                   |                  |                   |                  |    |                                  |
| GSH (nmol/ml pl)                   | 14,62 ± 6,77        | 15,43 ± 6,87      | 14,42 ± 10,94    | 15,99 ± 5,64      | 15,51 ± 8,85     |    |                                  |
| GSSG (nmol/ml pl)                  | 27,49 ± 8,94        | 23,98 ± 6,38      | 22,03 ± 5,25     | 27,09 ± 7,82      | 24,25 ± 3,91     |    |                                  |
| GSSG/GSH                           | 2,19 ± 1,16         | 1,74 ± 0,66       | 2,21 ± 0,81      | 1,82 ± 0,54       | 1,89 ± 0,77      |    |                                  |
| <b>Capacitat antioxidant total</b> |                     |                   |                  |                   |                  |    |                                  |
| ORAC (µmolTE/ml pl)                | 26,21 ± 9,26        | 30,98 ± 12,50     | 36,40 ± 11,72*   | 29,05 ± 12,14     | 25,52 ± 9,97     |    |                                  |
| ORAC NP (µmolTE/ml pl)             | 1,31 ± 0,23         | 1,40 ± 0,44*      | 1,26 ± 0,49      | 1,42 ± 0,37*      | 1,07 ± 0,35      |    |                                  |
| FRAP (µmolTE/ml pl)                | 0,59 ± 0,15         | 0,57 ± 0,14       | 0,52 ± 0,10      | 0,58 ± 0,18       | 0,51 ± 0,10      |    |                                  |
| <b>Dany a proteïnes i lípids</b>   |                     |                   |                  |                   |                  |    |                                  |
| DPp (nmol/mg prot)                 | 3,83 ± 3,86*        | 3,18 ± 3,28*      | 2,09 ± 1,22*     | 5,17 ± 4,92*      | 0,81 ± 0,51      |    |                                  |
| LDLox (U/L pl)                     | 40,98 ± 18,74       | 43,86 ± 12,60     | 40,14 ± 10,91    | 43,74 ± 14,21     | NA               |    |                                  |

EO: estrès oxidatiu, MRC: malaltia renal crònica, DE: desviació estàndard, CATe: catalasa eritrocitària, SODe: superòxid dismutasa eritrocitària, GPx<sub>e</sub>-p: glutatí peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatí reduït, GSSG: glutatí oxidat, ORAC: de l'anglès "total oxygen radical absorbance capacity", ORAC NP: de l'anglès "oxygen radical absorbance capacity" fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès "ferric reducing ability of plasma", DPp: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès "low density lipoprotein oxidized", Hb: hemoglobina, pl: plasma, prot: proteïnes, NA: no avaluat; \*: diferències estadísticament significatives (p<0.05) respecte del grup control.

## Resultats

Figura 20: Representació gràfica dels resultats dels paràmetres d'EO en funció de l'etiologia dels MRCs dialitzats respecte del grup control en percentatge.



MRC: malalts renals crònics, CAT: catalasa eritrocitària, SOD: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», \*: diferències estadísticament significatives respecte del grup control sa.

### 3.3 Anàlisi de l'EO en funció de les alteracions concomitants de la MRC

Es va fer un estudi d'EO en funció de les alteracions concomitants a la MRC, patologies o situacions estretament lligades amb la MRC, per tal de conèixer si aquestes influïen en l'estat oxidatiu dels MRCs dialitzats. Les alteracions concomitants de la MRC estudiades van ser:

- Hipertensió arterial
- Dislipèmia
- Malaltia cardiovascular
- Consum de tabac
- Lesió de la substància blanca

#### Hipertensió arterial

Es van fer dos grups en funció de si els MRCs tenien hipertensió arterial (HTA) o no i es van comparar els paràmetres d'EO entre ells i amb el grup control (taula 9). No es van apreciar diferències estadísticament significatives entre els MRCs dialitzats amb HTA i sense HTA (figura 21). Es mantenen les diferències que hem vist en general en relació als enzims antioxidants, el glutatió eritrocitari, el dany a les proteïnes i la fracció no proteica de l'activitat antioxidant respecte el grup control, tant en el grup amb com sense HTA (taula 9).

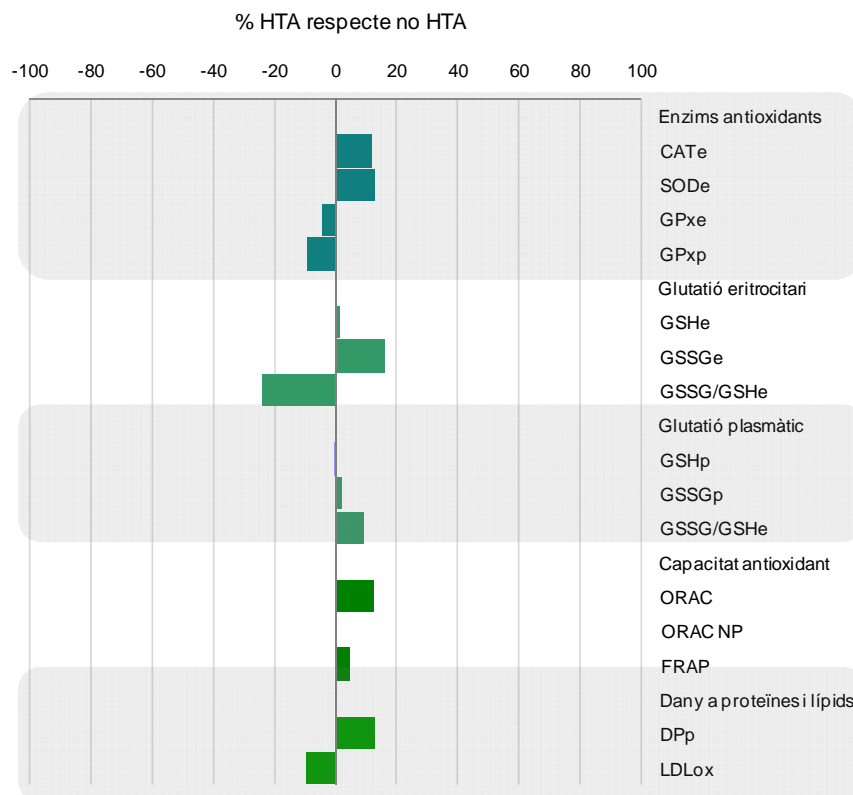
## Resultats

Taula 9. Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRCs dialitzats amb hipertensió arterial i sense amb el grup control.

|                                    | MRC dialitzats   |                  | Controls       |
|------------------------------------|------------------|------------------|----------------|
|                                    | Amb HTA n=43     | Sense HTA n=23   | n=80           |
|                                    | Mitjana ± DE     | Mitjana ± DE     | Mitjana ± DE   |
| <b>Enzims Antioxidants</b>         |                  |                  |                |
| CAT (mmol/min/g Hb)                | 189,03 ± 47,26*  | 169,1 ± 31,98*   | 240,68 ± 47,74 |
| SOD (U/g Hb)                       | 1479,4 ± 620,98* | 1310,7 ± 576,96* | 1811,9 ± 573,3 |
| GPxe (U/g Hb)                      | 34,26 ± 12,47*   | 35,84 ± 10,04*   | 86,46 ± 37,43  |
| GPXp (U/L pl)                      | 50,13 ± 16,83*   | 55,32 ± 19,54*   | 157,87 ± 51,08 |
| <b>Glutatió eritrocitari</b>       |                  |                  |                |
| GSH (µmol/g Hb)                    | 2,31 ± 1,16*     | 2,27 ± 1,19*     | 4,11 ± 1,07    |
| GSSG (µmol/g Hb)                   | 1,41 ± 0,41*     | 1,21 ± 0,58*     | 0,62 ± 0,25    |
| GSSG/GSH                           | 0,91 ± 0,77*     | 1,19 ± 2,25*     | 0,18 ± 0,15    |
| <b>Glutatió plasmàtic</b>          |                  |                  |                |
| GSH (nmol/ml pl)                   | 15,51 ± 6,7      | 15,56 ± 6,62     | 15,51 ± 8,85   |
| GSSG (nmol/ml pl)                  | 24,93 ± 6,85     | 24,45 ± 9,32     | 24,25 ± 3,91   |
| GSSG/GSH                           | 1,85 ± 0,7       | 1,69 ± 0,65      | 1,89 ± 0,77    |
| <b>Capacitat antioxidant total</b> |                  |                  |                |
| ORAC (µmolTE/ml pl)                | 31,38 ± 12,62    | 27,88 ± 10,13    | 25,52 ± 9,97   |
| ORAC NP (µmolTE/ml pl)             | 1,37 ± 0,37*     | 1,37 ± 0,47*     | 1,07 ± 0,35    |
| FRAP (µmolTE/ml pl)                | 0,57 ± 0,14      | 0,54 ± 0,15      | 0,51 ± 0,1     |
| <b>Dany a proteïnes i lípids</b>   |                  |                  |                |
| DPP (nmol/mg prot)                 | 4,35 ± 5,15*     | 3,85 ± 4,37*     | 0,81 ± 0,51    |
| LDLox (U/L pl)                     | 40,76 ± 13,61    | 45,3 ± 17,70     | NA             |

MRC: malalts renals crònics, EO: estrès oxidatiu, DE: desviació estàndard, CAT: catalasa eritrocitària, SOD: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized», Hb: hemoglobina, pl: plasma, prot: proteïnes, NA: no avaluat, \*: diferències estadísticament significatives (p<0,05) respecte del grup control.

Figura 21: Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats amb HTA respecte dels que no en tenen



MRC: malalts renals crònics, CAT: catalasa eritrocitària, SOD: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», DPp: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized».

## Resultats

### Dislipèmia

Es van fer dos grups en funció de si els MRCs dialitzats presentaven dislipèmia, per veure si aquesta alteració influïa en l'EO d'aquests pacients.

En estudiar aquests resultats es va veure que no hi ha diferències estadísticament significatives entre els MRCs dialitzats amb dislipèmia i sense dislipèmia (taula 10 i figura 22). En valorar els resultats respecte del grup control, els dos grups tenen els enzims antioxidants i el GSH més baixos que el grup control excepte per l'enzim CAT. Per a la CAT el grup amb dislipèmia presenta valors més baixos que el grup control i el grup sense dislipèmia no presenta diferències estadísticament significatives respecte del grup control. També s'observen els paràmetres GSSG, la ràtio GSSG/GSH i el DPp més elevats en els dos grups que el grup control. Per al paràmetre ORAC NP els pacients amb dislipèmia tenen valors més elevats que el grup control (taula 10 i figura 22).

Taula 10. Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRC dialitzats que presenten dislipèmia amb el grup control.

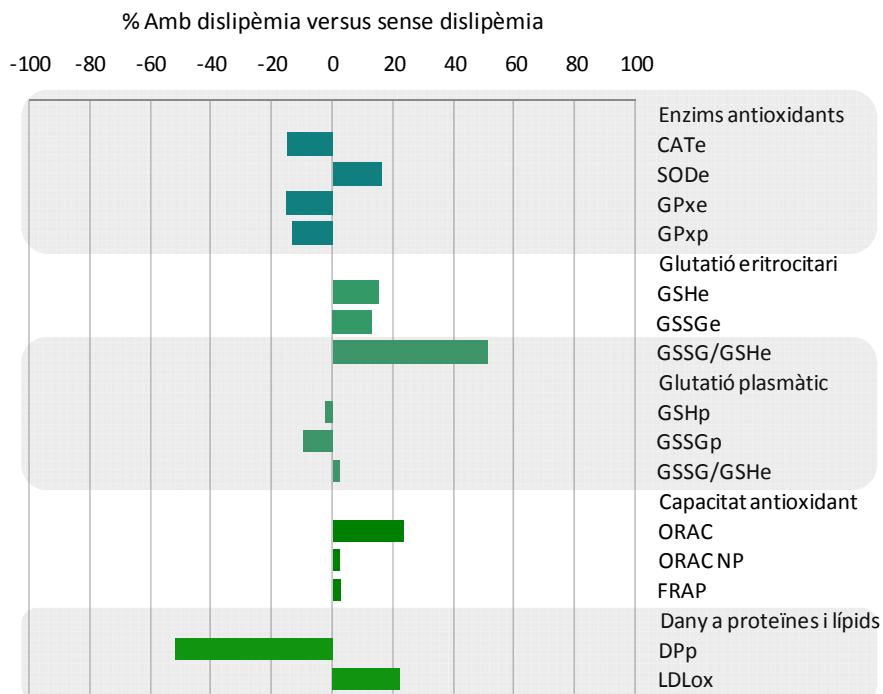
|                                    | MRC dialitzats    |                   |                  |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
|                                    | Amb dislipèmia    | Sense dislipèmia  | Controls         |
|                                    | n=55              | n=11              | n=81             |
|                                    | Mitjana ± DE      | Mitjana ± DE      | Mitjana ± DE     |
| <b>Enzims Antioxidants</b>         |                   |                   |                  |
| CAT (mmol/min/g Hb)                | 176,97 ± 32,41*   | 207,66 ± 75,43    | 240,68 ± 47,74   |
| SOD (U/g Hb)                       | 1456,94 ± 609,14* | 1252,45 ± 596,05* | 1811,92 ± 573,34 |
| GPxe (U/g Hb)                      | 33,80 ± 11,58*    | 39,85 ± 11,03*    | 86,46 ± 37,43    |
| GPXp (U/L pl)                      | 50,76 ± 17,62*    | 58,60 ± 18,62*    | 157,87 ± 51,08   |
| <b>Glutació eritrocitari</b>       |                   |                   |                  |
| GSH (µmol/g Hb)                    | 2,34 ± 1,19*      | 2,04 ± 0,98*      | 4,11 ± 1,07      |
| GSSG (µmol/g Hb)                   | 1,37 ± 0,50*      | 1,21 ± 0,39*      | 0,62 ± 0,25      |
| GSSG/GSH                           | 1,07 ± 1,58*      | 0,70 ± 0,33*      | 0,18 ± 0,15      |
| <b>Glutació plasmàtic</b>          |                   |                   |                  |
| GSH (nmol/ml pl)                   | 15,46 ± 7,06      | 15,84 ± 4,01      | 15,51 ± 8,85     |
| GSSG (nmol/ml pl)                  | 24,31 ± 8,16      | 26,97 ± 5,00      | 24,25 ± 3,91     |
| GSSG/GSH                           | 1,80 ± 0,74       | 1,76 ± 0,30       | 1,89 ± 0,77      |
| <b>Capacitat antioxidant total</b> |                   |                   |                  |
| ORAC (µmolTE/ml pl)                | 31,13 ± 12,52     | 25,28 ± 5,88      | 25,52 ± 9,97     |
| ORAC NP (µmolTE/ml pl)             | 1,37 ± 0,41*      | 1,34 ± 0,39       | 1,07 ± 0,35      |
| FRAP (µmolTE/ml pl)                | 0,56 ± 0,14       | 0,55 ± 0,13       | 0,51 ± 0,10      |
| <b>Dany a proteïnes i lípids</b>   |                   |                   |                  |
| DPP (nmol/mg prot)                 | 3,52 ± 3,96*      | 7,34 ± 7,38*      | 0,81 ± 0,51      |
| LDLox (U/L pl)                     | 43,68 ± 15,62     | 35,67 ± 11,05     | NA               |

MRC: malalts renals crònics, EO: estrès oxidatiu, DE: desviació estàndard, CAT: catalasa eritrocitària, SOD: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized», Hb: hemoglobina, pl: plasma, prot: proteïnes, NA: no avaluat, \*: diferències estadísticament significatives (p<0,05) respecte del grup control.



## Resultats

Figura 22: Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats amb dislipèmia versus sense dislipèmia



MRC: malalts renals crònics, CATe: catalasa eritrocitària, SODe: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized».

## Malaltia cardiovascular

Es van fer dos grups en funció de si els MRCs dialitzats presentaven MCV, per veure si aquesta alteració influïa en l'EO d'aquests pacients.

No existeixen diferències estadísticament significatives en els paràmetres estudiats entre el grup amb MCV i el grup sense MCV (taula 11 i figura 23).

En valorar els resultats respecte del grup control veiem que els resultats són similars als obtinguts per la mostra de malalts dialitzats general. Els dos grups (amb i sense MCV) tenen els enzims antioxidants i el GSH més baixos que el grup control. Com a excepció, la SOD del grup sense MCV presenta valors més baixos que el grup control i el grup amb MCV no presenta diferències estadísticament significatives respecte del grup control. També s'observen els paràmetres GSSG, la ràtio GSSG/GSH, l'ORAC NP i el DPP més elevats en els dos grups que el grup control (taula 11 i figura 23).

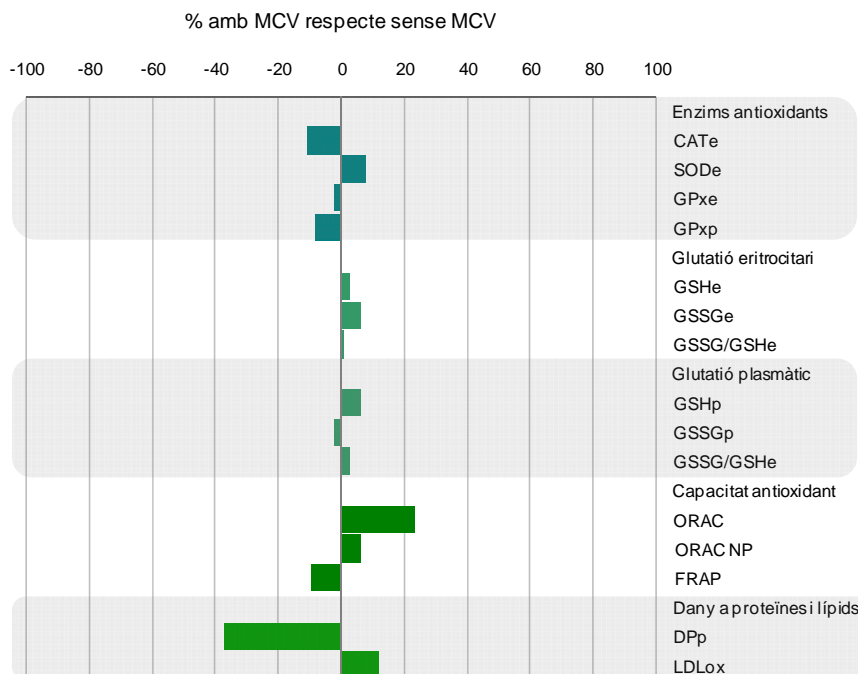
## Resultats

**Taula 11. Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRC dialitzats que presenten MCV amb el grup control**

|                                    | MRC dialitzats               |                                | Controls             |
|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------|
|                                    | Amb MCV n=16<br>Mitjana ± DE | Sense MCV n=50<br>Mitjana ± DE | n=80<br>Mitjana ± DE |
| <b>Enzims Antioxidants</b>         |                              |                                |                      |
| CAT (mmol/min/g Hb)                | 166,85 ± 30,25*              | 186,96 ± 45,99*                | 240,68 ± 47,74       |
| SOD (U/g Hb)                       | 1504,31 ± 570,74             | 1395,56 ± 622,02*              | 1811,92 ± 573,34     |
| GPxe (U/g Hb)                      | 34,27 ± 14,45*               | 34,98 ± 10,74*                 | 86,46 ± 37,43        |
| GPXp (U/L pl)                      | 48,61 ± 15,96*               | 53,06 ± 18,46*                 | 157,87 ± 51,08       |
| <b>Glutatió eritrocitari</b>       |                              |                                |                      |
| GSH (µmol/g Hb)                    | 2,35 ± 1,20*                 | 2,28 ± 1,16*                   | 4,11 ± 1,07          |
| GSSG (µmol/g Hb)                   | 1,40 ± 0,43*                 | 1,32 ± 0,50*                   | 0,62 ± 0,25          |
| GSSG/GSH                           | 1,01 ± 0,96*                 | 1,00 ± 1,59*                   | 0,18 ± 0,15          |
| <b>Glutatió plasmàtic</b>          |                              |                                |                      |
| GSH (nmol/ml pl)                   | 16,24 ± 8,88                 | 15,30 ± 5,82                   | 15,51 ± 8,85         |
| GSSG (nmol/ml pl)                  | 24,33 ± 9,17                 | 24,89 ± 7,37                   | 24,25 ± 3,91         |
| GSSG/GSH                           | 1,82 ± 0,79                  | 1,78 ± 0,65                    | 1,89 ± 0,77          |
| <b>Capacitat antioxidant total</b> |                              |                                |                      |
| ORAC (µmolTE/ml pl)                | 35,20 ± 14,79                | 28,54 ± 10,40                  | 25,52 ± 9,97         |
| ORAC NP (µmolTE/ml pl)             | 1,43 ± 0,49*                 | 1,35 ± 0,38*                   | 1,07 ± 0,35          |
| FRAP (µmolTE/ml pl)                | 0,52 ± 0,09                  | 0,57 ± 0,15                    | 0,51 ± 0,10          |
| <b>Dany a proteïnes i lípids</b>   |                              |                                |                      |
| DPp (nmol/mg prot)                 | 2,91 ± 2,46*                 | 4,60 ± 5,39*                   | 0,81 ± 0,51          |
| LDLox (U/L pl)                     | 46,01 ± 18,35                | 41,17 ± 14,03                  | NA                   |

MRC: malalts renals crònics; MCV: malaltia cardiovascular; EO: estrès oxidatiu cardiovascular; EO: íon estàndard; CAT: catalasa eritrocítica; SOD: superoxidasa eritrocítica; GPxe: glutatilutitrocítica; GPXp: glutatilutitrocítica plasmàtica; GSH: glutatilutitrocítica; GSSG: glutatilutitrocítica oxidada; ORAC: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity»; ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity»; FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma»; DPp: dany a proteïnes; LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized»; Hb: hemoglobina, pl: plasma, prot: proteïna, a, d: dany oxidatiu, rd, CAT amb el grup control, r: sense MCV, l: amb el grup control.

Figura 23: Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats amb MCV versus sense MCV



MRC: malalts renals crònics, MCV: malaltia cardiovascular, CAT: catalasa eritrocitària, SOD: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPXe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized».

## Resultats

### Consum de tabac

Es van fer tres grups dintre dels MRCs dialitzats en funció del consum de tabac: fumadors, exfumadors i no fumadors per tal d'analitzar si el tabac influïa en els paràmetres d'EO d'aquests malalts.

Es va observar que no hi havia diferències estadísticament significatives quant als valors d'EO en cap dels paràmetres estudiats entre els tres grups. En valorar els resultats respecte del grup control, els tres grups tenen els enzims antioxidants i el GSH més baixos que el grup control, excepte per l'enzim SOD. Per a la SOD el grup de MRCs dialitzats no fumadors presenta valors més baixos que el grup control i els grups exfumadors i fumadors no presenten diferències estadísticament significatives respecte del grup control per a la SOD. També s'observen els paràmetres GSSG, la ràtio GSSG/GSH i el DPp més elevats en els tres grups que el grup control (taula 12 i figura 24). Quant a la capacitat antioxidant total, l'ORAC és més elevat en el grup d'exfumadors que el grup de controls, l'ORAC NP és més elevat en els grups no fumador i fumador que els controls i finalment, el FRAP és més elevat en el grup exfumador que els controls.

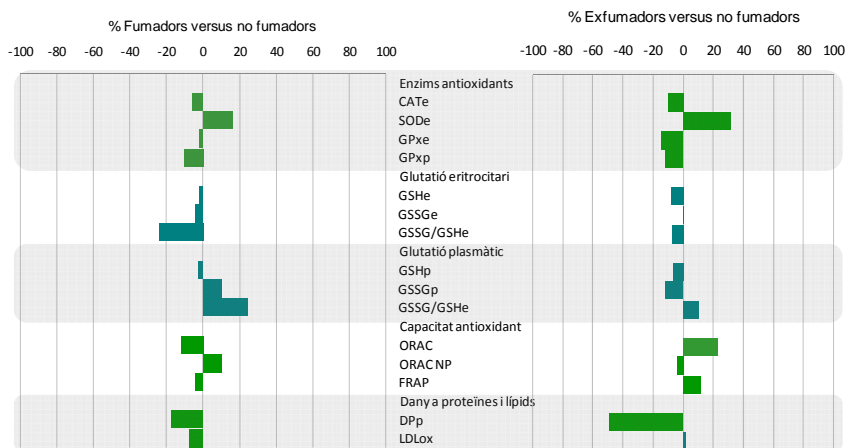
Taula 12. Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRC dialitzats en funció del consum de tabac amb el grup control.

|                                    | MRC dialitzats    |                  |                  |                  | Controls     |              |
|------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|--------------|
|                                    | No fumador n=28   |                  | Exfumador n=20   |                  | Fumador n=18 |              |
|                                    | Mitjana ± DE      | Mitjana ± DE     | Mitjana ± DE     | Mitjana ± DE     | Mitjana ± DE | Mitjana ± DE |
| <b>Enzims Antioxidants</b>         |                   |                  |                  |                  |              |              |
| CAT (mmol/min/g Hb)                | 190,87 ± 53,73*   | 171,34 ± 32,70*  | 180,37 ± 33,84*  | 240,68 ± 47,74   |              |              |
| SOD (U/g Hb)                       | 1250,20 ± 562,66* | 1645,52 ± 624,34 | 1454,50 ± 605,93 | 1811,92 ± 573,34 |              |              |
| GPxe (U/g Hb)                      | 36,56 ± 10,92*    | 31,49 ± 13,44*   | 35,77 ± 10,33*   | 86,46 ± 37,43    |              |              |
| GPxp (U/L pl)                      | 55,35 ± 18,21*    | 49,16 ± 19,26*   | 49,68 ± 15,52*   | 157,87 ± 51,08   |              |              |
| <b>Glutatió eritrocitari</b>       |                   |                  |                  |                  |              |              |
| GSH (µmol/g Hb)                    | 2,36 ± 1,27*      | 2,18 ± 1,07*     | 2,32 ± 1,13*     | 4,11 ± 1,07      |              |              |
| GSSG (µmol/g Hb)                   | 1,35 ± 0,49*      | 1,36 ± 0,44*     | 1,30 ± 0,53*     | 0,62 ± 0,25      |              |              |
| GSSG/GSH                           | 1,10 ± 2,02*      | 1,02 ± 0,93*     | 0,84 ± 0,78*     | 0,18 ± 0,15      |              |              |
| <b>Glutatió plasmàtic</b>          |                   |                  |                  |                  |              |              |
| GSH (nmol/ml pl)                   | 15,94 ± 5,10      | 14,91 ± 8,12     | 15,57 ± 7,20     | 15,51 ± 8,85     |              |              |
| GSSG (nmol/ml pl)                  | 24,89 ± 8,26      | 22,13 ± 8,15     | 27,34 ± 5,70     | 24,25 ± 3,91     |              |              |
| GSSG/GSH                           | 1,63 ± 0,52       | 1,80 ± 0,72      | 2,03 ± 0,82      | 1,89 ± 0,77      |              |              |
| <b>Capacitat antioxidant total</b> |                   |                  |                  |                  |              |              |
| ORAC (µmol/TE/ml pl)               | 29,07 ± 10,20     | 35,83 ± 15,02*   | 25,55 ± 7,54     | 25,52 ± 9,97     |              |              |
| ORAC NP (µmol/TE/ml pl)            | 1,35 ± 0,41*      | 1,30 ± 0,43      | 1,48 ± 0,36*     | 1,07 ± 0,35      |              |              |
| FRAP (µmol/TE/ml pl)               | 0,55 ± 0,13       | 0,61 ± 0,14*     | 0,53 ± 0,15      | 0,51 ± 0,10      |              |              |
| <b>Dany a proteïnes i lípids</b>   |                   |                  |                  |                  |              |              |
| DPp (nmol/mg prot)                 | 5,22 ± 5,83*      | 2,65 ± 2,79*     | 4,32 ± 4,90*     | 0,81 ± 0,51      |              |              |
| LDLox (U/L pl)                     | 43,00 ± 14,29     | 43,57 ± 12,14    | 39,96 ± 19,58    | NA               |              |              |

EO: estrès oxidatiu, HD: hemodiàlisi, PD: prediàlisi, DE: desviació estàndard, CAT: catalasa eritrocitària, SOD: superòxid dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatí peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatí reduït, GSSG: glutatí oxidat, ORAC: total oxygen radical absorbance capacity, ORAC NP: oxygen radical absorbance capacity fracció plasmàtica no proteica, FRAP: ferric reducing ability of plasma, DPp: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: low density lipoprotein oxidized, Hb: hemoglobina, pl: plasma, prot: proteïnes, NA: no avaluat; diferències estadísticament significatives (p<0,05) respecte del grup control.

## Resultats

Figura 24: Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats fumadors i exfumadors respecte del grup no fumador, respectivament



MRC: malalts renals crònics, MCV: malaltia cardiovascular, CATe: catalasa eritrocitària, SODe: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPXe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized».

## Lesió de la substància blanca

Es va mesurar si els MRCs dialitzats tenien LSB i es van fer dos grups, els que presentaven les lesions (n=36) i els que no (n=30), per valorar l'estat oxidatiu en funció d'aquest paràmetre.

No hem trobat diferències estadísticament significatives entre els MRCs dialitzats amb LSB i sense LSB. En valorar els resultats respecte del grup control, els dos grups tenen els enzims antioxidants i el GSH més baixos que el grup control excepte per l'enzim SOD. Per a la SOD el grup de MRCs dialitzats sense LSB presenta valors més baixos que el grup control i el grup amb LSB no presenta diferències estadísticament significatives respecte del grup control per a la SOD. També s'observen els paràmetres GSSG, la ràtio GSSG/GSH, ORAC NP i el DPp més elevats en els dos grups que el grup control (taula 13 i figura 25).



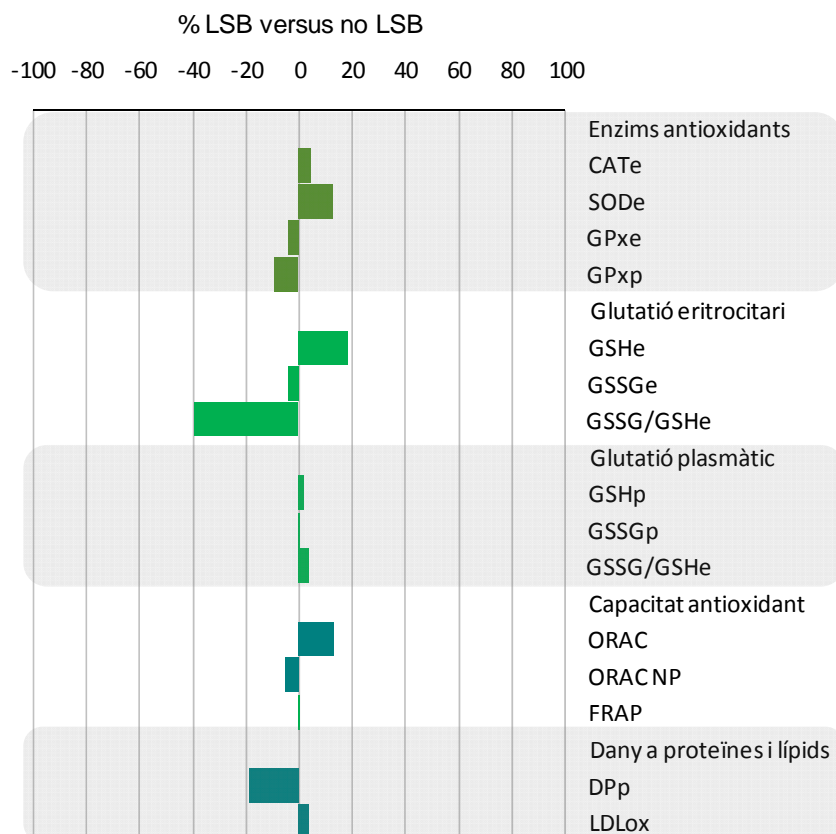
## Resultats

Taula 13. Resultats dels paràmetres d'EO comparant els MRCs dialitzats que presenten o no LSB amb el grup control

|                                    | MRC dialitzats   |                   | Controls         |
|------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|
|                                    | LSB n=36         | No LSB n=30       | n=80             |
|                                    | Mitjana ± DE     | Mitjana ± DE      | Mitjana ± DE     |
| <b>Enzims Antioxidants</b>         |                  |                   |                  |
| CAT (mmol/min/g Hb)                | 185,57 ± 47,44*  | 177,90 ± 38,30*   | 240,68 ± 47,74   |
| SOD (U/g Hb)                       | 1500,64 ± 697,18 | 1330,97 ± 477,41* | 1811,92 ± 573,34 |
| GPxe (U/g Hb)                      | 34,15 ± 11,70*   | 35,60 ± 11,69*    | 86,46 ± 37,43    |
| GPxp (U/L pl)                      | 49,67 ± 19,65*   | 54,82 ± 15,21*    | 157,87 ± 51,08   |
| <b>Glutatió eritrocitari</b>       |                  |                   |                  |
| GSH (μmol/g Hb)                    | 2,47 ± 1,21*     | 2,08 ± 1,08*      | 4,11 ± 1,07      |
| GSSG (μmol/g Hb)                   | 1,32 ± 0,44*     | 1,37 ± 0,53*      | 0,62 ± 0,25      |
| GSSG/GSH                           | 0,77 ± 0,63*     | 1,28 ± 2,03*      | 0,18 ± 0,15      |
| <b>Glutatió plasmàtic</b>          |                  |                   |                  |
| GSH (nmol/ml pl)                   | 15,66 ± 6,81     | 15,36 ± 6,51      | 15,51 ± 8,85     |
| GSSG (nmol/ml pl)                  | 24,77 ± 7,63     | 24,75 ± 8,01      | 24,25 ± 3,91     |
| GSSG/GSH                           | 1,82 ± 0,75      | 1,75 ± 0,61       | 1,89 ± 0,77      |
| <b>Capacitat antioxidant total</b> |                  |                   |                  |
| ORAC (μmolTE/ml pl)                | 31,87 ± 12,11    | 28,1 ± 11,38      | 25,52 ± 9,97     |
| ORAC NP (μmolTE/ml pl)             | 1,33 ± 0,37*     | 1,41 ± 0,44*      | 1,07 ± 0,35      |
| FRAP (μmolTE/ml pl)                | 0,56 ± 0,11      | 0,56 ± 0,17       | 0,51 ± 0,1       |
| <b>Dany a proteïnes i lípids</b>   |                  |                   |                  |
| DPP (nmol/mg prot)                 | 3,78 ± 4,58*     | 4,66 ± 5,23*      | 0,81 ± 0,51      |
| LDLox (U/L pl)                     | 43,00 ± 14,07    | 41,55 ± 16,62     | NA               |

EO: estrès oxidatiu, HD: hemodiàlisi, LSB: lesió de la substància blanca, PD: prediàlisi, DE: desviació estàndard, CATE: catalasa eritrocitària, SODe: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized», Hb: hemoglobina, pl: plasma, prot: proteïnes, \*: diferències estadísticament significatives (p<0,05) respecte del grup control, †: diferències estadísticament significatives (p<0,05) respecte del grup prediàlisi.

Figura 25: Representació dels paràmetres d'EO dels MRCs dialitzats amb LSB respecte dels no LSB



MRC: malalts renals crònics, MCV: malaltia cardiovascular, CATE: catalasa eritrocitària, SODE: superòxid-dismutasa eritrocitària, GPxe-p: glutatió peroxidasa eritrocitària o plasmàtica, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, ORAC: de l'anglès «total oxygen radical absorbance capacity», ORAC NP: de l'anglès «oxygen radical absorbance capacity» fracció plasmàtica no proteica, FRAP: de l'anglès «ferric reducing ability of plasma», DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, LDLox: de l'anglès «low density lipoprotein oxidized».

## Resultats

# 4. Resultats del perfil metabolòmic

S'ha analitzat el perfil metabolòmic en les mostres dels MRCs dialitzats (n=64) i del grup control (n=79) utilitzant una tècnica de metabolòmica no dirigida per tal de determinar quins metabòlits es troben alterats a la MRC i poder concretar si algun d'ells podria ser un bon biomarcador de la malaltia.

Els resultats s'han classificat en funció de la naturalesa de la molècula analitzada, de manera que s'han detectat, d'una banda, els aminoàcids (9 metabòlits) i, d'altra banda, altres molècules del metabolisme (15 metabòlits) i, finalment, les molècules relacionades amb el perfil lipídic (27 metabòlits) tal com es mostra a la taula 14. A més, es va voler estudiar si l'etiologia modificava el perfil metabolòmic d'aquests pacients, així com la presència d'alteracions concomitants de la MRC.

## 4.1 Diferències generals entre malalts renals crònics dialitzats i controls

Els següents resultats mostren els metabòlits detectats mitjançant un anàlisi no dirigida de metabolòmica per tal de comparar els MRCs dialitzats i els controls sans.

Quant als aminoàcids observem que la fenilalanina, la glicina i la metilhistidina es troben augmentades en els MRCs dialitzats, i la leucina, tirosina i valina disminuïdes quan ho comparem amb el grup control (figura 26).

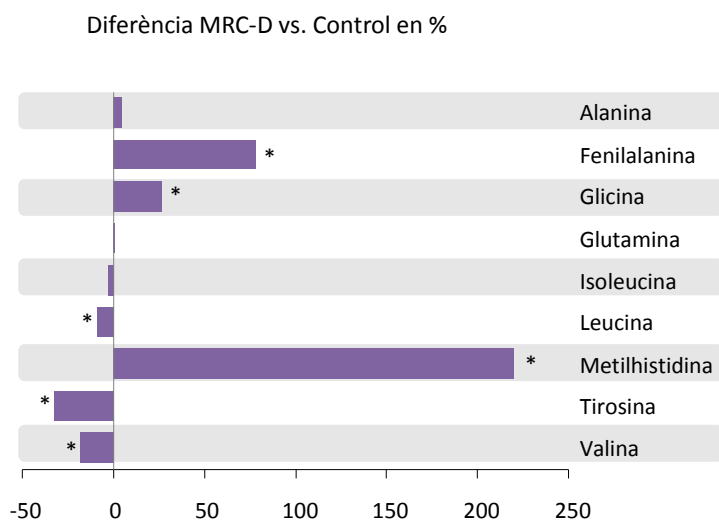
Taula 14: Classificació dels metabòlits detectats per metabolòmica

| <b>Aminoàcids</b>        | <b>Metabolisme lipídic</b> |
|--------------------------|----------------------------|
| Alanina                  | Colesterol total           |
| Fenilalanina             | Colesterol lliure          |
| Glicina                  | Colesterol esterificat     |
| Glutamina                | VLDLC3-5                   |
| Isoleucina               | VLDLC3-6                   |
| Leucina                  | VLDL-IDLC3-7               |
| Metilhistidina           | LDLC3-8                    |
| Tirosina                 | HDLC3-9                    |
| Valina                   | HDLC3-10                   |
|                          | HDLC3-11                   |
|                          | HDLC3-12                   |
| <b>Altres metabòlits</b> | Triglicèrids               |
| Glucosa                  | Diglicèrids                |
| Piruvat                  | Monoglicèrids              |
| Lactat                   | Fosfolípids totals         |
| Colina                   | Fosfatidil colines         |
| 3-hidroxitbutirat        | Fosfatidil Inositol        |
| 3-glicerofosfocolina     | Esfingomielina             |
| Format                   | Plasmalogen                |
| Acetat                   | w-3                        |
| Succinat                 | Oleic                      |
| Malonat                  | ARA+EPA                    |
| Creatina                 | DHA                        |
| Creatinina               | Linolenic                  |
| Creatinina fosfat        | PUFA                       |
| Hipurat                  | MUFA                       |
| Trigonelina              | PUFA/MUFA                  |

VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», IDLC: de l'anglès «*intermediate density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, DHA: àcid docosahexaenoic, PUFA: àcids grassos poliinsaturats, MUFA: àcids grassos monoinsaturats.

## Resultats

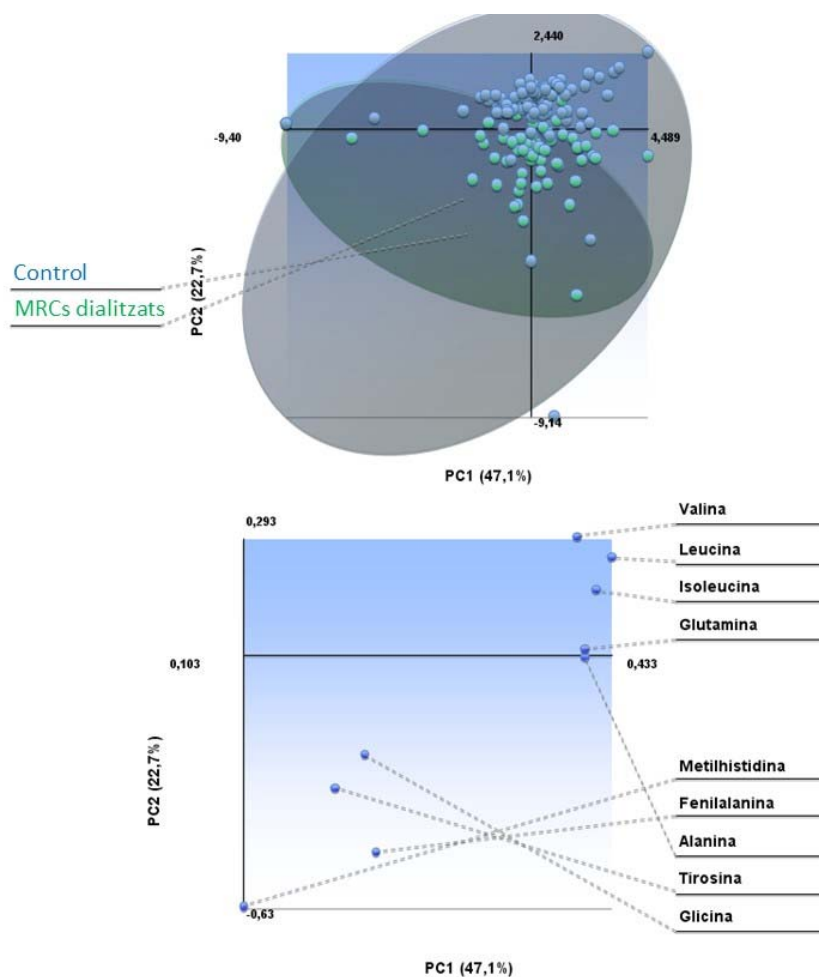
Figura 26: Mapa de tendència de les diferències en els aminoàcids detectats entre el grup de MRCs dialitzats i el grup control



Eix de les X, tant per cent. Eix de les Y, aminoàcids detectats per RMN. MRCs: malalts renals crònics, \*: diferències estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ) entre el grup dels MRCs dialitzats i el grup control.

Si fem una anàlisi de component principal (PCA) (figura 27) observem que els metabòlits que tenen més pes en el grup dels MRCs dialitzats són la metilhistidina, la fenilalanina, la tirosina i la glicina.

Figura 27. Resultats PCA per als aminoàcids analitzats entre el grup de MRCs dialitzats i el grup control

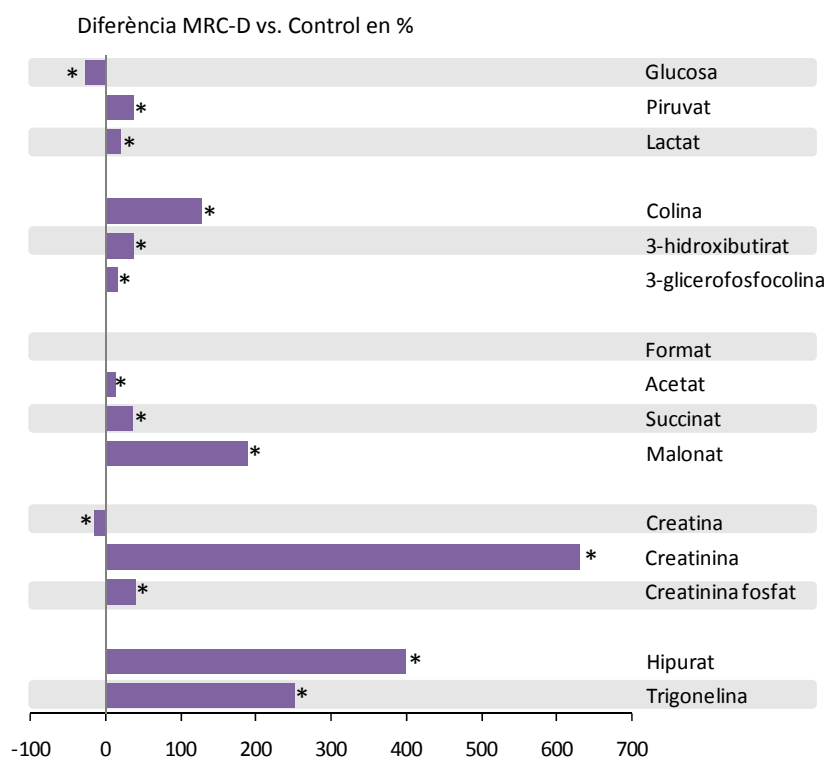


PCA: anàlisi de components principals, MRCs malalts renals crònics. Al gràfic de dalt, cada punt representa un individu, els diferents grups estan diferenciats en diferents colors: verd per al grup de MRCs dialitzats i blau per al grup control. Al gràfic de sota, cada punt representa un aminoàcid.

## Resultats

Quant als metabòlits, en comparar els resultats respecte del grup control observem que en els malalts renals hi ha una disminució dels nivells de glucosa i creatina i un augment de piruvat, lactat, colina, 3-hidroxitiriat, 3-glicerofosfocolina, acetat, succinat, malonat, creatinina, creatinina fosfat, hipurat i trigonelina (figura 28).

Figura 28: Mapa de tendència de les diferències en els metabòlits entre el grup de MRCs dialitzats i el grup control



Eix de les X, tant per cent. Eix de les Y, aminoàcids detectats per RMN. MRCs: malalts renals crònics, \*: diferències estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ) entre el grup dels MRCs dialitzats i el grup control.

## *Resultats*

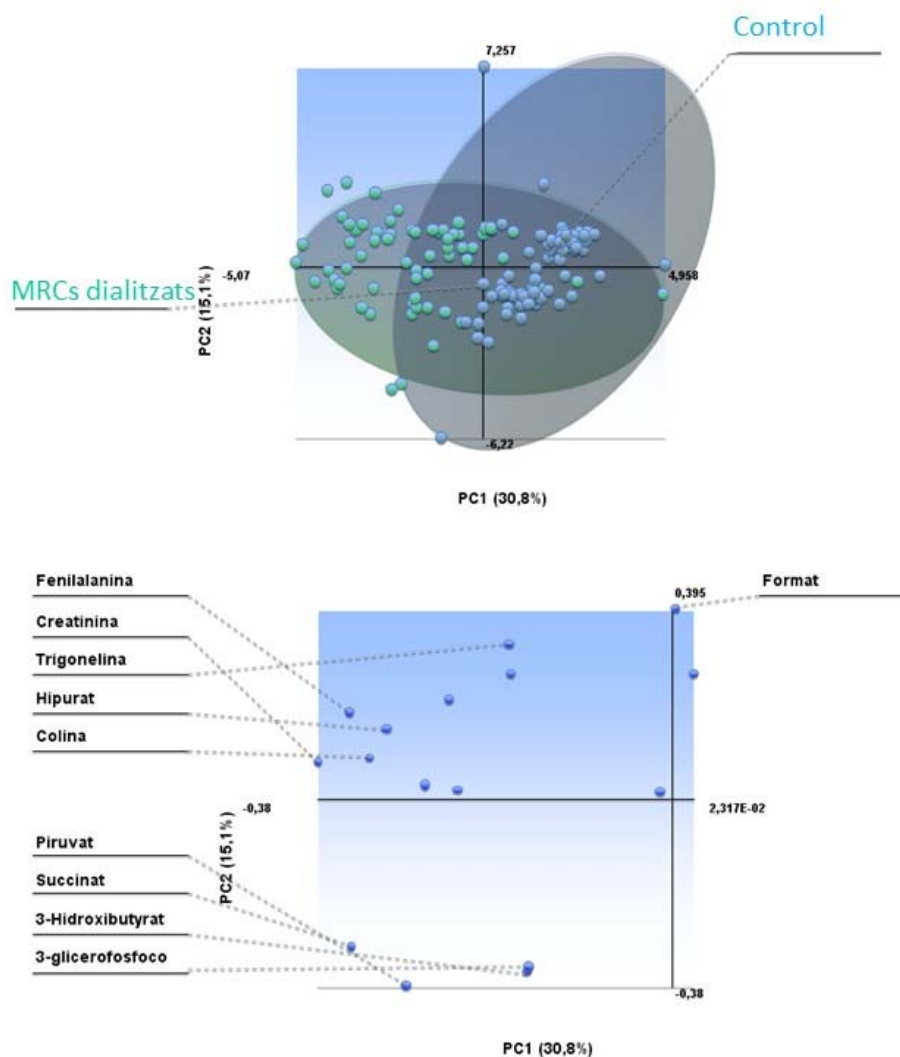
En fer la PCA per aquests paràmetres, s'observa que els metabòlits que tenen més pes en el grup dels MRCs dialitzats són la creatinina, el succinat, la colina, el piruvat, la trigonel·lina i l'hipurat (figura 29).

Quant al perfil lipídic, observem una disminució en els malalts renals dels valors del colesterol total i esterificat, les HDL, el plasmalogen i l'àcid linolènic. En canvi, s'observa un augment de les VLDL, els triglicèrids, els diglicèrids i els monoglicèrids, l'àcid oleic, l'ARA+EPA, el DHA, els PUFA i els MUFA (figura 30). Veiem, per tant, que tenen un perfil lipídic diferent; no obstant això, si observem els resultats de la PCA, no veiem que hi hagi gaire separació entre els grups; per tant, no podem dir quin component és el principal per a cada grup (figura 31).



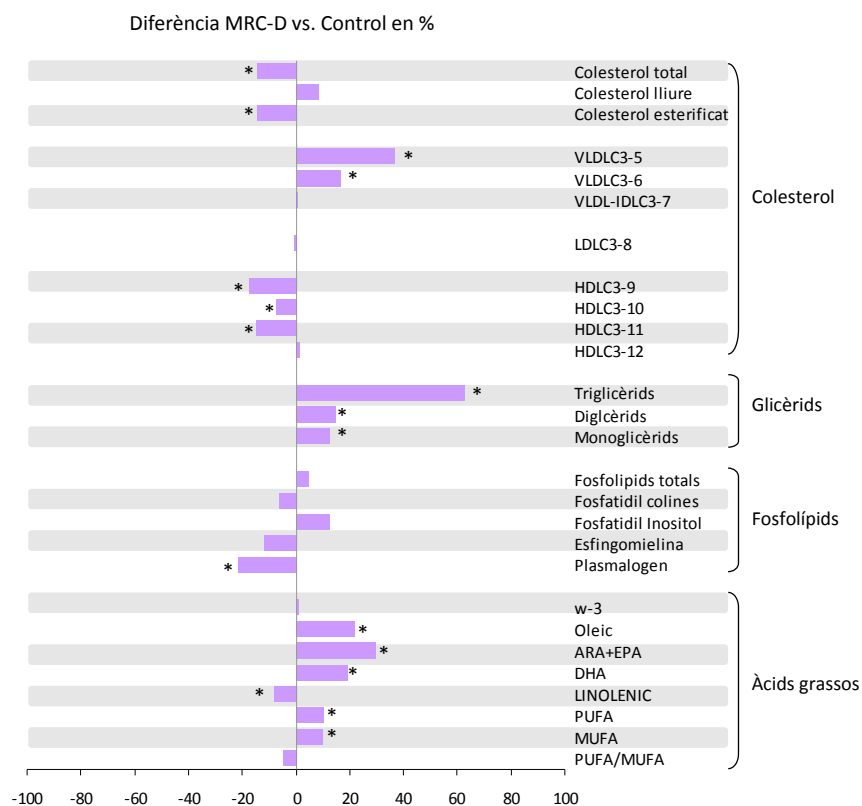
## Resultats

Figura 29. Resultats PCA per als metabòlits



PCA: anàlisi de component principal, MRCs: malalts renals crònics. Al gràfic de dalt, cada punt representa un individu i els diferents grups estan diferenciats en diferents colors: verd per al grup dels MRCs dialitzats i blau per al grup control. Al gràfic de sota, cada punt representa un metabòlit. Els metabòlits representats són els que tenen més pes dintre de cada grup i, per tant, separen els tractaments per component principal.

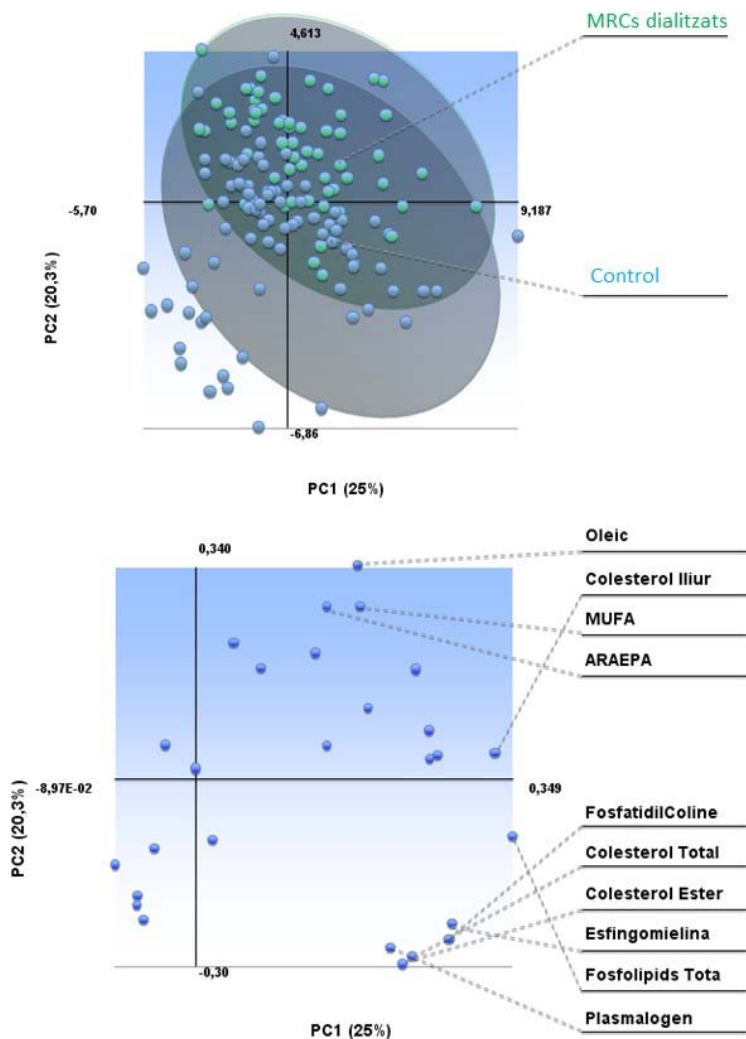
Figura 30: Mapa de tendència de les diferències en els metabòlits de perfil lipídic entre el grup dels MRCs dialitzats i el grup control



MRCs malalts renals crònics, \*: diferències estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ). Eix de les Y, metabòlits de perfil lipídic detectats per RMN. Eix de les X, tant per cent. VLDC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», IDLC: de l'anglès «*intermediate density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaènic, DHA: àcid docosahexaènic, PUFA: àcids grassos poliinsaturats, MUFA: àcids grassos monoinsaturats.

## Resultats

Figura 31. Resultats PCA per als metabòlits de perfil lipídic



PCA: anàlisi de component principal, PC: component principal, MRCs malalts renals crònics, MUFA: àcids grassos monoinsaturats, ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic. Al gràfic de dalt, cada punt representa un individu i els diferents grups estan diferenciats en diferents colors: verd per al grup dels MRCs dialitzats i blau per al grup control. Al gràfic de sota, cada punt representa un metabòlit. Els metabòlits representats són els que tenen més pes dintre de cada grup i, per tant, separen els tractaments per component principal.

## 4.2 Anàlisi del perfil metabolòmic en funció de l'etiologia

Per tal de determinar les diferències en els resultats del perfil metabolòmic en funció de l'etiologia de la MRC es van fer subgrups dintre del grup dels MRCs dialitzats. Aquests subgrups van ser els següents:

- Etiologia vascular (n=5)
- Etiologia glomerular (n=15)
- Etiologia diabètica (n=9)
- Etiologia intersticial/quística (n=15)

No es van trobar diferències estadísticament significatives entre les diferents etiologies. Però si que s'observen diferències respecte del grup control que són diferents per cada grup d'etiologia i s'exposen a continuació. Només es mostren els paràmetres que han donat diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

### Etiologia vascular

A la taula 15 es mostren els resultats del perfil metabolòmic dels MRCs dialitzats d'etiologia vascular expressats com àrea sota la corba dels paràmetres que han tingut diferències estadísticament significatives respecte del grup control. Tot i que l'anàlisi ens pot donar una idea de les peculiaritats d'aquest grup de pacients, el baix nombre d'individus

## Resultats

que el formen (n=5) fa que treballem amb cautela aquests resultats, que no són estadísticament robustos.

**Taula 15. Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia vascular amb el grup control**

| Metabòlits                 | Vascular n=5  | Control n=79  | p      |
|----------------------------|---------------|---------------|--------|
|                            | Mitjana ± DE  | Mitjana ± DE  |        |
| <b>Aminoàcids</b>          |               |               |        |
| Fenilalanina               | 0,113 ± 0,060 | 0,097 ± 0,028 | 0,042  |
| Leucina                    | 0,226 ± 0,052 | 0,284 ± 0,057 | 0,029  |
| Metilhistidina             | 0,142 ± 0,058 | 0,010 ± 0,030 | 0,001  |
| Tirosina                   | 0,030 ± 0,020 | 0,102 ± 0,073 | 0,033  |
| Valina                     | 0,305 ± 0,074 | 0,411 ± 0,079 | 0,006  |
| <b>Altres metabòlits</b>   |               |               |        |
| Colina                     | 0,267 ± 0,069 | 0,140 ± 0,028 | <0,001 |
| Malonat                    | 0,117 ± 0,116 | 0,033 ± 0,017 | 0,003  |
| Creatinina                 | 1,103 ± 0,519 | 0,156 ± 0,040 | <0,001 |
| Creatinina fosfat          | 0,203 ± 0,154 | 0,095 ± 0,030 | 0,046  |
| Hipurat                    | 0,195 ± 0,296 | 0,033 ± 0,036 | 0,009  |
| Trigonelina                | 0,102 ± 0,054 | 0,005 ± 0,024 | 0,002  |
| <b>Metabolisme lipídic</b> |               |               |        |
| Colesterol esterificat     | 3,239 ± 1,053 | 4,142 ± 1,118 | 0,044  |
| VDL3-5                     | 0,146 ± 0,016 | 0,094 ± 0,034 | 0,003  |
| HDLC3-9                    | 0,123 ± 0,021 | 0,160 ± 0,026 | 0,004  |
| HDLC3-10                   | 0,100 ± 0,013 | 0,119 ± 0,017 | 0,019  |
| Triglicèrids               | 2,451 ± 0,917 | 1,609 ± 0,684 | 0,040  |
| Oleic                      | 0,376 ± 0,022 | 0,310 ± 0,066 | 0,002  |
| ARA+EPA                    | 0,092 ± 0,005 | 0,064 ± 0,018 | <0,001 |
| DHA                        | 0,018 ± 0,003 | 0,013 ± 0,003 | 0,003  |
| PUFA                       | 0,258 ± 0,032 | 0,207 ± 0,035 | 0,005  |

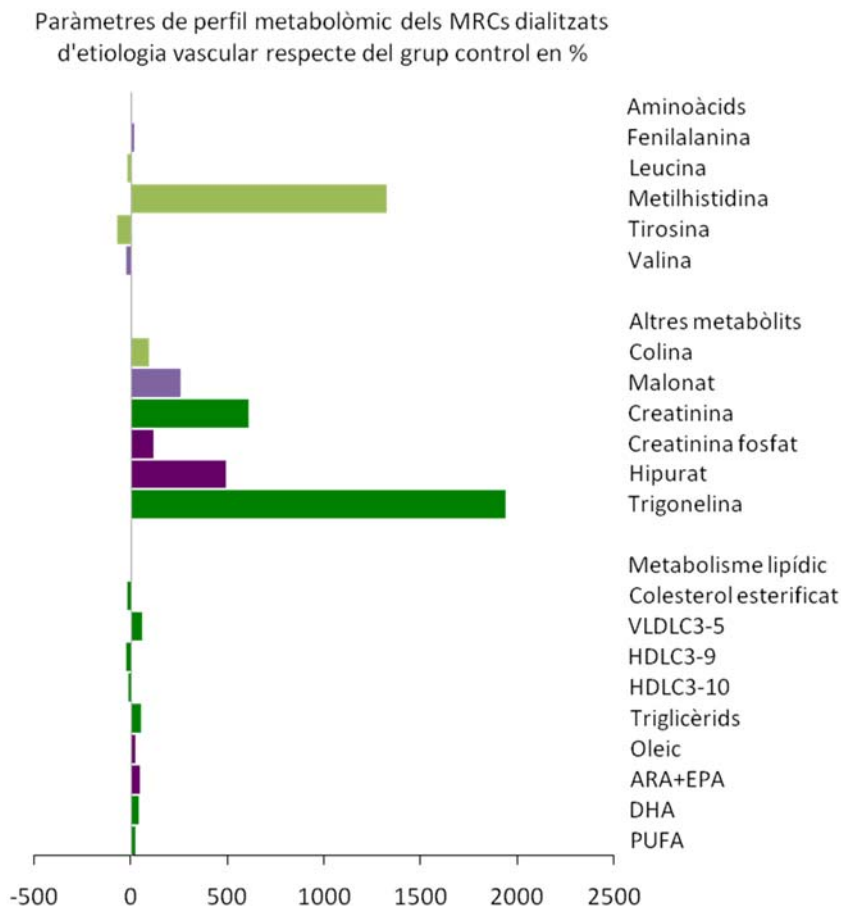
VDL3: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaènic, DHA: àcid docosahexaènic, PUFA: àcids grassos poliinsaturats.

## Resultats

Dels aminoàcids detectats, s'observa que la fenilalanina (16,5%) i la metilhistidina (1320,0%) estan augmentats respecte del grup control i la leucina (-20,4%), la tirosina (-70,6%) i la valina (-25,8%) disminuïdes. Quan als altres metabòlits, la colina (90,7%), malonat (254,5%), creatinina (607,0%), creatinina fosfat (113,7%), hipurat (490,9%) i trigonelina (1940,0%) es troben augmentats en els MRCs dialitzats d'etiologia vascular respecte del grup control. Per als metabòlits del metabolisme lipídic veiem valors més baixos de colesterol esterificat (-21,8%), HDL3-9 (-23,1%) i HDL3-10 (-15,9%) que el grup control i VLDL3-5 (55,3%), triglicèrids (52,3%), oleic (21,3%), ARA+EPA (43,7%), DHA (38,5%) i PUFA (24,6%) més elevats (figura 32).

## Resultats

Figura 32: Representació gràfica dels metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia vascular amb el grup control



VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, DHA: àcid docosahexaenoic, PUFA: àcids grassos poliinsaturats.

## Etiologia glomerular

A la taula 16 es mostren els resultats del perfil metabolòmic dels MRCs dialitzats d'etiologia glomerular expressats com àrea sota la corba dels paràmetres que han tingut diferències estadísticament significatives respecte del grup control.

Dels aminoàcids detectats, observem que la fenilalanina (39,2%), la glicina (197,3%) i la metilhistidina (1890,0%) estan augmentades respecte del grup control i la tirosina (-63,7%) i la valina (-17,0%) disminuïdes. Quan als altres metabòlits, el piruvat (52,9%), el lactat (17,8%), la colina (177,1%), el 3-hidroxibutirat (61,1%), l'acetat (18,1%), el succinat (42,5%), el malonat (127,3%), la creatinina (688,5%), la creatinina fosfat (76,8%), l'hipurat (215,1%) i la trigonelina (2360,0%) es troben augmentats en els MRCs dialitzats d'etiologia vascular respecte del grup control i la glucosa (-94,8%) i la creatina (-26,5%) disminuïdes. Per als metabòlits del metabolisme lipídic veiem valors més elevats de VLDL3-5 (55,3%), triglicèrids (52,3%), oleic (21,3%), ARA+EPA (43,7%), DHA (38,5%) i PUFA (24,6%) i més baixos de colesterol esterificat (-21,8%), HDL3-9 (-23,1%) i HDL3-10 (-15,9%) que el grup control (figura 33).



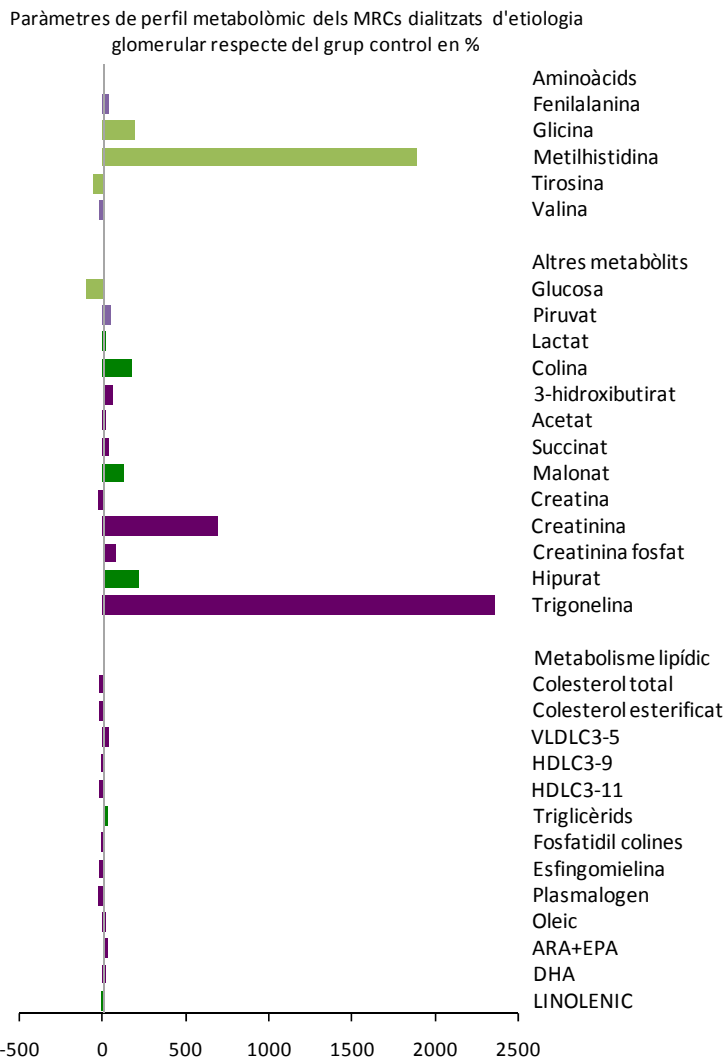
## Resultats

Taula 16: Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia glomerular amb la resta d'etiologies i el grup control

| Metabòlits                 | Glomerular n=17 |  | Control n=79  |        |
|----------------------------|-----------------|--|---------------|--------|
|                            | Mitjana ± DE    |  | Mitjana ± DE  | p      |
| <b>Aminoàcids</b>          |                 |  |               |        |
| Fenilalanina               | 0,135 ± 0,062   |  | 0,097 ± 0,028 | <0,001 |
| Glicina                    | 0,999 ± 0,135   |  | 0,336 ± 0,116 | 0,001  |
| Metilhistidina             | 0,199 ± 0,059   |  | 0,010 ± 0,030 | <0,001 |
| Tirosina                   | 0,037 ± 0,027   |  | 0,102 ± 0,073 | 0,024  |
| Valina                     | 0,341 ± 0,074   |  | 0,411 ± 0,079 | 0,001  |
| <b>Altres metabòlits</b>   |                 |  |               |        |
| Glucosa                    | 0,075 ± 0,020   |  | 1,445 ± 1,519 | 0,035  |
| Piruvat                    | 0,052 ± 0,014   |  | 0,034 ± 0,016 | <0,001 |
| Lactat                     | 3,943 ± 1,003   |  | 3,346 ± 0,800 | 0,018  |
| Colina                     | 0,388 ± 0,221   |  | 0,140 ± 0,028 | <0,001 |
| 3-hidroxi-butirat          | 0,145 ± 0,094   |  | 0,090 ± 0,085 | <0,001 |
| Acetat                     | 1,576 ± 0,467   |  | 1,334 ± 0,170 | 0,020  |
| Succinat                   | 0,114 ± 0,024   |  | 0,080 ± 0,026 | <0,001 |
| Malonat                    | 0,075 ± 0,054   |  | 0,033 ± 0,017 | <0,001 |
| Creatina                   | 0,100 ± 0,056   |  | 0,136 ± 0,055 | 0,012  |
| Creatinina                 | 1,230 ± 0,380   |  | 0,156 ± 0,040 | <0,001 |
| Creatinina fosfat          | 0,168 ± 0,072   |  | 0,095 ± 0,030 | <0,001 |
| Hipurat                    | 0,104 ± 0,091   |  | 0,033 ± 0,036 | <0,001 |
| Trigonelina                | 0,123 ± 0,055   |  | 0,005 ± 0,024 | <0,001 |
| <b>Metabolisme lipídic</b> |                 |  |               |        |
| Colesterol total           | 4,313 ± 1,200   |  | 5,729 ± 1,583 | 0,002  |
| Colesterol esterificat     | 3,171 ± 0,984   |  | 4,142 ± 1,118 | 0,002  |
| VLDLC3-5                   | 0,129 ± 0,056   |  | 0,094 ± 0,034 | 0,016  |
| HDLC3-9                    | 0,141 ± 0,042   |  | 0,160 ± 0,026 | 0,029  |
| HDLC3-11                   | 0,105 ± 0,025   |  | 0,126 ± 0,020 | 0,001  |
| Triglicèrids               | 2,133 ± 0,730   |  | 1,609 ± 0,684 | 0,009  |
| Fosfatidil colines         | 2,815 ± 0,584   |  | 3,322 ± 0,770 | 0,012  |
| Esfingomielina             | 0,427 ± 0,101   |  | 0,569 ± 0,204 | 0,012  |
| Plasmalogen                | 0,064 ± 0,029   |  | 0,095 ± 0,043 | 0,014  |
| Oleic                      | 0,378 ± 0,034   |  | 0,310 ± 0,066 | <0,001 |
| ARA+EPA                    | 0,085 ± 0,018   |  | 0,064 ± 0,018 | <0,001 |
| DHA                        | 0,016 ± 0,003   |  | 0,013 ± 0,003 | 0,002  |
| Linolenic                  | 0,164 ± 0,033   |  | 0,187 ± 0,021 | 0,003  |

VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, DHA: àcid docosahexaenoic.

Figura 33: Representació gràfica dels metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia glomerular amb el grup control



MRCs malalts renals crònics,. VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, DHA: àcid docosahexaenoic

## Resultats

### Etiologia diabètica

A la taula 17 es mostren els resultats del perfil metabolòmic dels MRCs dialitzats d'etiologia diabètica expressats com àrea sota la corba dels paràmetres que han tingut diferències estadísticament significatives respecte del grup control.

Dels aminoàcids detectats, observem que la fenilalanina (61,8%) i la metilhistidina (1300,0%) estan augmentades respecte del grup control i la tirosina (-74,43%) disminuïda. Quan als altres metabòlits, el lactat (20,8%), la colina (97,8%), l'acetat (9,9%), el succinat (22,5%), el malonat (166,6%), la creatinina (478,2%), la creatinina fosfat (74,7%), l'hipurat (78,8%) i la trigonelina (2800,0%) es troben augmentats en els MRCs dialitzats d'etiologia vascular respecte del grup control i el format (-96,5%) disminuït. Per als metabòlits del metabolisme lipídic veiem valors més elevats de VLDL3-5 (53,2%), VLDL3-6 (43,7%), triglicèrids (122,4%), diglicèrids (49,2%), monoglicèrids (52,3%), fosfolípids totals (14,9%), fosfatidil inositol (58,4%), àcid oleic (29,0%) i ARA+EPA (26,6%) i més baixos de VLDL-IDLC3-7 (-18,5%), HDL3-9 (-27,5%), HDL3-10 (-9,2%), HDL3-11 (-22,2%) i l'àcid linolenic (-14,4%) que el grup control (figura 34).

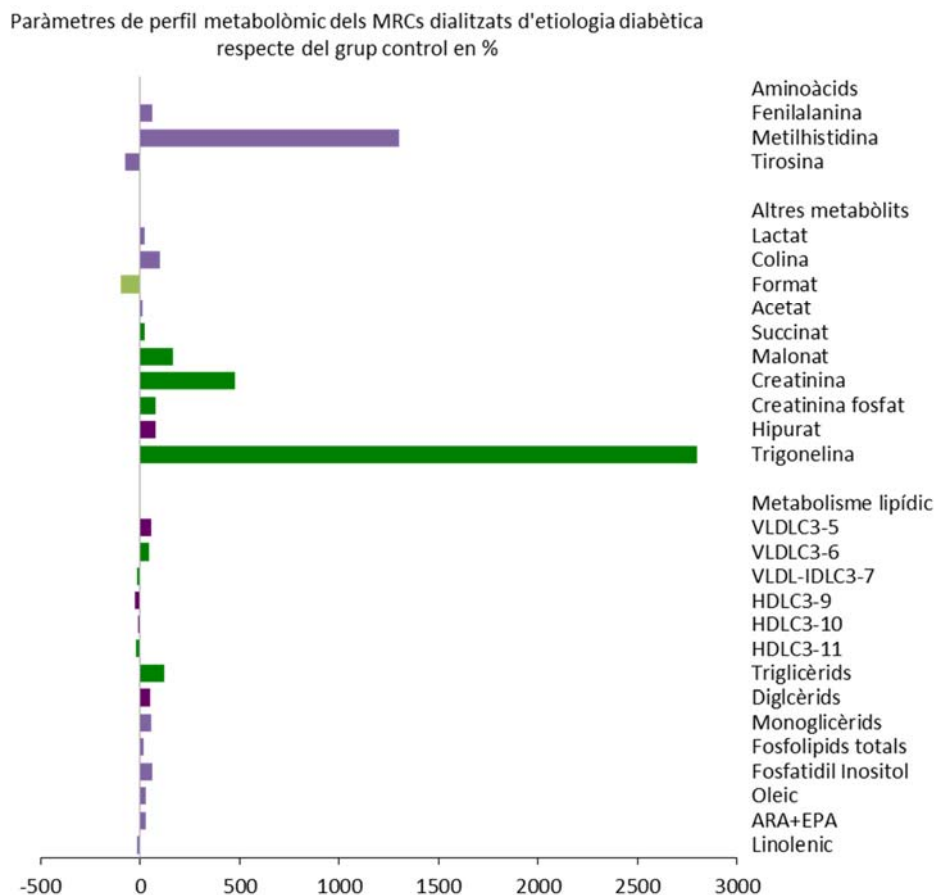
Taula 17: Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia diabètica amb la resta d'etiologies i el grup control

| Metabòlits                 | Diabètica n=9 | Control n=79  | p      |
|----------------------------|---------------|---------------|--------|
|                            | Mitjana ± DE  | Mitjana ± DE  |        |
| <b>Aminoàcids</b>          |               |               |        |
| Fenilalanina               | 0,157 ± 0,053 | 0,097 ± 0,028 | <0,001 |
| Metilhistidina             | 0,140 ± 0,038 | 0,010 ± 0,030 | <0,001 |
| Tirosina                   | 0,022 ± 0,025 | 0,102 ± 0,073 | <0,001 |
| <b>Altres metabòlits</b>   |               |               |        |
| Lactat                     | 4,043 ± 1,391 | 3,346 ± 0,800 | 0,013  |
| Colina                     | 0,277 ± 0,090 | 0,140 ± 0,028 | <0,001 |
| Format                     | 0,005 ± 0,004 | 0,141 ± 0,035 | 0,041  |
| Acetat                     | 1,466 ± 0,448 | 1,334 ± 0,170 | 0,002  |
| Succinat                   | 0,098 ± 0,033 | 0,080 ± 0,026 | 0,037  |
| Malonat                    | 0,088 ± 0,042 | 0,033 ± 0,017 | <0,001 |
| Creatinina                 | 0,902 ± 0,557 | 0,156 ± 0,040 | <0,001 |
| Creatinina fosfat          | 0,166 ± 0,065 | 0,095 ± 0,030 | 0,044  |
| Hipurat                    | 0,059 ± 0,036 | 0,033 ± 0,036 | <0,001 |
| Trigonelina                | 0,145 ± 0,049 | 0,005 ± 0,024 | <0,001 |
| <b>Metabolisme lipídic</b> |               |               |        |
| VLDLC3-5                   | 0,144 ± 0,039 | 0,094 ± 0,034 | <0,001 |
| VLDLC3-6                   | 0,181 ± 0,054 | 0,126 ± 0,031 | <0,001 |
| VLDL-IDLC3-7               | 0,123 ± 0,038 | 0,151 ± 0,025 | 0,020  |
| HDLC3-9                    | 0,116 ± 0,022 | 0,160 ± 0,026 | <0,001 |
| HDLC3-10                   | 0,108 ± 0,016 | 0,119 ± 0,017 | 0,047  |
| HDLC3-11                   | 0,098 ± 0,029 | 0,126 ± 0,020 | 0,007  |
| Triglicèrids               | 3,579 ± 1,844 | 1,609 ± 0,684 | <0,001 |
| Diglicèrids                | 1,138 ± 0,616 | 0,763 ± 0,236 | 0,004  |
| Monoglicèrids              | 0,696 ± 0,435 | 0,457 ± 0,144 | 0,004  |
| Fosfolípids totals         | 3,346 ± 0,676 | 2,913 ± 0,816 | 0,047  |
| Fosfatidil Inositol        | 2,725 ± 1,788 | 1,720 ± 0,625 | 0,003  |
| Oleic                      | 0,400 ± 0,031 | 0,310 ± 0,066 | <0,001 |
| ARA+EPA                    | 0,081 ± 0,014 | 0,064 ± 0,018 | 0,011  |
| Linolenic                  | 0,160 ± 0,019 | 0,187 ± 0,021 | 0,001  |

VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», IDLC: de l'anglès «*intermediate density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic

## Resultats

Figura 34: Representació gràfica dels metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia diabètica amb el grup control



MRCs malalts renals crònics,. VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», IDLC: de l'anglès «*intermediate density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaènic

## Etiologia intersticial-quística

A la taula 18 es mostren els resultats del perfil metabolòmic dels MRCs dialitzats d'etiologia intersticial/quística expressats com àrea sota la corba dels paràmetres que han tingut diferències estadísticament significatives respecte del grup control.

Dels aminoàcids detectats, observem que la fenilalanina (49,5%), la glicina (186,6%) i la metilhistidina (1760,0%) estan augmentades respecte del grup control i la tirosina (-66,7%) i la valina (15,8%) disminuïdes. Quan als altres metabòlits, el piruvat (29,4%), el lactat (21,7%), la colina (127,9%), la 3-glicerofosfocolina (83,64%), l'acetat (12,7%), el succinat (41,2%), el malonat (206,1%), la creatinina (714,1%), la creatinina fosfat (110,5%), l'hipurat (312,1%) i la trigonelina (2560,0%) es troben augmentats en els MRCs dialitzats d'etiologia vascular respecte del grup control i la glucosa (-95,4%) i la creatina (-30,9%) disminuïdes. Per als metabòlits del metabolisme lipídic veiem valors més elevats de triglicèrids (51,3%), VLDL3-5 (31,9%), àcid oleic (18,7%), ARA+EPA (31,2%), DHA (15,4%) i PUFA (13,0%) i més baixos de HDL3-9 (-15,6%) que el grup control (figura 35).

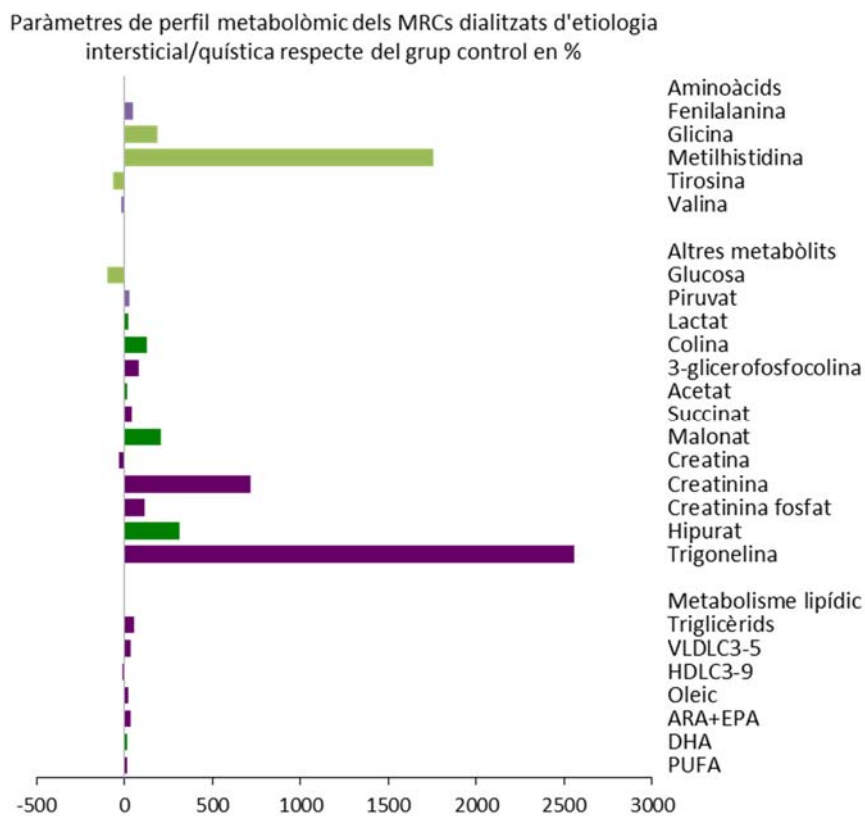
## Resultats

**Taula 18: Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia intersticial/quística amb la resta d'etiologies i el grup control**

| Metabòlits                 | Intersticial/quística n=15 | Control n=79  | p      |
|----------------------------|----------------------------|---------------|--------|
|                            | Mitjana ± DE               | Mitjana ± DE  |        |
| <b>Aminoàcids</b>          |                            |               |        |
| Fenilalanina               | 0,145 ± 0,056              | 0,097 ± 0,028 | <0,001 |
| Glicina                    | 0,963 ± 0,190              | 0,336 ± 0,116 | <0,001 |
| Metilhistidina             | 0,186 ± 0,071              | 0,010 ± 0,030 | <0,001 |
| Tirosina                   | 0,034 ± 0,013              | 0,102 ± 0,073 | <0,001 |
| Valina                     | 0,346 ± 0,069              | 0,411 ± 0,079 | 0,001  |
| <b>Altres metabòlits</b>   |                            |               |        |
| Glucosa                    | 0,067 ± 0,013              | 1,445 ± 1,519 | 0,015  |
| Piruvat                    | 0,044 ± 0,010              | 0,034 ± 0,016 | 0,001  |
| Lactat                     | 4,072 ± 1,195              | 3,346 ± 0,800 | 0,030  |
| Colina                     | 0,319 ± 0,068              | 0,140 ± 0,028 | <0,001 |
| 3-glicerofosfolina         | 0,303 ± 0,139              | 0,165 ± 0,141 | 0,048  |
| Acetat                     | 1,503 ± 0,234              | 1,334 ± 0,170 | 0,008  |
| Succinat                   | 0,113 ± 0,022              | 0,080 ± 0,026 | <0,001 |
| Malonat                    | 0,101 ± 0,072              | 0,033 ± 0,017 | <0,001 |
| Creatina                   | 0,094 ± 0,086              | 0,136 ± 0,055 | <0,001 |
| Creatinina                 | 1,270 ± 0,393              | 0,156 ± 0,040 | <0,001 |
| Creatinina fosfat          | 0,200 ± 0,091              | 0,095 ± 0,030 | 0,023  |
| Hipurat                    | 0,136 ± 0,084              | 0,033 ± 0,036 | <0,001 |
| Trigonelina                | 0,133 ± 0,051              | 0,005 ± 0,024 | <0,001 |
| <b>Metabolisme lipídic</b> |                            |               |        |
| Triglicèrids               | 2,434 ± 1,195              | 1,609 ± 0,684 | 0,003  |
| VLDLC3-5                   | 0,124 ± 0,054              | 0,094 ± 0,034 | 0,048  |
| HDLC3-9                    | 0,135 ± 0,033              | 0,160 ± 0,026 | 0,005  |
| Oleic                      | 0,368 ± 0,026              | 0,310 ± 0,066 | <0,001 |
| ARA+EPA                    | 0,084 ± 0,009              | 0,064 ± 0,018 | <0,001 |
| DHA                        | 0,015 ± 0,002              | 0,013 ± 0,003 | 0,005  |
| PUFA                       | 0,234 ± 0,033              | 0,207 ± 0,035 | 0,008  |

VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, DHA: àcid docosahexaenoic, PUFA: àcids grassos poliinsaturats

Figura 35: Representació gràfica dels metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup d'etiologia intersticial/quística amb el grup control



MRCs malalts renals crònics,. VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», IDLC: de l'anglès «*intermediate density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, DHA: àcid docosahexaenoic, PUFA: àcids grassos poliinsaturats



## Resultats

### 4.3 Anàlisi del perfil metabolòmic en funció de les alteracions concomitants de la MRC

Per tal de veure si existeix influència en les alteracions concomitants de la MRC es va fer un estudi de les que eren més freqüents en els MRCs dialitzats estudiats i es va analitzar si existien diferències en els paràmetres de metabòlica. Les alteracions valorades van ser:

- Hipertensió arterial (n=43)
- Dislipèmia (n=55)
- Malaltia cardiovascular (n=16)
- Consum de tabac (fumadors=18, exfumadors=20, no fumadors=28)
- Lesió de la substància blanca (LSB) (n=36)

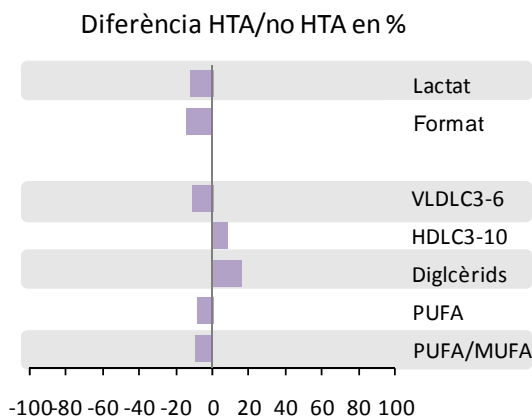
Aquestes alteracions poden coexistir en el mateix pacient; per tant, les comparacions analitzades s'han realitzat entre individus que tenen una alteració concomitant concreta respecte als que no la tenen. Només es mostren en les taules els metabòlits que diferencien significativament els grups.

#### Hipertensió arterial

Quan comparem el grup dels MRCs dialitzats amb HTA amb els que no en tenen observem que els hipertensos tenen augmentat els nivells de HDLC3-10 i diglicèrids i disminuït els nivells de lactat, format, VLDLC3-6, PUFA i PUFA/MUFA (Figura 36).

Figura 36: Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats amb HTA respecte dels que no tenien HTA

| Metabòlits | HTA           |    | NO HTA        |    | p     | Diferència HTA/no HTA % |
|------------|---------------|----|---------------|----|-------|-------------------------|
|            | Mitjana       | DE | Mitjana       | DE |       |                         |
| Lactat     | 3,797 ± 1,138 |    | 4,331 ± 0,830 |    | 0,032 | -12,32                  |
| Format     | 0,136 ± 0,059 |    | 0,160 ± 0,048 |    | 0,038 | -14,74                  |
| VLDC3-6    | 0,141 ± 0,048 |    | 0,159 ± 0,032 |    | 0,029 | -11,12                  |
| HDLC3-10   | 0,113 ± 0,018 |    | 0,105 ± 0,014 |    | 0,049 | 8,08                    |
| Diglcèrids | 0,919 ± 0,362 |    | 0,792 ± 0,284 |    | 0,035 | 16,01                   |
| PUFA       | 0,221 ± 0,036 |    | 0,242 ± 0,033 |    | 0,013 | -8,68                   |
| PUFA/MUFA  | 0,317 ± 0,059 |    | 0,350 ± 0,040 |    | 0,011 | -9,59                   |



MRCs: malalts renals crònics, HTA: hipertensió arterial, DE: desviació estàndard, VLDC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», PUFA: àcids grassos poliinsaturats, MUFA: àcids grassos monoinsaturats.

## Dislipèmia

## Resultats

Els MRCs dialitzats que, a més, presenten dislipèmia tenen uns valors més elevats de valina, glucosa, format, acetat i triglicèrids que el grup sense dislipèmia. També presenten valors més baixos de 3-hidroxitiracat, succinat, HDLC3-9 i 3-11 i ARA+EPA els pacients amb dislipèmia respecte dels pacients sense (figura 37).

## Malaltia cardiovascular

Només s'han trobat diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats amb MCV respecte els que no en tenen en el metabòlit LDLC3-8 (MCV  $0,177 \pm 0,030$ , no MCV  $0,158 \pm 0,030$ ,  $p=0,042$ ).

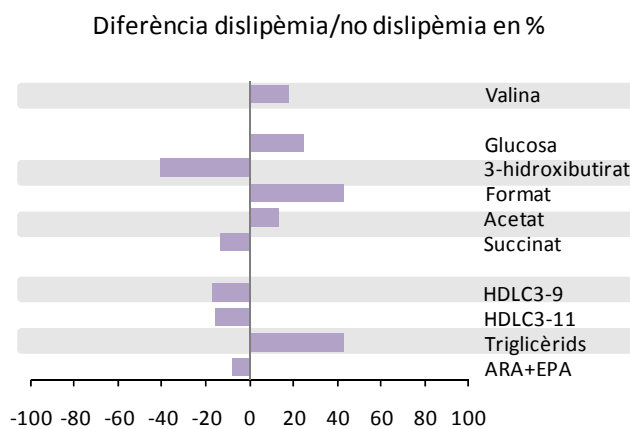
## Consum de tabac

El fet de consumir tabac o haver-ho fet dona perfils metabòlics diferents respecte dels MRCs dialitzats que no han consumit tabac. En comparar els fumadors amb els no fumadors s'observa que hi ha una disminució en isoleucina, leucina, valina, diglicèrids, monoglicèrids i fosfatidilinositol. I quan comparem els exfumadors amb els fumadors observem que el canvi és que no tenen l'alteració en els aminoàcids, però segueixen presentant valors més baixos en diglicèrids, monoglicèrids i el fosfatidilinositol (figures 38-39).

## Resultats

Figura 37: Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats amb dislipèmia respecte dels que no en tenien

| Metabòlits       | Dislipèmia    |    | No dislipèmia |    | p     | Diferència dislipèmia/no dislipèmia % |
|------------------|---------------|----|---------------|----|-------|---------------------------------------|
|                  | Mitjana       | DE | Mitjana       | DE |       |                                       |
| Valina           | 0,346 ± 0,076 |    | 0,294 ± 0,067 |    | 0,037 | 17,87                                 |
| Glucosa          | 1,110 ± 0,465 |    | 0,886 ± 0,213 |    | 0,035 | 25,34                                 |
| 3-hidroxibutirat | 0,111 ± 0,076 |    | 0,189 ± 0,152 |    | 0,043 | -41,12                                |
| Format           | 0,152 ± 0,053 |    | 0,106 ± 0,058 |    | 0,010 | 42,97                                 |
| Acetat           | 1,544 ± 0,348 |    | 1,362 ± 0,224 |    | 0,027 | 13,37                                 |
| Succinat         | 0,106 ± 0,022 |    | 0,122 ± 0,029 |    | 0,022 | -13,06                                |
| HDLC3-9          | 0,127 ± 0,031 |    | 0,155 ± 0,043 |    | 0,040 | -17,68                                |
| HDLC3-11         | 0,104 ± 0,027 |    | 0,124 ± 0,028 |    | 0,017 | -15,87                                |
| Triglicèrids     | 2,766 ± 1,267 |    | 1,931 ± 1,132 |    | 0,012 | 43,26                                 |
| ARA+EPA          | 0,082 ± 0,012 |    | 0,089 ± 0,010 |    | 0,012 | -7,67                                 |

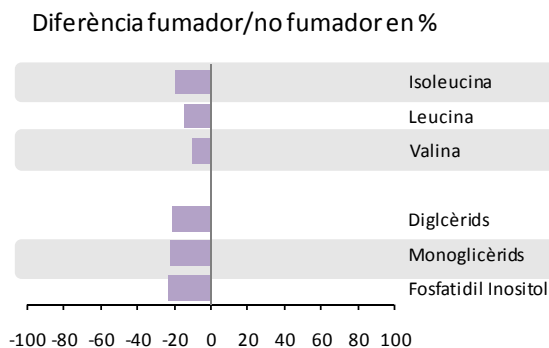


MRCs: malalts renals crònics, DE: desviació estàndard, HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaènic.

## Resultats

Figura 38: Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats fumadors respecte dels no fumadors

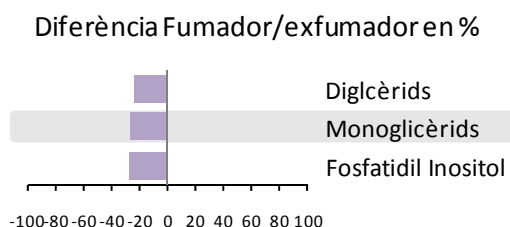
| Metabòlits          | Fumador       |  | No fumador    |       | Diferència fumador/no fumador % |
|---------------------|---------------|--|---------------|-------|---------------------------------|
|                     | Mitjana ± DE  |  | Mitjana ± DE  | p     |                                 |
| Isoleucina          | 0,128 ± 0,024 |  | 0,103 ± 0,023 | 0,002 | -19,66                          |
| Leucina             | 0,285 ± 0,060 |  | 0,245 ± 0,038 | 0,024 | -13,94                          |
| Valina              | 0,360 ± 0,059 |  | 0,323 ± 0,062 | 0,024 | -10,27                          |
| Diglicèrids         | 0,958 ± 0,246 |  | 0,752 ± 0,248 | 0,001 | -21,49                          |
| Monoglicèrids       | 0,559 ± 0,132 |  | 0,436 ± 0,132 | 0,001 | -21,97                          |
| Fosfatidil Inositol | 2,105 ± 0,572 |  | 1,621 ± 0,588 | 0,001 | -22,97                          |



MRCs malalts renals crònics, DE: desviació estàndard.

Figura 39: Metabòlits que van presentar diferències estadísticament significatives en comparar el grup dels MRCs dialitzats fumadors respecte dels no fumadors

| Metabòlits          | Fumador      |         | Exfumador    |         | Diferència fumador/<br>exfumador % |        |
|---------------------|--------------|---------|--------------|---------|------------------------------------|--------|
|                     | Mitjana ± DE | DE      | Mitjana ± DE | DE      |                                    |        |
| Diglicèrids         | 0,752        | ± 0,248 | 0,984        | ± 0,476 | 0,011                              | -23,56 |
| Monoglicèrids       | 0,436        | ± 0,132 | 0,594        | ± 0,324 | 0,007                              | -26,67 |
| Fosfatidil Inositol | 1,621        | ± 0,588 | 2,257        | ± 1,350 | 0,005                              | -28,17 |



MRCs malalts renals crònics, DE: desviació estàndard.

## Lesió de la substància blanca

No hi ha diferències estadísticament significatives en els metabòlits entre el grup dels MRCs dialitzats amb LSB i sense LSB.

## Resultats

# 5. Correlació entre els paràmetres d'EO i els de metabòlica

Per tal de conèixer si existeix una relació entre els paràmetres d'EO i de metabòlica estudiats s'ha realitzat un test de correlacions de Pearson en els resultats dels MRCs dialitzats i el grup control. A les següents taules es mostren els paràmetres que han tingut una correlació estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ).

A la taula 19 es mostren els coeficients de Pearson que han tingut una correlació estadísticament significativa entre els aminoàcids detectats en la metabòlica i els paràmetres d'EO que han tingut diferències estadísticament significatives entre els MRCs dialitzats i el grup control. Es pot observar que quan augmenten els valors de fenilalanina, glicina i metilhisitidina augmenta l'EO, amb un augment del DPP i de GSSG i una disminució dels enzims antioxidants GPxe i CATE. I que amb valors més baixos de leucina, tirosina i valina augmenta l'EO, augment de DPP i GSSGe i disminució dels enzims antioxidants GPxe i CATE.

Per als paràmetres de metabòlica agrupats com a altres metabòlits, s'observa que quan augmenten els valors de lactat, acetat, piruvat, succinat, creatinina colina, trigonelina, hipurat, 3-glicerofosfocolina, creatinina fosfat i malonat augmenta l'EO, amb un augment del DPP i

de GSSG i una disminució dels enzims antioxidants SODe, GPxe i CATE (taula 20).

**Taula 19: Coeficients de Pearson per a les correlacions entre els paràmetres d'EO i els aminoàcids detectats per metabolòmica**

| Aminoàcid  | Coeficient de Pearson |        |                     |        |
|--|-----------------------|--------|---------------------|--------|
|  | Indicativus d'EO      |        | Enzims antioxidants |        |
|  | DPp                   | GSSGe  | Gpxe                | CATE   |
| <b>Augmenten en els MRCs dialitzats respecte els controls</b>    |                       |        |                     |        |
| Fenilalanina   | 0,321                 | 0,419  | -0,488              | -0,326 |
| Glicina  | 0,179                 | 0,249  | -0,350              | --     |
| Metilhistidina   | 0,230                 | 0,177  | -0,341              | -0,175 |
| <b>Disminueixen en els MRCs dialitzats respecte els controls</b> |                       |        |                     |        |
| Leucina  | --                    | -0,269 | --                  | 0,183  |
| Tirosina   | --                    | -0,269 | --                  | 0,190  |
| Valina   | -0,216                | -0,367 | 0,227               | 0,228  |

EO: estrès oxidatiu, MRCs: malalts renals crònics, DPp: dany a proteïnes plasmàtiques, GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari, GPxe: glutatió peroxidasa eritrocitària, CATE: catalasa eritrocitària

Quan a la relació entre els paràmetres d'EO i els metabòlits del perfil lipídic es pot observar que quan augmenten els valors de VLDLC, triglicèrids, diglicèrids, monoglicèrids, àcid oleic, ARA+EPA, DHA, PUFA i MUFA, augmenta l'EO, amb un augment del DPp i de GSSG i una disminució de GSHe i dels enzims antioxidants SODe, GPxe i CATE. I que amb valors més baixos de colesterol total i esterificat, HDLC, plasmalogen i àcid linolenic augmenta l'EO, augment de DPp i GSSGe i



## Resultats

disminució de GSHe i dels enzims antioxidants SODe, GPxe i CATe (taula 21)

**Taula 20: Coeficients de Pearson per a les correlacions entre els paràmetres d'EO i els altres metabòlits detectats per metabolòmica**

| Altres metabòlits                                      | Coeficient de Pearson |       |                     |        |        |
|--|-----------------------|-------|---------------------|--------|--------|
|  | Indicadors d'EO       |       | Enzims antioxidants |        |        |
|  | DPP                   | GSSGe | SODe                | GpXe   | CATe   |
| Augmenten en els MRCs dialitzats respecte els controls |                       |       |                     |        |        |
| Lactat   | 0,219                 | --    | --                  | -0,217 | -0,167 |
| Acetat   | -0,206                | 0,248 | --                  | -0,233 | -0,294 |
| Piruvat  | 0,189                 | 0,176 | --                  | -0,285 | --     |
| Succinat   | 0,212                 | 0,296 | --                  | -0,412 | --     |
| Creatinina   | 0,488                 | 0,564 | -0,221              | -0,571 | -0,408 |
| Coline   | 0,303                 | 0,602 | --                  | -0,514 | -0,382 |
| Trigonelina  | 0,176                 | 0,187 | --                  | -0,280 | -0,196 |
| Hipurat  | 0,368                 | 0,335 | --                  | -0,369 | -0,347 |
| 3-glicerofosfolina                                     | 0,283                 | --    | --                  | --     | --     |
| Creatinina fosfat                                      | 0,236                 | 0,246 | -0,248              | -0,358 | -0,163 |
| Malonat  | --                    | 0,396 | --                  | -0,422 | -0,304 |

EO: estrès oxidatiu, MRCs: malalts renals crònics, DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari, GPxe: glutatió peroxidasa eritrocitària, CATe: catalasa eritrocitària

Taula 21: Coeficients de Pearson per a les correlacions entre els paràmetres d'EO i els metabòlits del perfil lipídic detectats per metabolòmica

| Metabòlits del perfil lipídic                             | Coeficient de Pearson dels paràmetres d'estrès oxidatiu |        |            |                     |        |        |
|---|---|--------|------------|---------------------|--------|--------|
|   | Indicativs d'EO   |        | Protectors | Enzims antioxidants |        |        |
|   | DPP   | GSSGe  | GSHe       | SODE                | Gpxe   | CATe   |
| Augmenten en els MRCs dialitzats respecte els controls    |   |        |            |                     |        |        |
| VDLDC3-5  | 0,173   | --     | --         | --                  | -0,270 | --     |
| VDLDC3-6  | --  | 0,204  | -0,182     | --                  | -0,192 | -0,164 |
| Triglicerids  | --  | 0,357  | -0,274     | --                  | -0,339 | -0,267 |
| Diglicerids   | --  | 0,171  | --         | --                  | -0,180 | --     |
| Monoglicerids   | --  | --     | --         | --                  | -0,191 | --     |
| Oleic   | 0,210   | 0,508  | -0,465     | --                  | --     | -0,371 |
| ARA+EPA   | 0,209   | 0,432  | -0,432     | -0,200              | --     | -0,385 |
| DHA   | 0,263   | 0,356  | -0,374     | -0,209              | -0,161 | -0,221 |
| PUFA  | --  | --     | -0,162     | -0,185              | -0,219 | -0,168 |
| MUFA  | --  | 0,347  | -0,290     | --                  | --     | -0,300 |
| Disminueixen en els MRCs dialitzats respecte els controls |   |        |            |                     |        |        |
| Colesterol total  | -0,187  | -0,191 | 0,341      | --                  | --     | 0,188  |
| Colesterol esterificat                                    | -0,185  | -0,174 | 0,344      | --                  | --     | 0,173  |
| HDLC3-9   | --  | -,285  | 0,241      | --                  | 0,335  | 0,316  |
| HDLC3-10  | --  | --     | --         | --                  | 0,285  | --     |
| HDLC3-11  | --  | -0,223 | 0,211      | --                  | 0,221  | 0,250  |
| Plasmalogen   | --  | -0,214 | 0,294      | --                  | --     | 0,211  |
| Linolenic   | -0,165  | -0,270 | 0,282      | --                  | 0,218  | --     |

EO: estrès oxidatiu, MRCs: malalts renals crònics, DPP: dany a proteïnes plasmàtiques, GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari, GSHe: glutatió reduït eritrocitari, SODE: superòxid dismutasa eritrocitària, GPxe: glutatió peroxidasa eritrocitària, CATe: catalasa eritrocitària VLDLC: de l'anglès «*very low density lipoprotein cholesterol*», ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, DHA: àcid docosahexaenoic, PUFA: àcids grassos poliinsaturats, MUFA: àcids grassos monoinsaturats, HDLC: de l'anglès «*high density lipoprotein cholesterol*»,





## *Discussió*

# 1. Discussió dels resultats d'EO

## 1.1 Discussió de les diferències generals

El nostre organisme disposa de mecanismes de defensa per poder fer front a situacions d'EO puntuals. Quan l'exposició és molt més perllongada en el temps pot donar-se un esgotament d'aquests mecanismes de defensa i causar danys a les estructures orgàniques que poden portar a l'aparició de diferents patologies. També s'ha de tenir en compte que, en un estat de malaltia, hi ha un excés de producció de substàncies oxidants que, a la vegada, donaran més EO i, per tant, més complicacions.

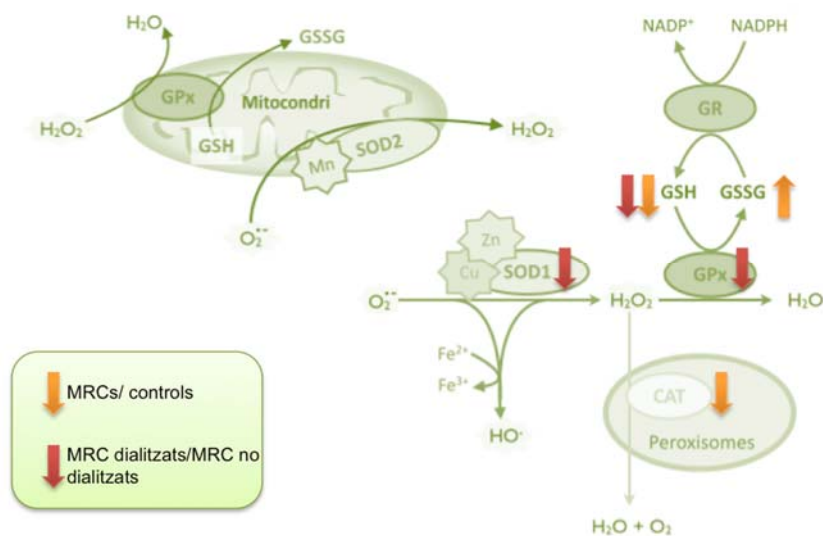
Es coneix que els MRCs tenen un pitjor EO que les persones sanes (Martinez-Vea et al., 2012; Romeu et al., 2010) però el primer objectiu d'aquest treball va ser l'avaluació de la progressió d'aquest EO al llarg de l'evolució de la malaltia comparant els resultats dels paràmetres analitzats entre els MRCs no dialitzats i els dialitzats. A més, es va valorar si l'etiologia de la malaltia influïa en l'EO d'aquests malalts, així com la presència o no d'alteracions concomitants de la MRC.

Els nostres resultats mostren que els MRCs no dialitzats tenen nivells més baixos de CAT i més elevats de GPx eritrocitaria que els controls sans. A mida que avança la malaltia s'observa que els valors de la SOD i la GPx disminueixen (diferències estadísticament significatives entre els MRCs no dialitzats i els dialitzats), i que la CAT es manté igual de baixa

## Discussió

(no hi ha diferències estadísticament significatives entre els MRCs no dialitzats i els dialitzats). Aquests resultats ens indiquen que a mida que avança la MRC disminueixen les activitats dels enzims antioxidants, i que, per tant, tenen una pitjor defensa antioxidant, fet que deixa exposats aquests malalts als efectes dels radicals lliures (figura 40).

Figura 40: Representació esquemàtica de les alteracions en els sistemes antioxidants que s'observen en comparar els MRCs amb els controls sans i els MRCs dialitzats amb els no dialitzats



CAT: catalasa, SOD: superòxid-dismutasa, GPx: glutatió peroxidasa, GR: glutatió-reductasa, GSH: glutatió reduït, GSSG: glutatió oxidat, MRCs: malats renals crònics.

Està estudiat que en els MRCs es dona un excés de producció d'ERO, incloent ONOO-, OH- i OCl- generats a partir d'oxigen a través de diversos enzims (NADPH oxidasa, SOD i mieloperoxidasa). Diversos factors també poden augmentar la generació de ROS, incloent citocines (IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) alliberades de monòcits activats i toxines urèmiques. L'excés de ROS resultant pot conduir a modificacions en els lípids, les proteïnes i l'ADN (Sung, Hsu, Chen, Lin, & Wu, 2013). Per tant, els pacients que pateixen MRC estan exposats a un major EO que està relacionat amb la urèmia i el procediment de diàlisi mateix. D'acord amb l'etapa de la malaltia renal poden presentar alteracions diferents en els mecanismes antioxidants. L'EO provoca la desgranulació de neutròfils i la producció de mediadors inflamatoris. El nombre de neutròfils cau sobtadament durant els primers 30 min d'HD i contribueix a una enorme formació d'ERO. Altres raons per l'augment d'EO són la manca de certes vitamines i microelements (C, E, seleni), l'edat avançada dels pacients, l'alta prevalença de la diabetis, l'estat inflamatori crònic, l'excessiva administració de ferro parenteral, l'anèmia, etc. (Stępniewska et al., 2014).

La SOD es considera enzim antioxidant de primera línia, elimina l'anió superòxid que és altament reactiu i pot causar dany tissular a causa de la proliferació i l'apoptosi de les cèl·lules endotelials. En la present investigació es va trobar que l'activitat de la SOD va ser més baixa en els MRCs dialitzats en comparació amb els MRCs no dialitzats i els controls; per tant, els MRCs dialitzats tenen menys protecció antioxidant. Resultats similars van ser descrits per altres autors (Hernández de Rojas & Mateo, 1996; Ogunro, Olujombo, Ajala, & Oshodi, 2014).



## Discussió

La CAT i la GPx són enzims antioxidants de segona línia, que prevenen l'acumulació d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el nostre estudi es va obtenir una activitat de CAT més baixa en pacients amb MRC respecte del grup control sense que hi hagi diferències entre MRCs dialitzats i no dialitzats. Per tant, es veu un clar esgotament d'un dels enzims de defensa antioxidant de segona línia, la CAT, en els MRCs dialitzats. Els mateixos resultats van ser obtinguts per Tbahriti *et al.*, 2013 (Tbahriti, Kaddous, Bouchenak, & Mekki, 2013). En la seva investigació, l'activitat CAT, la SOD i la GPx va ser significativament més baixa en els pacients dialitzats i en fase 4 de la MRC en comparació amb els controls sans. Alguns autors descriuen una activitat augmentada de CAT en pacients en tractament amb hemodiàlisi en comparació amb els controls sans (Hernández de Rojas & Mateo, 1996; Knap, Prezelj, Buturović-Ponikvar, Ponikvar, & Bren, 2009).

El sistema glutatió també es troba alterat; en analitzar les diferències entre els MRCs no dialitzats i els dialitzats, per veure la progressió de la malaltia, s'observa que els MRCs dialitzats tenen nivells més baixos de glutatió oxidat eritrocitari que els MRCs no dialitzats a diferència del que caldria esperar. Com a conseqüència d'aquests valors, la ràtio GSSG/GSH eritrocitària és molt més gran en els MRCs no dialitzats que en els dialitzats. Per tant, el fet d'estar dialitzats faria baixar els nivells de GSSG i la seva relació amb el GSH sense arribar a nivells del grup control. Aquests resultats denoten l'esgotament del sistema antioxidant com passava amb els enzims antioxidants estudiats.

El GSH és el compost intracel·lular no proteic amb grups SH de més rellevància i és acceptat com l'antioxidant hidrofílic intracel·lular més important (Melov, 2002; Ogunro et al., 2014; Romeu et al., 2010). A més, diversos estudis suggereixen que els tiols també componen un dels principals mecanismes de defensa antioxidants extracel·lulars (Barry Halliwell & Gutteridge, 1990; Soriani, Pietraforte, & Minetti, 1994). Per aquest motiu, el deteriorament del balanç entre el GSH i el GSSG, que es produeix en els pacients renals, és una peça clau per entendre l'estrès oxidatiu associat a la malaltia. Els nivells de glutatió plasmàtic ens donen una idea de l'estat oxidatiu de l'organisme, ja que quan les cèl·lules estan molt carregades de GSSG l'alliberen al torrent sanguini per destoxicar-se. Tot i això, els nostres resultats mostren uns nivells de GSSG eritrocitari elevats que no es reflecteixen amb un augment de GSSG plasmàtic. Si observem els nivells de GSH plasmàtic no trobem diferències entre el grups MRCs no dialitzats, MRCs dialitzats i els controls, així com tampoc en els nivells de GSSG, i, per tant, la seva relació també surt igual en els tres grups. En altres estudis, els nivells plasmàtics de glutatió totals i GPx es van observar reduïts significativament en els pacients amb MRC en comparació amb els controls (Ceballos-Picot et al., 1996). En el nostre estudi els nivells plasmàtics no estan alterats i, en general, a la literatura es descriuen resultats contradictoris en aquest sentit (Andersson, Lindgren, Arnadottir, Prytz, & Hultberg, 1999; Ross, Koo, & Moberly, 1997). El fet que el glutatió és principalment intracel·lular fa que sigui una limitació en la mesura del glutatió plasmàtic; per tant, fins i tot una lleugera hemòlisi pot portar a falses elevacions en els valors registrats. Per tant, en la malaltia renal, la determinació del GSH i GSSG en el plasma no

## *Discussió*

s'hauria d'utilitzar en cap cas com a únic biomarcador del nivell d'estrès oxidatiu.

El NADPH, que és essencial per a la desintoxicació de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la reacció catalitzada per la GPx, està implicat en la generació del GSSG. La via hexosa monofosfat és la principal font de NADPH als eritròcits i s'ha reportat que hi ha una anormalitat en aquesta via en pacients en hemodiàlisi (Ogunro et al., 2014). A més, diversos productes tòxics presents a la sang de pacients urèmics poden inhibir l'activitat de la GPx (Ogunro et al., 2014). En el nostre estudi observem que a nivell eritrocitari els malalts renals en general tenen valors més baixos de GSH i més elevats de GSSG. La GPx eritrocitèria té una activitat més alta en els malalts no dialitzats que els controls sans i més baixa en els malalts dialitzats. Aquest fet explica per què s'observen uns valors de GSSG més alts en els MRCs no dialitzats que en els dialitzats, ja que tenen una activitat més alta en la GPx eritrocitèria. I, en part, també pot ser per esgotament de GSH que ha de detoxificar molt.

Si analitzem els resultats dels enzims antioxidants amb els del sistema glutatió i la gravetat de la MRC en conjunt veiem que existeix una clara relació. La GPx està involucrada en el metabolisme del GSH. La seva funció és protegir la cèl·lula de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  i peròxids lipídics evitant danys de proteïnes i material genètic. El GSH és necessari per a l'acció de la GPx. Una concentració de GSH reduïda condueix a una activitat de la GPx disminuïda, tal com s'observa en els nostres resultats. Altres autors descriuen comportaments similars on es veu com el fet d'estar en tractament amb diàlisi influeix negativament en l'activitat de la GPx

(Santangelo, Witko-Sarsat, Drüeke, & Descamps-Latscha, 2004; Stępniewska et al., 2014).

L'esgotament d'antioxidants en l'àmbit cel·lular sembla ser important en la malaltia renal; no obstant això, en l'àmbit sistèmic, o plasmàtic, no hem pogut veure canvis en aquest sentit. Per aquest motiu es va valorar la capacitat antioxidant total, mitjançant la prova ORAC i FRAP, als grups d'estudi. Es va veure que a mida que avança la malaltia augmenta la capacitat antioxidant valorada amb l'ORAC i l'ORAC NP i disminueix la capacitat antioxidant valorada com a FRAP. En aquest sentit, Chen *et al.*, 2008, van trobar que, després de l'hemodiàlisi, la capacitat antioxidant del plasma per eliminar el peròxid d'hidrogen, l'oxigen atòmic i l'hipoclorit disminueix, acompanyada d'una reducció del 56% en els valors del FRAP. Aquesta disminució de la capacitat antioxidant podria ser deguda a la pèrdua de soluts dialitzables, com soluts urèmics i antioxidants de petit pes molecular en el plasma durant el procés d'HD (Chen, Liou, & Chang, 2008), fet que també explicaria la disminució en els resultats del FRAP en els MRCs dialitzats respecte del grup de MRCs no dialitzats que hem observat en els nostres subjectes d'estudi, però que és contrari al que succeeix amb els valors de l'ORAC.

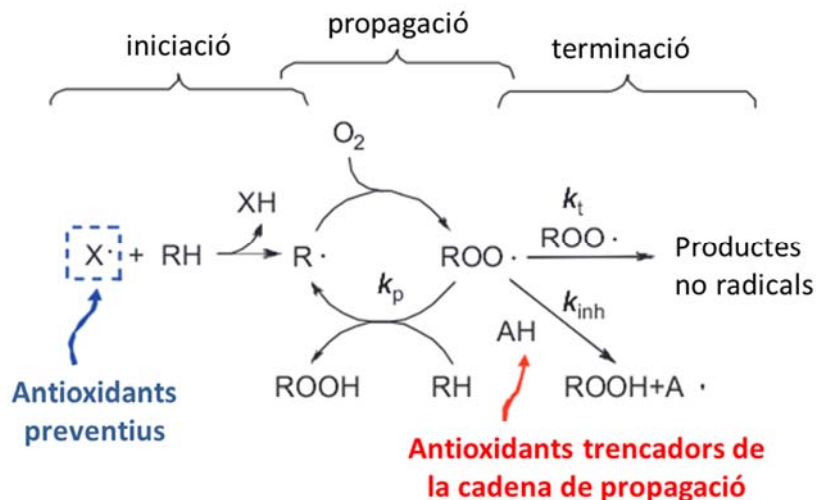
Per entendre els resultats de la capacitat antioxidant total obtinguts s'ha de tenir en compte que els antioxidants en general es classifiquen en funció de la fase de la cadena de reacció d'autooxidació en la qual actuen. N'hi ha que comencen a la fase d'iniciació, antioxidants preventius (ex. catalasa) i d'altres que el que fan és bloquejar la cadena

## *Discussió*

de propagació (ex. polifenols, glutatió) (Amorati & Valgimigli, 2014) (figura 41).

L'assaig ORAC mesura el nivell de protecció de l'organisme enfront de radicals peroxils (els principals propagadors de reaccions d'autooxidació de les biomolècules). Té diversos avantatges, incloent la fiabilitat, l'alta sensibilitat i la capacitat de mesurar l'activitat antioxidant dels antioxidants de trencament de cadena oxidant (Amorati & Valgimigli, 2015). A més, l'assaig ORAC pot mesurar amb precisió tant el temps d'inhibició i el grau d'inhibició d'antioxidants per proporcionar una mesura precisa de l'activitat antioxidant. La principal limitació de l'assaig ORAC és l'ús de l'àrea sota la corba (AUC) per mesurar l'efecte protector dels antioxidants i la baixa reactivitat de la fluoresceïna enfront dels radicals peroxils. L'ORAC s'utilitza freqüentment per quantificar la capacitat d'eliminació radical peroxil (Garrett, Murray, Robison, & O'Neill, 2010) en mostres biològiques i antioxidants alimentaris.

Figura 41: Esquema simplificat de la cadena de reacció d'autooxidació



L'autooxidació s'inicia per algunes espècies radicals ( $X\cdot$ ), capaces de reaccionar amb el substrat ( $RH$ ), per donar un radical alquil ( $R\cdot$ ), que reaccionarà a una velocitat controlada per difusió amb l'oxigen per formar un radical peroxil ( $ROO\cdot$ ). Els radicals peroxil  $ROO\cdot$  ataquen una altra molècula del substrat per produir un hidroperòxid ( $ROOH$  el substrat oxidat) i un altre radical; s'estableix, d'aquesta manera, la reacció en cadena. La cadena de reacció segueix de manera cíclica (propagació) fins que dos radicals reaccionen entre si (terminació).

En canvi, el FRAP ens dóna una idea de la capacitat preventiva antioxidant que té l'organisme ja que el que mesura és la capacitat reductora del fluid i, per tant, els processos d'iniciació de la cadena d'autooxidació (Amorati & Valgimigli, 2014).

Així doncs, en relació amb l'activitat d'antioxidants preventius, els MRCs no dialitzats tenen un FRAP més elevat i valors mantinguts de

## *Discussió*

CAT, quan ho comparem amb els MRCs dialitzats. En canvi, en relació amb el trencament de la propagació de l'autooxidació de biomolècules, els MRCs dialitzats tenen un nivells superiors d'ORAC, capacitat antioxidant més elevada i valors mantinguts de GSH, si ho comparem amb els MRCs no dialitzats.

Aquests resultats ens fan pensar que en els malalts renals més lleus, no dialitzats, el sistema intenta reforçar l'oxidació a nivell d'iniciació i en malalts dialitzats aquest reforç cal fer-lo en la terminació de la cadena de reacció d'autooxidació.

A més, s'observa que els MRCs dialitzats presenten més dany oxidatiu a nivell de proteïnes i lípids que els MRCs no dialitzats. Dos estudis anteriors (Jonathan Himmelfarb, 2009; Romeu et al., 2010) obtenen resultats similars als obtinguts en aquest estudi. A més, aquests resultats encaixen amb els resultats dels marcadors anteriorment analitzats (disminució d'enzims antioxidants CAT, SOD i GPx, i l'augment de la ràtio GSSG/GSH), que clarament mostren que hi ha un augment de l'estrès oxidatiu en aquests malalts.

Els factors que influencien la progressió de l'estrès oxidatiu de manera paral·lela a la progressió de la malaltia són diversos. Com ja hem comentat, els MRCs dialitzats, pel fet d'estar sotmesos a diàlisi, tenen un estrès oxidatiu més elevat. Aquest efecte secundari de les membranes és causat bàsicament per l'activació dels neutròfils i per l'efecte físic de les membranes de diàlisi (Ogunro et al., 2014), tal com s'explica a l'apartat d'introducció (apartat 4.2.). D'altra banda, els pacients que requereixen tractament amb diàlisi presenten una fase de

la MRC més avançada que els MRCs no dialitzats, fet que també farà augmentar l'estrès oxidatiu d'aquests malalts (Tbahriti et al., 2013).

## 1.2 Discussió dels resultats de l'EO en funció de l'etiologia de la MRC

La MRC pot ser una manifestació d'altres malalties cròniques que causen dany renal, com la diabetis o la hipertensió arterial. O bé, la MRC pot ser una malaltia renal intrínseca, tal com la malaltia poliquística del ronyó. Per tant, en funció de l'etiologia el pla de tractament i d'actuació serà diferent per a cada pacient.

Fins ara, no hi ha cap estudi que compari l'estat oxidatiu dels MRCs amb diferents etiologies per esbrinar si existeixen diferències entre elles, vascular, glomerular, diabètica i intersticial/quística.

Tot i que no hem trobat diferències estadísticament significatives en els paràmetres d'EO entre les diferents etiologies, quan les comparem amb el grup control hi ha petites diferències que cal remarcar.

Tots els grups d'etiologies tenen els mateixos resultats d'EO observats en les diferències generals entre MRCs dialitzats i el grup control, excepte per als paràmetres SOD, ORAC i ORAC NP. Per a la SOD les etiologies glomerular i intersticial/quística tenen valors significativament més baixos que el grup control, igual que observàvem en l'apartat de diferències generals entre els MRCs dialitzats i el grup control. Per a l'etiologia vascular, tot i que té valors molt similars que les etiologies glomerular i intersticial/quística no observem diferències



## *Discussió*

estadísticament significatives. Això és degut al baix número d'individus del grup. En canvi per a l'etiologia diabètica, veiem valors més elevats de la SOD, fet que fa que no hi hagin diferències estadísticament significatives respecte del grup control, és a dir que els resultats de la SOD en el grup d'etiologia diabètica són semblants al del grup control. Tot i això no hem trobat diferències estadísticament significatives entre els resultats de la SOD del grup d'etiologia diabètica respecte de les altres etiologies, fet que fa pensar que s'hauria d'augmentar la n d'aquest grup per veure si aquesta diferència és clínicament rellevant o no.

De la mateixa manera, els resultats de l'ORAC de l'etiologia diabètica són significativament més elevats que el grup control, a diferència de les altres etiologies que tenen valors similars al grup control. Quan a l'ORAC NP tot i que els 4 grups d'etiologies tenen valors similars i més augmentats que el grup control, només s'observen diferències estadísticament significatives en les etiologies glomerular i intersticial/quística, com hem dit, probablement degut al baix número d'individus de les etiologies vascular i diabètica.

Així, els nostres resultats mostren una tendència pitjor en l'estat oxidatiu per a l'etiologia glomerular que per a la resta d'etiologies. S'ha de tenir en compte que a causa de la mateixa MRC el ronyó està exposat a nivells relativament baixos d'O<sub>2</sub> i, per tant, es dona un estat d'hipòxia renal que indueix alts nivells de ROS i que pot produir danys a les estructures renals, entre elles als podòcits. En estudis recents, l'EO mitocondrial endotelial ha demostrat que indueix la depleció de podòcits i que dona lloc a una glomeruloesclerosi (Daehn et al., 2014).

A més, s'ha vist que aquest EO genera una disminució de l'activitat de la GPx, un augment de l'aterosclerosi i malalties cardiovasculars a causa de l'augment en la peroxidació lipídica (Santangelo et al., 2004), un altre factor que fa que el dany lipídic sigui més alt en els MRCs, tal com hem observat amb els nostres estudis.

La diabetis és una de les causes més freqüents de la MRC. La nefropatia diabètica comença amb una microalbuminúria seguida d'un augment en la proteïnúria que fa que es deteriori encara més la membrana de filtració glomerular. Seguidament es produeix una hipertensió que fa que disminueixi la TFG. Existeix una correlació positiva entre la malaltia microvascular i la nefropatia diabètica, causant d'altres problemes com la retinopatia (Murphree Duaine & Thelen Sarah, 2010). El comportament en la SOD és diferent en l'etiologia diabètica, en què veiem uns valors més elevats que la resta de les etiologies, així com també valors més elevats en l'ORAC. Sembla que en la nefropatia diabètica el perfil d'EO és diferent, hi ha afectació del sistema glutatió però no de la SOD. Un altre paràmetre afectat és el FRAP que és més baix en els MRCs dialitzats diabètics que en els MRCs no dialitzats (tot i que no és estadísticament significatiu); resultats que també han observat altres autors (Gupta et al., 2013) en els MRCs amb nefropatia diabètica. En altres estudis s'ha vist que els MRCs amb diabetis, ja sigui la causa o no, tenen valors més elevats de peroxidació lipídica, carbonilació proteica i nivells més baixos d'enzims antioxidants i GSH/GSSG, tal com observem en el nostre estudi (Rashid, Sinha, & Sil, 2013). La diabetis és una malaltia que afecta molts òrgans i sistemes i,

## *Discussió*

per això, és freqüent trobar-la associada a altres malalties, i la MRC n'és una.

Altres autors han observat que els pacients amb MRC no dialitzats i amb diabetis presenten un perfil d'oxidació diferent que els que no tenen diabetis; per exemple, un augment dels nivells de dany al DNA superior (Rangel-López et al., 2013), o nivells significativament més elevats de FRAP i àcid úric (Ansarihadipour & Dorostkar, 2014). En el nostre cas, podem veure una certa tendència a un perfil diferenciat en diabètics, amb nivells globals d'EO superiors als no diabètics. El fet que no sigui estadísticament significatiu podria estar en el número de pacients que hi ha en el grup diabètic (n=9), bastant inferior al de no diabètics (n=37). S'hauria d'avaluar un número més elevat de MRCs dialitzats diabètics per veure si aquests resultats donen diferències estadísticament significatives i si, en conseqüència, cal abordar el tractament del pacient amb MRC i diabetis de manera diferenciada als pacients sense aquesta malaltia concomitant.

A la nefropatia diabètica les lesions més importants es donen en l'àmbit del glomèrul. Està caracteritzada per canvis morfològics i estructurals al ronyó com són l'expansió de la matriu molecular i la pèrdua de la barrera de càrrega a la membrana basal glomerular. La hiperglucèmia ha estat considerada com un factor iniciador del dany renal associat amb la ND. Aquest excés de glucosa en sang fa que augmenti l'EO, amb un augment en l'oxidació de la glucosa i un augment en la generació mitocondrial d'espècies reactives de l'oxigen que originen dany al DNA, fet que contribueix a accelerar l'apoptosi cel·lular. També s'han observat nivells elevats de productes finals de

## *Discussió*

glicació avançada (AGE), els quals tenen un paper important en el desenvolupament i la progressió del dany vascular diabètic. S'ha vist que l'acumulació dels AGE al ronyó pot contribuir a l'alteració progressiva de l'arquitectura renal i la pèrdua de la funció renal en unir-se els AGE a proteïnes de la matriu que causen variacions en la senyalització cel·lular.

La producció d'insulina de les cèl·lules beta del pàncrees és especialment sensible als radicals lliures, per la seva baixa expressió d'enzims antioxidant SOD, GPx i CAT. Per tant, una baixa activitat de la SOD, GPx i CAT s'associa amb un dany de les cèl·lules  $\beta$ , la qual cosa indica que aquests enzims juguen un paper important, encara que, indirectament, en la regulació de la glucosa. Les baixes concentracions locals de SOD, GPx i CAT deixen cèl·lules  $\beta$  propenses als atacs dels radicals lliures, la qual cosa dóna lloc a una disminució permanent de la producció d'insulina, que condueix a la hiperglucèmia. La hiperglucèmia, al seu torn, condueix a més dany pancreàtic i sistèmic a través d'una major producció de ROS mitocondrials, la glicació de les proteïnes, l'autooxidació de la glucosa i l'activació de vies de senyalització sensibles a l'estrès, com ara la via de senyalització NFkB (Tucker, Scanlan, & Dalbo, 2015).

Cal dir que tant els pacients diabètics com els no diabètics també poden presentar altres alteracions concomitants alhora, aquest fet dificultaria poder observar diferències entre ells.

## *Discussió*

### 1.3 Discussió dels resultats de l'EO en funció de les alteracions concomitants de la MRC.

Els MRCs són propensos a patir alteracions concomitants de la malaltia renal a causa de la pròpia malaltia, l'estrès oxidatiu i la inflamació. Les citocines inflamatòries activen factors de transcripció i poden provocar alteracions de gens associats amb la síndrome nefròtica d'inici primerenca, proteïnúria, esclerosi mesangial i glomeruloesclerosi.

Un dels objectius del nostre treball va ser estudiar si les diferents alteracions concomitants de la MRC influïen en l'estat oxidatiu dels malalts i no hem trobat diferències estadísticament significatives entre la presència i no de l'alteració, però sí que hem trobat petites diferències respecte del grup control que cal remarcar.

El fet de patir HTA és causa o conseqüència de molts factors i un d'ells podria ser l'EO. Nosaltres no hem trobat diferències estadísticament significatives entre els MRC dialitzats amb HTA i sense. Això pot ser degut a que aquests MRC dialitzats ja tenen de per si un estat oxidatiu molt afectat que fa que no trobem diferències degudes a aquesta HTA.

Un estudi recent suggereix que l'estrès oxidatiu pot estar involucrat en la patogènesi de l'HTA o que la mateixa HTA o factors associats a aquesta, com la sobrecàrrega de líquids, pot tenir un efecte addicional sobre l'EO en pacients amb MRC (Xu et al., 2015). No obstant això, a la majoria de pacients amb MRC se'ls controla la pressió arterial, en un centre sanitari, ja que l'HTA pot afectar el filtrat glomerular, sobretot

en els MRCs d'origen vascular, i també perquè el mal funcionament renal fa augmentar *per se* l'HTA, o pot ser una complicació de la malaltia pel mateix paper dels ronyons en el manteniment de la PA, que no poden regular. Per tant, al grup d'HTA podem tenir una barreja dels dos tipus (causa-complicació) i com que es controla en els pacients, els que no tenen HTA no necessàriament han d'estar millor quant a EO ja que segurament tenen altres focus d'EO a part d'aquests. A més, normalment presenten HTA els MRCs amb etiologia vascular, que és la que menys EO hem vist que tenia abans.

Els MRCs dialitzats amb dislipèmia i sense tenen els mateixos resultats en els paràmetres d'EO estudiats en el present treball. Quan els analitzem respecte del grup control, hi ha diferències en el paràmetre de la CAT i l'ORAC NP. Els MRCs dialitzats amb dislipèmia tenen valors significativament més baixos que el grup control a diferència dels MRCs dialitzats sense dislipèmia que presenten valors similars al grup control. Per a l'ORAC NP, tot i que tenen valors molt similars el grup amb dislipèmia i el sense dislipèmia, només hi ha diferències estadísticament significatives entre el grup amb dislipèmia (amb valors més alts) i el grup control i no amb el grup sense dislipèmia. Aquests resultats reforcen la idea que els MRCs dialitzats amb dislipèmia tenen un EO més elevat que els MRCs dialitzats sense dislipèmia.

En molts casos aquests MRCs dialitzats amb dislipèmia estan en tractament per tal de millorar el perfil lipídic. El tractament més emprat són les estatines. Recentment s'ha vist que aquestes estatines milloren el risc de complicacions de MCV, un dels problemes que

## *Discussió*

presenta el fet de tenir un EO elevat (Kowalski, Krikorian, & Lerma, 2015).

No hem trobat diferències estadísticament significatives en els paràmetres d'EO estudiats entre els MRCs dialitzats amb MCV i sense. Quan comparem separatament els dos grups respecte del grup control veiem que hi ha diferències en el paràmetre SOD. El grup MRC dialitzat sense MCV té uns valors significativament més baixos de SOD que el grup control, a diferència del grup amb MCV que tot i tenir valors més baixos que el grup control no són significatius. Hi ha diversos factors que fan augmentar la probabilitat d'aparició de MCV en pacients amb MRC, entre elles l'EO, lipoproteïnes elevades, els nivells d'homocisteïna i fibrinogen, la funció simpàtica hiperactiva, i la inflamació crònica. Els pacients amb MRC presenten patrons distintius de la dislipidèmia. Això, a la vegada, dóna lloc a la deposició de lipoproteïnes en l'àmbit glomerular que es tradueix en l'estimulació de diferents vies de senyalització que condueixen a la inflamació crònica i la fibrogènesi. Amb el tractament amb estatines s'inhibeix l'enzim HMG-CoA reductasa i es dóna lloc a una supressió de la producció de colesterol. Això implica una disminució en la producció de LDL que redueix significativament la mortalitat en la població general, així com en pacients amb MRC (Kowalski et al., 2015).

L'activació de NFκB és responsable de la inactivació d'enzims antioxidants SOD, GPx i CAT i, per tant, provoca més estrès oxidatiu i més inflamació sistèmica. En aquest sentit, aquest factor seria una bona diana per millorar l'estat inflamatori i oxidatiu dels MRCs (Tucker et al., 2015). A més, durant l'EO, les cèl·lules endotelials promouen l'expressió de molècules d'adhesió, fet que permet als neutròfils

adherir-se a aquest nou lloc distal de la lesió. Aquests neutròfils transmigren a la capa íntima d'una artèria i promouen l'acumulació de monòcits en el lloc de la lesió. Els monòcits es transformen en cèl·lules escumoses, que poden convertir-se en lesions ateroscleròtiques, la manifestació més comuna de les malalties cardiovasculars després de la hipertensió. La resposta immune juga un paper en la formació de lesions ateroscleròtiques i és responsable de la generació de radicals lliures circulants addicionals que tenen la capacitat de danyar altres teixits (Tucker et al., 2015). Els MRCs pateixen un estat d'EO, fet que fa que augmenti el risc de patir aquestes alteracions i que es pugui generar una MCV. La MCV és una de les principals causes de mortalitat dels MRCs (Rossignol et al., 2015).

Es va observar que no hi havia diferències estadísticament significatives quant als valors d'EO en cap dels paràmetres estudiats entre els MRCs fumadors, ex-fumadors i no fumadors. Quan comparem aquests grups per separat amb el grup control observem que els MRCs no fumadors tenen valors de SOD significativament més baixos que el grup control, i els altres dos grups no presenten diferències. En la capacitat antioxidant total també trobem diferències, el grup exfumador té valors més alts d'ORAC que el grup control i no hi ha diferències en l'ORAC NP respecte del control a diferència del que passa amb els altres dos grups, amb resultats més alts que el control. I en aquest grup d'exfumadors també trobem valors més elevats de FRAP respecte del control que no s'observen en els altres dos grups. És a dir, el grup d'exfumadors té valors més alts de ORAC i FRAP que el grup control, un comportament diferent dels altres dos grups. Això podria indicar que el fet de fumar podria augmentar la producció de SOD, els exfumadors i



## *Discussió*

els fumadors tenen valors de SOD similars al grup control, per intentar fer front a més EO causat pel consum de tòxics presents al tabac.

El consum de tabac sí que afecta l'estat oxidatiu. Tot i que no hi ha diferències estadísticament significatives es pot veure com el fet d'haver estat fumador i haver-ho deixat fa que augmentin els nivells de SOD respecte dels fumadors, així com també fa disminuir el dany a proteïnes plasmàtiques i, en general, hi ha un augment en la capacitat antioxidant total. Tot i que hi ha estudis que demostren que no hi ha millora a curt termini en l'estat oxidatiu dels exfumadors, fins i tot segueixen tenint el mateix risc de patir càncers que els fumadors (Goldkorn, Filosto, & Chung, 2014), nosaltres sí que veiem una millora en alguns paràmetres, com la SOD i l'ORAC.

Estudis epidemiològics suggereixen que el consum de tabac accelera la progressió de la MRC independentment de la seva etiologia (Rezonzew et al., 2012). A més, en estudis experimentals en models animals s'ha demostrat que l'exposició al fum ambiental del tabac empitjora la lesió renal en models de ratolí amb alteracions renals, tot i que s'han identificat els mecanismes responsables d'aquests efectes (Rezonzew et al., 2012). A més de les seves propietats addictives, la nicotina promou l'aterosclerosi i l'angiogènesi i empitjora la lesió glomerular, la proteïnúria i l'expansió de la matriu extracel·lular en ratolins amb nefropatia diabètica. També s'ha demostrat que el consum de tabac dóna lloc a un augment de l'activitat de la NOX renal, fet que produiria un augment de la producció de RLL (Rezonzew et al., 2012)

## *Discussió*

Per últim, els MRCs amb LSB i sense no presenten diferències estadísticament significatives en els paràmetres d'EO estudiats. Quan comparem els resultats dels dos grups per separat respecte del grup control veiem que Els MRCs dialitzats sense LSB tenen valors de la SOD més baixos que el grup control, i els que tenen LSB tenen valors més semblants al grup control. Aquests resultats confirmen que els MRC dialitzats han augmentat el seu estat oxidatiu, però això no està relacionat amb la presència o la gravetat de les LSB (Muñoz-Cortés et al., 2013). Tot i això es coneix que dins dels factors de risc de l'LSB hi ha l'EO i també moltes de les malalties concomitants de la MRC (MCV, HTA, diabetis, dislipèmia). Per tant, tenint en compte que ja estem parlant de MRCs dialitzats, amb un elevat nivell d'EO, no podem distingir nivells d'EO elevats en aquests MRCs que tenen LSB.

## *Discussió*

# 2. Discussió dels resultats del perfil metabolòmic

## 2.1 Discussió de les diferències generals

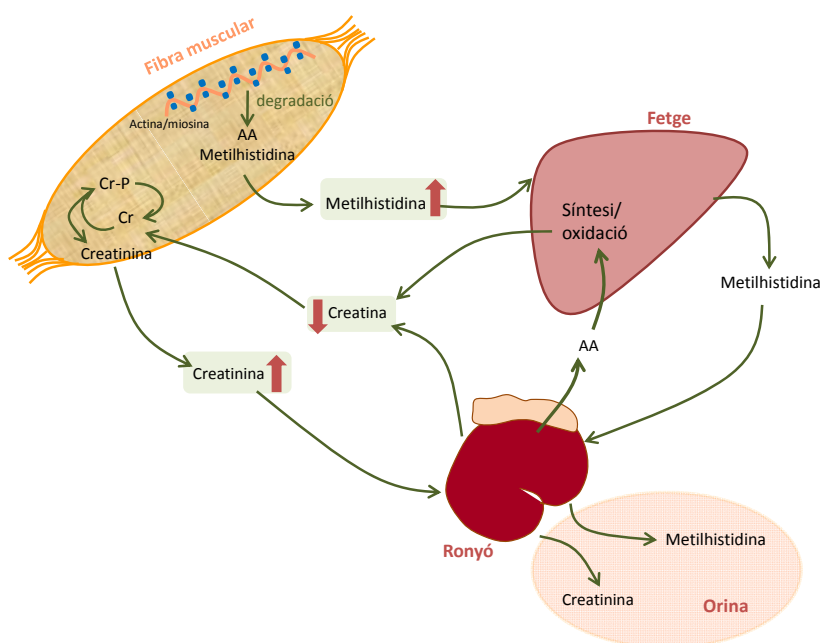
S'ha estudiat si el perfil metabolòmic dels MRCs dialitzats és diferent dels controls sans. Per això, s'han comparat els valors de cada paràmetre entre els dos grups i, a més, per veure si algun paràmetre era diferenciador dels dos grups s'ha fet una anàlisi de PCA.

Els MRCs dialitzats i el grup control tenen un perfil metabolòmic diferent en relació amb els aminoàcids, les molècules relacionades amb el perfil lipídic i altres molècules del metabolisme. Els resultats obtinguts ens mostren que els metabòlits que presenten, amb més pes en el model, valors diferents en els MRCs dialitzats i en el grup control i que, per tant, permeten diferenciar-los són els aminoàcids: tirosina, glicina, fenilalanina i metilhistidina, i el piruvat, la colina, el succinat, la creatinina, l'hipurat i la trigonel·lina.

Amb aquests resultats podem observar que tenim afectat el metabolisme de les proteïnes en l'àmbit muscular ja que hi ha implicades la metilhistidina i la creatinina. La degradació proteica en l'àmbit muscular associada a la MRC (Wang & Mitch, 2014) dóna lloc a un augment de metilhistidina que serà eliminada per l'orina (figura 42). Com que la funció renal està disminuïda, aquesta metilhistidina es pot acumular en plasma i presentar nivells elevats, tal com observem en els

MRCs dialitzats. Caldria estudiar si la metilhistidina és un bon biomarcador de progressió de MRC així com un marcador de nivell de massa muscular, com també si pot ser marcador primerenc de MRC, així com una futura anàlisi amb els MRCs no dialitzats.

Figura 42: Metabòlits del catabolisme muscular en els MRCs dialitzats



La creatina se sintetitza al fetge i al ronyó a partir de glicina, arginina i metionina. En l'àmbit muscular, quan es dona una degradació proteica s'allibera al torrent sanguini la metilhistidina que passa pel fetge i s'elimina per l'orina. Els MRCs dialitzats tenen nivells plasmàtics de creatinina i metilhistidina més elevats i més baixos de creatina que els controls sans. Cr: creatina, Cr-P: fosfocreatina, AA: aminoàcids.

La creatina, el precursor de la creatinina, és utilitzada com a font d'energia a les cèl·lules musculars. És sintetitzada al ronyó i al fetge a

## *Discussió*

partir d'aminoàcids (arginina, lisina i metionina) i és transportada al múscul. La creatinina sèrica ja és utilitzada a la clínica habitual com a marcador de dany renal; per tant, els nostres resultats estan d'acord amb aquest fet.

Hi ha diferents estudis que avaluen els nivells d'aminoàcids a la MRC en estadis avançats. Tal com observem en el nostre estudi, els nivells d'aminoàcids essencials es redueixen, mentre que els aminoàcids no essencials o bé estan augmentats o no varien, de manera que la proporció d'essencial/no essencials disminueix en els MRCs (Bergström, Alvestrand, & Fürst, 1990; Canepa, 2002). S'ha suposat que aquests canvis són a causa de la baixa ingesta de proteïnes, la deficiència de les funcions excretores i metabòliques dels ronyons malalts, l'efecte tòxic d'urèmia i, en pacients en diàlisi, la pèrdua de proteïnes i aminoàcids pel procediment de diàlisi (Canepa, 2002). Per tant, tot i que els MRCs dialitzats estudiats en aquest treball tenien un control dietètic d'ingesta de proteïnes, la degradació proteica es fa evident en l'estudi metabòlic.

D'altra banda, la pèrdua de massa muscular, proteòlisi, dona lloc a una acidosi metabòlica que s'intenta corregir al ronyó gràcies a l'aportació dels aminoàcids arginina i glicina provinents del múscul. S'ha descrit una disminució en la ràtio valina/glicina en plasma en malalts renals dialitzats (Fürst, 1989), en el nostre cas també observem uns valors més baixos de valina i més aixecats de glicina, de manera que la ràtio també disminuïria; fins i tot, hem observat que la glicina podria ser un marcador diferenciador entre els MRCs dialitzats i el grup control.

## *Discussió*

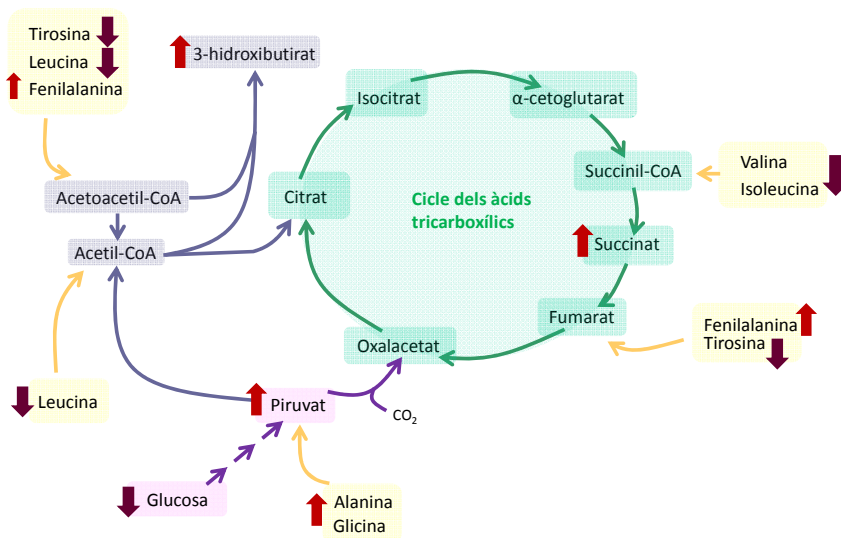
A la MRC existeix una afectació en la reacció que dona lloc a la tirosina a partir de la fenilalanina. Com a resultat, la tirosina i la relació de tirosina/fenilalanina es redueixen al plasma i a molts teixits, i les concentracions de fenilalanina tendeixen a ser normal o lleugerament augmentades (Kopple, 2007). En els nostres resultats observem un augment de fenilalanina; fins i tot la trobem com a variable diferenciadora entre el grup dels MRCs dialitzats i el grup control. En la MRC, l'alliberament de tirosina des del ronyó es troba reduïda i aquesta reducció es pot fer més acusada a mesura que avança la malaltia. L'estrès oxidatiu, augmentat en aquests pacients, pot conduir a una major formació de productes oxidatius de la fenilalanina que causen efectes adversos metabòlics o tòxics en pacients amb MRC. S'haurien d'estudiar els valors de fenilalanina en diferents estadis de la malaltia per saber si es podria fer servir com a marcador de progressió de malaltia renal.

Hem observat nivells elevats de colina en el grup dels MRCs dialitzats respecte del grup control i, a més, és una variable diferenciadora del grup, tal com hem vist a la PCA. També hem observat un augment significatiu de 3-glicerofosfatidilcolina. La colina és el precursor de l'acetilcolina i la fosfatidilcolina, està involucrada en la síntesi de fosfolípids, incloent els lípids en sang, i és la precursora immediata de la betaïna, que serveix com un donant de grup metil en la reacció de conversió de l'homocisteïna a metionina. Tenint en compte que el malalt renal dialitzat té un ambient oxidatiu augmentat, potser la valoració de la metionina oxidada, metionina sulfòxid, podria ser un biomarcador d'estrès oxidatiu específic en aquests malalts.

## Discussió

Altres variables estudiades mostren alteracions en el metabolisme de la glucosa i el cicle dels àcids tricarboxílics tal com indiquen els nivells elevats de piruvat i succinat i 3-hidroxiubutirat, trobats en el plasma d'aquests malalts, així com també nivells alterats dels aminoàcids: tirosina, leucina, valina i isoleucina (nivells disminuïts respecte del grup control sa), fenilalanina i glicina (nivells augmentat respecte del grup control sa) involucrats en aquest cicle (figura 43). En estudis de metabolòmica en MRCs en estadis primerencs (1-2), es pot detectar un augment en el lactat en sèrum i una disminució del citrat i el fumarat, fet que indica que en estadis primerencs de la MRC ja comencen a detectar-se canvis en aquestes rutes metabòliques (Kaori et al., 2011).

Figura 43. Cicle dels àcids tricarboxílics en els MRCs dialitzats



Les fletxes representen nivells augmentats o disminuïts dels metabòlits i aminoàcids en els malalts renals crònics dialitzats estudiats.

S'han trobat valors més elevats en els metabòlits hipurat i trigonelina. L'hipurat és una molècula que s'acumula en els MRCs i que és una de les anomenades toxines urèmiques. Principalment prové del metabolisme de la fenilalanina per la biota intestinal que dona lloc a l'hipurat. En condicions normals s'eliminaria amb l'orina, en els MRCs s'acumula en plasma.

La trigonelina és un alcaloide que prové de la dieta, majoritàriament del cafè. Si la funció renal està compromesa, aquesta trigonelina s'acumula a l'organisme, tal com observem en els nostres resultats.

El perfil metabolòmic dels MRCs dialitzats, en general, està lligat a canvis en la funció renal per tres mecanismes diferents. Hi ha metabòlits que s'acumulen a les cèl·lules tubulars, a la sang o a l'orina a causa d'una insuficiència renal, com per exemple la creatinina. Hi ha metabòlits que reflecteixen una modificació en l'activitat enzimàtica del teixit renal. I, finalment, hi ha metabòlits que són toxines urèmiques, com l'hipurat, que contribueixen directament a la progressió de la malaltia (Atzler et al., 2014). De totes maneres, en la literatura no queda clar quina és la contribució de l'hipurat en la progressió de la malaltia i, per tant, seria interessant estudiar quines són exactament les conseqüències de la seva acumulació en la circulació sistèmica.

No hem trobat cap paràmetre diferenciador en el perfil lipídic entre els dos grups, per tant, tot i que el perfil lipídic és diferent aquests paràmetres no són diferenciadors ja que no defineixen el fet de patir MRC o no.



## *Discussió*

### 2.2 Discussió dels resultats del perfil metabolòmic en funció de l'etiologia de la MRC

Fins ara, no hi ha cap estudi que compari el perfil metabòlic de les diferents etiologies estudiades de la MRC.

A més de la relació primària amb la funció renal, diversos metabòlits reflecteixen canvis metabòlics a causa de malalties subjacents i la insuficiència renal secundària com, per exemple, alteracions en el metabolisme energètic en la nefropatia diabètica, com són l'alteració en la captació de glucosa i una  $\beta$ -oxidació augmentada (Atzler et al., 2014).

Els MRCs dialitzats d'etiologies vascular, glomerular i intersticial/quística tenen valors de perfil metabòlic similars als trobats l'apartat anterior de diferències generals entre els MRCs dialitzats i el grup control. Els MRCs dialitzats d'etiologia diabètica presenten alteracions en altres metabòlits diferents dels descrits en l'apartat anterior. Així, els MRCs dialitzats d'etiologia diabètica tenen nivells significativament més baixos de format i més alts de fosfatidil inositol i fosfolípids totals que el grup control. A més aquests metabòlits no apareixen en les altres etiologies.

En un estudi recent es van comparar grups de MRCs de diferents fases sent diabètics o no i es va veure que no hi havia grans diferències en malalts amb i sense diabetis en fases avançades de la MRC (Lee et al., 2016). En fases primerenques han obtingut resultats similars als del present treball. També van veure una relació lineal entre els valors de

format i la TFG en pacients amb MRC, sent una de les molècules que podrien predir la progressió de la MRC (Lee et al., 2016). El format és un dels tòxics urèmics que dona lloc a la síndrome nefròtica, que està present en els malalts amb etiologia diabètica (Pang, Liang, Wang, Ping, & Luo, 2008).

En els pacients en hemodiàlisi s'ha descrit una alteració dels nivells sèrics de lipoproteïnes i fosfolípids quan es compara amb controls sans (Piperi et al., 2004). Nosaltres observem un augment en els nivells de fosfolípids totals i fosfatidilinositol mentre que Piperi et al troben nivells més baixos d'aquests.

El fet que no haguem trobat diferències en el perfil metabòlic en els diferents grups d'etiologia pot ser degut al fet que l'estat patològic dels MRCs és tan elevat que fa que no puguem observar les possibles diferències degudes a les causes de la MRC o bé que el nombre d'individus de cada grup no sigui prou potent com per donar una significació estadística, com és el cas de l'etiologia vascular i la diabètica.

No hi ha cap estudi que analitzi el perfil metabòlic dels MRCs amb etiologies diferents, així com tampoc un estudi per separat del perfil metabòlic o alteracions metabòliques dels MRCs amb etiologies concretes, d'aquí l'interès dels nostres resultats. Tot i que caldria augmentar la n dels grups estudiats per poder reproduir-los i, fins i tot, trobar alguna diferència més significativa.

## *Discussió*

### 2.3 Discussió dels resultats del perfil metabolòmic en funció de les alteracions concomitants a la MRC

No hem trobat cap biomarcador diferenciador clar que indiqui una alteració en concret en funció de la presència o no d'alteracions concomitants de la malaltia. De fet, hi ha autors que les uneixen i parlen de síndrome metabòlica (Prasad, 2014). S'ha de tenir en compte que el número d'individus no és molt gran en cada grup i que l'estat avançat de la malaltia pot fer que no apareguin aquestes diferències.

### 3. Discussió de la correlació entre els paràmetres d'EO i els de metabolòmica

No hi ha estudis on es relacioni directament paràmetres de perfil metabolòmic amb paràmetres d'EO. Els nostres resultats mostren que existeix una relació directa o indirecta entre els resultats obtinguts.

Hem descrit que en els MRCs dialitzats hi ha més degradació proteica que en els controls gràcies a marcadors com la metilhistidina, creatinina, fosfocreatina, valina, glicina, tirosina i fenilalanina. Les alteracions en els valors de tots ells donen lloc a un augment en l'EO. També s'observa un augment en la colina i la 3-glicerofosfocolina que tenen una correlació positiva amb l'EO, de manera que quan

augmenten aquests dos paràmetres també es produeix un augment en l'EO dels MRCs dialitzats.

Un altre ruta metabòlica que es troba alterada en els MRCs dialitzats és el cicle dels àcids tricarboxílics. Nosaltres hem trobat augmentat els nivells de piruvat, succinat, 3-hidroxiabutirat, fenilalanina i glicina i disminuïts la tirosina, leucina, valina i isoleucina. Tots ells indicadors de que la ruta està alterada i a més amb una correlació positiva amb l'EO.

Tots els metabòlits estudiats que estan més elevats en els malalts renals tenen correlació positiva amb els paràmetres d'EO i negativa amb els paràmetres d'estat antioxidant. De la mateixa manera, tots els metabolits estudiats que estan disminuïts en els malalts renals tenen correlació negativa amb els paràmetres d'EO i positiva amb els paràmetres d'estat antioxidant.

Per tant, els resultats ens indiquen una estreta relació entre el perfil metabolòmic i l'estat prooxidant dels malalts renals, fet que ens evidencia l'abast de les conseqüències de l'EO en aquests malalts.

## *Discussió*

### 4. Fortaleses i limitacions de l'estudi.

Les fortaleses i limitacions del nostre estudi han de ser considerades. No hi ha estudis que valorin diferències en conjunt amb EO i perfil metabolòmic en els MRCs, com tampoc hi ha cap estudi que valori les característiques de les diferents etiologies ni alteracions concomitants en aquests malalts.

Cal dir que en el nostre estudi existeixen diferents limitacions. La primera és la diferència d'edats en els grups a comparar, s'hauria d'homogeneïtzar aquest punt per poder augmentar la robustesa dels resultats. També cal tenir en compte que a l'augmentar l'edat augmenta l'EO dels malalts.

No hem pogut disposar de les dades de l'etiologia en el grup dels MRCs no dialitzats. En posteriors estudis seria interessant poder comparar els dos grups, MRCs no dialitzats i dialitzats, i els subgrups d'etiologia i alteracions concomitants per conèixer si l'evolució de la malaltia fa variar els paràmetres de metabolòmica i d'EO. Així com poder tenir grups amb n més elevades per augmentar la robustesa dels resultats.

Hagues estat interessant tenir dades de tractament amb estatines (Zinellu et al., 2015), amb ferro i amb EPO (Martinez-Vea et al., 2012), ja que aquests fàrmacs alteren els resultats d'EO per ells mateixos

Una altra limitació és que el perfil metabolòmic dóna una idea del que està passant en el moment en què es fa la presa de mostra i, per tant,

pot estar influenciat per la ingesta d'aliments previ a l'anàlisi, els fàrmacs administrats i els ritmes circadians. Les ciències òmiques aporten moltíssima informació, però presenten limitacions, seria ideal que es poguessin complementar entre elles (genòmica, proteòmica i metabolòmica) per tenir una visió total de la informació gènica, què s'està transcrivint i quina funció està fent per poder entendre i conèixer el funcionament de l'organisme i les seves alteracions.

L'EO ens dóna una idea de la progressió de la malaltia, sobretot els nivells de SOD i GPx. Per tant, incloure un tractament antioxidant en el maneig del pacient potser també seria interessant, tant en l'àmbit dietètic com en l'àmbit farmacològic. Nombrosos estudis demostren que una teràpia antioxidant pot millorar l'estat oxidatiu d'aquests malalts i reduir el risc de l'aparició d'altres malalties (Boaz et al., 2000; Choi et al., 2014; Jonathan Himmelfarb et al., 2003; Saran et al., 2003; Tepel et al., 2003), tot i que a la majoria de guies clíniques no està incorporada aquesta teràpia.

No hem pogut observar diferències globals en el perfil metabolòmic que ens permetin diferenciar els malalts segons la seva etiologia ni segons les alteracions concomitants, tot i que semblaria que aquests grups tenen característiques diferents entre ells. Tot i això, hi ha autors que les uneixen i parlen de síndrome metabòlica (Prasad, 2014). En un futur, es podria fer un estudi amb un nombre més gran de malalts per a cada grup per poder observar diferències i també poder fer el mateix estudi en MRCs no dialitzats i, així, poder estudiar la influència d'aquestes etiologies i alteracions en els MRCs.







## *Conclusions*

## Conclusions

1. El nivell d'estrès oxidatiu dels malalts renals crònics és superior al dels controls sans. La diàlisi millora els valors de GSSG però els MRCs dialitzats tenen esgotats els enzims antioxidants intracel·lulars (CAT, GPx i SOD) i un pitjor estat oxidatiu en relació amb les proteïnes i els lípids.
2. El nivell d'EO dels grups de MRCs de diferents etiologies és similar, disminució de la CAT, GPxe i GPxp. A la nefropatia diabètica hi ha afectació del sistema glutatió però no de la SOD, i valors més elevats en l'ORAC a diferència de les altres etiologies de la MRC.
3. L'EO present en els MRCs dialitzats no està relacionat amb la presència o severitat de les alteracions concomitants; hipertensió arterial, dislipèmia, malaltia cardiovascular, consum de tabac i lesió de la substància blanca.
4. Les variables del perfil metabolòmic que fan que es pugui diferenciar entre els MRCs i els controls sans són l'augment de: fenilalanina, glicina, metilhistidina, piruvat, colina, succinat i creatinina i la disminució de la tirosina. Els malalts renals presenten una alteració en el metabolisme de les proteïnes, l'homocisteïna i la glucosa, així com el cicle dels àcids tricarboxílics.
5. No hi ha diferències en el perfil metabolòmic entre grups de MRCs dialitzats de diferents etiologies. En el grup d'etiologia diabètica hi ha un augment de fosfatidilinositol i fosfolípids totals en sèrum i una disminució de format comparat amb el grup control. Aquests metabòlits només estan alterats en aquest grup d'etiologia.

## *Conclusions*

6. No s'ha trobat cap marcador metabolòmic que pugui diferenciar les alteracions concomitants de la MRC estudiades, tot i que presenten algunes diferències en els seus perfils.

7. Existeix una correlació entre el grau d'EO i el grau d'alteració dels metabòlits diferencials en la MRC. La correlació és positiva entre els paràmetres metilhistidina, creatinina, fosfocreatina, valina, glicina, tirosina, fenilalanina, colina i la 3-glicerofosfocolina amb el DPP i el GSSG. La correlació és negativa entre els paràmetres anteriors i els enzims antioxidants. Els metabòlits del cicle dels àcids tricarbòxílics alterats també correlacionen positivament amb els paràmetres d'EO.

## *Conclusions*





# Bibliografia

## *Bibliografia*

## Bibliografia

### A

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(17), 7915–7922.
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2014). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2014.996146>
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, *49*(5), 633–49. <http://doi.org/10.3109/10715762.2014.996146>
- Andersson, A., Lindgren, A., Arnadottir, M., Prytz, H., & Hultberg, B. (1999). Thiols as a Measure of Plasma Redox Status in Healthy Subjects and in Patients with Renal or Liver Failure. *Clin. Chem.*, *45*(7), 1084–1087. Retrieved from <http://www.clinchem.org/content/45/7/1084.long>
- Ansarihadipour, H., & Dorostkar, H. (2014). Comparison of plasma oxidative biomarkers and conformational modifications of hemoglobin in patients with diabetes on hemodialysis. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, *16*(11), e22045. <http://doi.org/10.5812/ircmj.22045>



## Bibliografia

- Atzler, D., Schwedhelm, E., & Zeller, T. (2014). Integrated genomics and metabolomics in nephrology. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 29(8), 1467–74. <http://doi.org/10.1093/ndt/gft492>
- Aziz, M. A., Majeed, G. H., Diab, K. S., & Al-Tamimi, R. J. (2015). The association of oxidant-antioxidant status in patients with chronic renal failure. *Renal Failure*, 1–7. <http://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1103654>

## B

- Bargnoux, A.-S., Cristol, J.-P., Jausset, I., Chalabi, L., Bories, P., Dion, J.-J., ... Morena, M. (2013). Vitamin E-coated polysulfone membrane improved red blood cell antioxidant status in hemodialysis patients. *Journal of Nephrology*, 26(3), 556–63. <http://doi.org/10.5301/jn.5000195>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–6. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bergström, J., Alvestrand, A., & Fürst, P. (1990). Plasma and muscle free amino acids in maintenance hemodialysis patients without protein malnutrition. *Kidney International*, 38(1), 108–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2117095>
- Boaz, M., Smetana, S., Weinstein, T., Matas, Z., Gafter, U., Iaina, A., ... Green, M. (2000). Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE):

- randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 356(9237), 1213–1218. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02783-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02783-5)
- Boudonck, K. J., Mitchell, M. W., Német, L., Keresztes, L., Nyska, A., Shinar, D., & Rosenstock, M. (2009). Discovery of metabolomics biomarkers for early detection of nephrotoxicity. *Toxicologic Pathology*, 37(3), 280–92. <http://doi.org/10.1177/0192623309332992>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Breit, M., & Weinberger, K. M. (2016). Metabolic biomarkers for chronic kidney disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 589, 62–80. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.018>
- Brück, K., Stel, V. S., Gambaro, G., Hallan, S., Völzke, H., Ärnlöv, J., ... Stojceva-Taneva, O. (2016). CKD Prevalence Varies across the European General Population. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 27(7), 2135–47. <http://doi.org/10.1681/ASN.2015050542>

## C

- Canepa, A. (2002). Free amino acids in plasma, red blood cells, polymorphonuclear leukocytes, and muscle in normal and uraemic children. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(3), 413–421. <http://doi.org/10.1093/ndt/17.3.413>
- Carr, H., & Purcell, E. (1954). Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review*, 94(3), 630–638. <http://doi.org/10.1103/PhysRev.94.630>

## Bibliografia

- Ceballos-Picot, I., Witko-Sarsat, V., Merad-Boudia, M., Nguyen, A. T., Thevenin, M., Jaudon, M. C., ... Descamps-Latscha, B. (1996). Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radical Biology & Medicine*, 21(6), 845–853.
- Chen, T.-S., Liou, S.-Y., & Chang, Y.-L. (2008). Chemiluminescent analysis of plasma antioxidant capacity in uremic patients undergoing hemodialysis. *Renal Failure*, 30(9), 843–7. <http://doi.org/10.1080/08860220802353827>
- Choi, B., Kang, K.-S., & Kwak, M.-K. (2014). Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(8), 12727–59. <http://doi.org/10.3390/molecules190812727>
- Cohen, G., Dembiec, D., & Marcus, J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34, 30–38.
- Consortium, C. K. D. P., Matsushita, K., van der Velde, M., Astor, B. C., Woodward, M., Levey, A. S., ... Gansevoort, R. T. (2010). Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*, 375(9731), 2073–2081. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60674-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60674-5); [10.1016/S0140-6736\(10\)60674-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60674-5)
- Coto-Montes, A., & Hardeland, R. (1999). Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *Journal of Pineal Research*, 27(3), 154–158.

## D

- Daehn, I., Casalena, G., Zhang, T., Shi, S., Fenninger, F., Barasch, N., ... Bottinger, E. P. (2014). Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(4), 1608–21. <http://doi.org/10.1172/JCI71195>
- Darshi, M., Van Espen, B., & Sharma, K. (2016). Metabolomics in Diabetic Kidney Disease: Unraveling the Biochemistry of a Silent Killer. *American Journal of Nephrology*, *44*(2), 92–103. <http://doi.org/10.1159/000447954>
- de Diego-Otero, Y., Romero-Zerbo, Y., el Bekay, R., Decara, J., Sanchez, L., Rodriguez-de Fonseca, F., & del Arco-Herrera, I. (2009). Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X knockout mouse: an experimental therapeutic approach for the Fmr1 deficiency. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *34*(4), 1011–1026. <http://doi.org/10.1038/npp.2008.152>
- Dogaru, C. B., Capusa, C., Gaman, L., Torac, E., Lixandru, D., Gilca, M., ... Atanasiu, V. (2015). Venous versus arterial iron administration in haemodialysis. Influence on erythrocytes antioxidant parameters. *Journal of Medicine and Life*, *8*(Spec Issue), 69–73.
- Dong, Y. F., Kataoka, K., Toyama, K., Sueta, D., Koibuchi, N., Yamamoto, E., ... Kim-Mitsuyama, S. (2011). Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension*, *58*(4), 635–642. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173534>
- Dounousi, E., Papavasiliou, E., Makedou, A., Ioannou, K., Katopodis, K. P., Tselepis, A., ... Tsakiris, D. (2006). Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *American*

## Bibliografia

*Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 48(5), 752–760.

<http://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.08.015>

Drabkin, D. L., & Austin, J. H. (1935). SPECTROPHOTOMETRIC STUDIES. IV. HEMOCHROMOGENS. *The Journal of Biological Chemistry*, 112, 89–104. Retrieved from <http://www.jbc.org>

Duplain, H., Burcelin, R., Sartori, C., Cook, S., Egli, M., Lepori, M., ... Scherrer, U. (2001). Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 104(3), 342–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457755>

Duranton, F., Lundin, U., Gayraud, N., Mischak, H., Aparicio, M., Mourad, G., ... Argilés, A. (2014). Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 9(1), 37–45. <http://doi.org/10.2215/CJN.06000613>

## E

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jürgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology & Medicine*, 13(4), 341–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1398217>

## F

Fandrey, J., Frede, S., & Jelkmann, W. (1994). Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *The Biochemical Journal*, 303 ( Pt 2(Pt 2), 507–510.

Faraci, F. M., & Didion, S. P. (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis*,

*Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), 1367–1373.  
<http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000133604.20182.cf>

Ferrannini, E., Buzzigoli, G., Bonadonna, R., Giorico, M. A., Oleggini, M., Graziadei, L., ... Bevilacqua, S. (1987). Insulin resistance in essential hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 317(6), 350–7. <http://doi.org/10.1056/NEJM198708063170605>

Fukai, T., Folz, R. J., Landmesser, U., & Harrison, D. G. (2002). Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 55(2), 239–249.

Fürst, P. (1989). Amino acid metabolism in uremia. *Journal of the American College of Nutrition*, 8(4), 310–323.  
<http://doi.org/10.1080/07315724.1989.10720307>

## G

Gansevoort, R. T., Correa-Rotter, R., Hemmelgarn, B. R., Jafar, T. H., Heerspink, H. J. L., Mann, J. F., ... Wen, C. P. (2013). Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet (London, England)*, 382(9889), 339–52.  
[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60595-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60595-4)

Gao, X., Chen, W., Li, R., Wang, M., Chen, C., Zeng, R., & Deng, Y. (2012). Systematic variations associated with renal disease uncovered by parallel metabolomics of urine and serum. *BMC Systems Biology*, 6 Suppl 1, S14. <http://doi.org/10.1186/1752-0509-6-S1-S14>

Garrett, A. R., Murray, B. K., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2010). Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 594, 251–62.  
[http://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1\\_17](http://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_17)

## Bibliografia

- Goek, O.-N., Döring, A., Gieger, C., Heier, M., Koenig, W., Prehn, C., ... Meisinger, C. (2012). Serum Metabolite Concentrations and Decreased GFR in the General Population. *American Journal of Kidney Diseases*, 60(2), 197–206. <http://doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.01.014>
- Goldberg, M. A., Dunning, S. P., & Bunn, H. F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4884), 1412–1415.
- Goldkorn, T., Filosto, S., & Chung, S. (2014). Lung injury and lung cancer caused by cigarette smoke-induced oxidative stress: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities involving the ceramide-generating machinery and epidermal growth factor receptor. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(15), 2149–74. <http://doi.org/10.1089/ars.2013.5469>
- Goodyear-Bruch, C., & Pierce, J. D. (2002). Oxidative stress in critically ill patients. *American Journal of Critical Care : An Official Publication, American Association of Critical-Care Nurses*, 11(6), 543.
- Gosmanova, E. O., & Le, N. A. (2011). Cardiovascular Complications in CKD Patients: Role of Oxidative Stress. *Cardiology Research and Practice*, 2011, 156326. <http://doi.org/10.4061/2011/156326>
- Gritters, M., Grooteman, M. P., Schoorl, M., Bartels, P. C., Scheffer, P. G., Teerlink, T., ... Nube, M. J. (2006). Citrate anticoagulation abolishes degranulation of polymorphonuclear cells and platelets and reduces oxidative stress during haemodialysis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(1), 153–159. <http://doi.org/10.1093/ndt/gfi069>

- Guerrero, M. A. (2006). Malnutrición y alteraciones metabólicas en diálisis peritoneal. *Seden*. Retrieved from [www.revistaseden.org](http://www.revistaseden.org)
- Gupta, S., Gambhir, J. K., Kalra, O., Gautam, A., Shukla, K., Mehndiratta, M., ... Shukla, R. (2013). Association of biomarkers of inflammation and oxidative stress with the risk of chronic kidney disease in Type 2 diabetes mellitus in North Indian population. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 27(6), 548–552. <http://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2013.07.005>

## H

- Hailpern, S. M., Melamed, M. L., Cohen, H. W., & Hostetter, T. H. (2007). Moderate chronic kidney disease and cognitive function in adults 20 to 59 years of age: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18(7), 2205–2213. <http://doi.org/10.1681/ASN.2006101165>
- Hallan, S. I., Matsushita, K., Sang, Y., Mahmoodi, B. K., Black, C., Ishani, A., ... Consortium, C. K. D. P. (2012). Age and association of kidney measures with mortality and end-stage renal disease. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 308(22), 2349–2360. <http://doi.org/10.1001/jama.2012.16817>
- Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1(5), 358–364.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52(8 Pt 1), 253–265.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990). The antioxidants of human



## Bibliografia

- extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(1), 1–8. [http://doi.org/DOI: 10.1016/0003-9861\(90\)90510-6](http://doi.org/DOI: 10.1016/0003-9861(90)90510-6)
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–55. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Han, L.-D., Xia, J.-F., Liang, Q.-L., Wang, Y., Wang, Y.-M., Hu, P., ... Luo, G.-A. (2011). Plasma esterified and non-esterified fatty acids metabolic profiling using gas chromatography–mass spectrometry and its application in the study of diabetic mellitus and diabetic nephropathy. *Analytica Chimica Acta*, 689(1), 85–91. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.034>
- Harris, R. C., & Neilson, E. G. (2006). Toward a unified theory of renal progression. *Annual Review of Medicine*, 57, 365–380. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131342>
- Hernández de Rojas, A., & Mateo, M. C. (1996). Superoxide dismutase and catalase activities in patients undergoing hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Renal Failure*, 18(6), 937–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8948528>
- Hernando Avedaño, L., Aljama, M., Arias, M., Carmelo, C., Egido, J., & Lamas, S. (2003). *Nefrología Clínica*. (Ed. Medica Panamericana, Ed.) (2ª ed. Mad).
- Himmelfarb, J. (2009). Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. *Seminars in Dialysis*, 22(6), 636–43. <http://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00659.x>
- Himmelfarb, J., Ault, K. A., Holbrook, D., Leeber, D. A., & Hakim, R. M. (1993). Intradialytic granulocyte reactive oxygen species production: a prospective, crossover trial. *Journal of the American*

*Society of Nephrology : JASN*, 4(2), 178–186.

Himmelfarb, J., Kane, J., McMonagle, E., Zaltas, E., Bobzin, S., Boddupalli, S., ... Miller, G. (2003). Alpha and gamma tocopherol metabolism in healthy subjects and patients with end-stage renal disease. *Kidney International*, 64(3), 978–91. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00151.x>

Himmelfarb, J., McMenamin, E., & McMonagle, E. (2002). Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients. *Kidney International*, 61(2), 705–716. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00151.x>

Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–226.

## J

Jackson, P., Loughrey, C. M., Lightbody, J. H., McNamee, P. T., & Young, I. S. (1995). Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clinical Chemistry*, 41(8 Pt 1), 1135–1138.

Jankowski, J., Tepel, M., Stephan, N., van der Giet, M., Breden, V., Zidek, W., & Schlüter, H. (2001). Characterization of p-hydroxyhippuric acid as an inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in end-stage renal failure. *Kidney International. Supplement*, 78, S84–8. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.59780084.x>

Jimenez, I., Agulla, J., Pouso, M., Sabucedo, M., Rodriguez-Yanez, M., Sobrino, T., ... Castillo, J. (2008). Cognitive impairment associated to leukoaraiosis: its pathophysiology, clinical manifestations and treatment. *Revista de Neurologia*, 47(10), 536–544.

## Bibliografia

Jones, W., Li, X., Qu, Z., Perriott, L., Whitesell, R. R., & May, J. M. (2002). Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(1), 83–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086686>

## K

Kaori, H., Hiroyuki, S., Takako, H., Makoto, S., Satsuki, I., Tomoyoshi, S., & Hiroshi, I. (2011). Use of serum and urine metabolome analysis for the detection of metabolic changes in patients with stage 1-2 chronic kidney disease. *Nephro-Urology Monthly*, 2011(Volume 3, Issue 3, Summer), 164–171. Retrieved from <http://numonthly.com/1255.fulltext>

Kasai, H., Okada, Y., Nishimura, S., Rao, M. S., & Reddy, J. K. (1989). Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. *Cancer Research*, 49(10), 2603–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2713844>

keane, william, Tomassini, J., & Neff, D. (2013). Lipid Abnormalities in Patients with Chronic Kidney Disease: Implications for the Pathophysiology of Atherosclerosis. Retrieved February 5, 2014, from [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/20/2/20\\_12849/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/20/2/20_12849/_article)

Kiely, M., Flynn, A., Harrington, K. E., Robson, P. J., O'Connor, N., Hannon, E. M., ... Strain, J. J. (2001). The efficacy and safety of nutritional supplement use in a representative sample of adults in the North/South Ireland Food Consumption Survey. *Public Health Nutrition*, 4(5A), 1089–1097.

- Kim, I. Y., Lee, D. W., Lee, S. B., & Kwak, I. S. (2014). The role of uric acid in kidney fibrosis: experimental evidences for the causal relationship. *BioMed Research International*, 2014, 638732. <http://doi.org/10.1155/2014/638732>
- Knap, B., Prezelj, M., Buturović-Ponikvar, J., Ponikvar, R., & Bren, A. F. (2009). Antioxidant enzymes show adaptation to oxidative stress in athletes and increased stress in hemodialysis patients. *Therapeutic Apheresis and Dialysis : Official Peer-Reviewed Journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*, 13(4), 300–5. <http://doi.org/10.1111/j.1744-9987.2009.00728.x>
- Koga, H., Takashima, Y., Murakawa, R., Uchino, A., Yuzuriha, T., & Yao, H. (2009). Cognitive consequences of multiple lacunes and leukoaraiosis as vascular cognitive impairment in community-dwelling elderly individuals. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases : The Official Journal of National Stroke Association*, 18(1), 32–37. <http://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.07.010>
- Kopple, J. D. (2007). Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. *The Journal of Nutrition*, 137(6 Suppl 1), 1586S–1590S; discussion 1597S–1598S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513431>
- Kosch, M., Levers, A., Fobker, M., Barenbrock, M., Schaefer, R. M., Rahn, K. H., & Hausberg, M. (2003). Dialysis filter type determines the acute effect of haemodialysis on endothelial function and oxidative stress. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(7), 1370–1375.
- Kowalski, A., Krikorian, A., & Lerma, E. V. (2015). Dyslipidemia in

## Bibliografia

chronic kidney disease. *Disease-a-Month : DM*, 61(9), 396–402.  
<http://doi.org/10.1016/j.disamonth.2015.07.004>

## L

Lee, J., Choi, J.-Y., Kwon, Y.-K., Lee, D., Jung, H.-Y., Ryu, H.-M., ... Hwang, G.-S. (2016). Changes in serum metabolites with the stage of chronic kidney disease: Comparison of diabetes and non-diabetes. *Clinica Chimica Acta*, 459, 123–131.  
<http://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.018>

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., ... Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464–478.

Libetta, C., Sepe, V., Esposito, P., Galli, F., & Dal Canton, A. (2011). Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. *Clinical Biochemistry*, 44(14-15), 1189–1198.  
<http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.06.988>;  
10.1016/j.clinbiochem.2011.06.988

Liu, X., Zhong, F., Tang, X., Lian, F., Zhou, Q., Guo, S., ... Zhang, N. (2014). Cordyceps sinensis protects against liver and heart injuries in a rat model of chronic kidney disease: a metabolomic analysis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(5), 697–706.  
<http://doi.org/10.1038/aps.2013.186>

Longo, D. L., Kasper, D. L., Jameson, J. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., & Loscalzo, J. (2012). *Harrison Medicina interna* (18e ed.). Retrieved from  
<http://harrisonmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=865>

## M

- Maehly, A. C. (1955). Experiments with peroxidase. III. Recombination of hemin and protein to the active enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 56(2), 507–524.
- Martinez-Vea, A., Marcas, L., Bardají, A., Romeu, M., Gutierrez, C., García, C., ... Giralt, M. (2012). Role of oxidative stress in cardiovascular effects of anemia treatment with erythropoietin in predialysis patients with chronic kidney disease. *Clinical Nephrology*, 77(3), 171–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22377247>
- Martinez-Vea, A., Salvado, E., Bardaji, A., Gutierrez, C., Ramos, A., Garcia, C., ... Oliver, J. A. (2006). Silent cerebral white matter lesions and their relationship with vascular risk factors in middle-aged predialysis patients with CKD. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 47(2), 241–250. <http://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.10.029>
- Masuda, J. (2005). Risk factors for cerebrovascular diseases. *Rinsho byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 53(5), 422–429.
- McMillan, J. (2012). Chronic Kidney Disease - Genitourinary Disorders - Merck Manuals Professional Edition. Retrieved December 9, 2015, from <http://www.merckmanuals.com/professional/genitourinary-disorders/chronic-kidney-disease/chronic-kidney-disease>
- Melov, S. (2002). Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(11), 1395–400. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200034>
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide

## Bibliografia

- dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175.
- Monge Berruezo, M. I., Acal Gutiérrez, P., Benavente Valdepeñas, A. M., Giménez García, J. M., Sánchez García, M. D., & Acal Gutiérrez, J. (2003). Amiloidosis asociada a hemodiálisis como causa de subluxación atlo-axoidea anterior. *Rehabilitación*, 37(03), 166–169. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-rehabilitacion-120-articulo-amiloidosis-asociada-hemodialisis-como-causa-13048556>
- Morena, M., Cristol, J. P., Bosc, J. Y., Tetta, C., Forret, G., Leger, C. L., ... Canaud, B. (2002). Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17(3), 422–427.
- Muñoz-Cortés, M., Cabré, C., Villa, D., Vives, J. P., Arruche, M., Soler, J., ... Martínez-Vea, A. (2013). Oxidative stress and other risk factors for white matter lesions in chronic hemodialysis patients. *Clinical Nephrology*, 80(9), 187–97. <http://doi.org/10.5414/CN107943>
- Murphree Duaine, & Thelen Sarah. (2010). Chronic Kidney Disease in Primary Care. Retrieved October 14, 2015, from [http://www.medscape.com/viewarticle/725635\\_5](http://www.medscape.com/viewarticle/725635_5)

## N

- Nafar, M., Sahraei, Z., Salamzadeh, J., Samavat, S., & Vaziri, N. D. (2011). Oxidative stress in kidney transplantation: causes, consequences, and potential treatment. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 5(6), 357–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22057066>

Nguyen-Khoa, T., Massy, Z. A., Witko-Sarsat, V., Thevenin, M., Touam, M., Lambrey, G., ... Descamps-Latscha, B. (1999). Critical evaluation of plasma and LDL oxidant-trapping potential in hemodialysis patients. *Kidney International*, *56*(2), 747–753. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00565.x>

## O

Ogunro, P. S., Olujombo, F. A., Ajala, M. O., & Oshodi, T. T. (2014). The effect of a membrane dialyzer during hemodialysis on the antioxidant status and lipid peroxidation of patients with end-stage renal disease. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation : An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, *25*(6), 1186–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394434>

Omran, J., Al-Dadah, A., & Dellsperger, K. C. (2013). Dyslipidemia in Patients with Chronic and End-Stage Kidney Disease. *Cardiorenal Medicine*, *3*(3), 165–177. <http://doi.org/000351985>

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626.

## P

Pang, L.-Q., Liang, Q.-L., Wang, Y.-M., Ping, L., & Luo, G.-A. (2008). Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid



## Bibliografia

chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 869(1-2), 118–25.  
<http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.05.027>

Pedret, A., Valls, R. M., Fernández-Castillejo, S., Catalán, Ú., Romeu, M., Giralt, M., ... Solà, R. (2012). Polyphenol-rich foods exhibit DNA antioxidative properties and protect the glutathione system in healthy subjects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(7), 1025–33. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201100676>

Piperi, C., Kalofoutis, C., Tzivras, M., Troupis, T., Skenderis, A., & Kalofoutis, A. (2004). Effects of hemodialysis on serum lipids and phospholipids of end-stage renal failure patients. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 265(1-2), 57–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543934>

Prats, M., Font, R., García, C., Muñoz-Cortés, M., Cabré, C., Jarrod, M., ... Martínez-Vea, A. (2014). Oxidative stress markers in predicting response to treatment with ferric carboxymaltose in nondialysis chronic kidney disease patients. *Clinical Nephrology*, 81(3), 419–26. <http://doi.org/10.5414/CN108166>

## R

Racek, R. C. and J. (2011). *Special Problems in Hemodialysis Patients*. (M. G. Penido, Ed.). InTech. <http://doi.org/10.5772/1840>

Rangel-López, A., Paniagua-Medina, M. E., Urbán-Reyes, M., Cortes-Arredondo, M., Alvarez-Aguilar, C., López-Meza, J., ... Paniagua, J. R. (2013). Genetic damage in patients with chronic kidney disease, peritoneal dialysis and haemodialysis: a comparative study. *Mutagenesis*, 28(2), 219–25.  
<http://doi.org/10.1093/mutage/ges075>

- Rashid, K., Sinha, K., & Sil, P. C. (2013). An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 584–600. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.026>
- Rezonzew, G., Chumley, P., Feng, W., Hua, P., Siegal, G. P., & Jaimes, E. A. (2012). Nicotine exposure and the progression of chronic kidney disease: role of the  $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholine receptor. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 303(2), F304–12. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00661.2011>
- Rhee, E. P., Clish, C. B., Ghorbani, A., Larson, M. G., Elmariah, S., McCabe, E., ... Gerszten, R. E. (2013). A Combined Epidemiologic and Metabolomic Approach Improves CKD Prediction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(8), 1330–1338. <http://doi.org/10.1681/ASN.2012101006>
- Rhee, E. P., Souza, A., Farrell, L., Pollak, M. R., Lewis, G. D., Steele, D. J. R., ... Gerszten, R. E. (2010). Metabolite Profiling Identifies Markers of Uremia. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(6), 1041–2051. <http://doi.org/10.1681/ASN.2009111132>
- Ribes, E. A. (2004). Fisiopatología de la insuficiencia renal crónica. Retrieved February 13, 2014, from [http://clinicalevidence.pbworks.com/w/file/attach/28241671/FISIOPATO RENAL CRONICA.pdf](http://clinicalevidence.pbworks.com/w/file/attach/28241671/FISIOPATO%20RENAL%20CRONICA.pdf)
- Romeu, M., Nogues, R., Marcas, L., Sanchez-Martos, V., Mulero, M., Martinez-Vea, A., ... Giralt, M. (2010). Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with chronic renal failure: a case control study. *BMC Research Notes*, 3, 20. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-3-20>
- Ross, E. A., Koo, L. C., & Moberly, J. B. (1997). Low whole blood and

## Bibliografia

erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 30(4), 489–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328362>

Rossignol, P., Massy, Z. A., Azizi, M., Bakris, G., Ritz, E., Covic, A., ... Fouque, D. (2015). The double challenge of resistant hypertension and chronic kidney disease. *The Lancet*, 386(10003), 1588–1598. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00418-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00418-3)

## S

Santangelo, F., Witko-Sarsat, V., Drüeke, T., & Descamps-Latscha, B. (2004). Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 19(8), 1951–5. <http://doi.org/10.1093/ndt/gfh266>

Saran, R., Novak, J. E., Desai, A., Abdulhayoglu, E., Warren, J. S., Bustami, R., ... Rajagopalan, S. (2003). Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(11), 2415–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14551376>

Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6), 608–619. <http://doi.org/10.1080/15257770802138558>; 10.1080/15257770802138558

Schefold, J. C., Zeden, J.-P., Fotopoulou, C., von Haehling, S., Pschowski, R., Hasper, D., ... Reinke, P. (2009). Increased indoleamine 2,3-

## Bibliografia

- dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 24(6), 1901–8.  
<http://doi.org/10.1093/ndt/gfn739>
- Seliger, S. L., & Sarnak, M. J. (2007). Subclinical vascular disease of the brain in dialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 50(1), 8–10. <http://doi.org/10.1053/j.ajkd.2007.04.022>
- Shah, V. O., Townsend, R. R., Feldman, H. I., Pappan, K. L., Kensicki, E., & Vander Jagt, D. L. (2013). Plasma metabolomic profiles in different stages of CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 8(3), 363–370.  
<http://doi.org/10.2215/CJN.05540512>; 10.2215/CJN.05540512
- Sharma, K. (2014). Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease. *Kidney International Supplements*, 4(1), 113–117.  
<http://doi.org/10.1038/kisup.2014.21>
- Shinohara, K., Shoji, T., Emoto, M., Tahara, H., Koyama, H., Ishimura, E., ... Nishizawa, Y. (2002). Insulin resistance as an independent predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(7), 1894–900. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089386>
- Silvestre, V., Goupry, S., Trierweiler, M., Robins, R., & Akoka, S. (2001). Determination of substrate and product concentrations in lactic acid bacterial fermentations by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry*, 73(8), 1862–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11338603>

## Bibliografia

- Soriani, M., Pietraforte, D., & Minetti, M. (1994). Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312(1), 180–8. <http://doi.org/10.1006/abbi.1994.1297>
- Stępniewska, J., Dołęgowska, B., Popińska, M., Sałata, D., Budkowska, M., Gołembiewska, E., ... Ciechanowski, K. (2014). Prooxidative-antioxidative balance of cells in different types of renal replacement therapy. *Blood Purification*, 37(1), 4–11. <http://doi.org/10.1159/000356806>
- Suhre, K., Meisinger, C., Döring, A., Altmaier, E., Belcredi, P., Gieger, C., ... Illig, T. (2010). Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS One*, 5(11), e13953. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013953>
- Sullivan, J. F., & Eisenstein, A. B. (1970). Ascorbic acid depletion in patients undergoing chronic hemodialysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 23(10), 1339–1346.
- Sung, C.-C., Hsu, Y.-C., Chen, C.-C., Lin, Y.-F., & Wu, C.-C. (2013). Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 301982. <http://doi.org/10.1155/2013/301982>

## T

- Tbahriti, H. F., Kaddous, A., Bouchenak, M., & Mekki, K. (2013). Effect of different stages of chronic kidney disease and renal replacement therapies on oxidant-antioxidant balance in uremic patients. *Biochemistry Research International*, 2013, 358985. <http://doi.org/10.1155/2013/358985>

- Tepel, M., van der Giet, M., Statz, M., Jankowski, J., & Zidek, W. (2003). The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation*, *107*(7), 992–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600912>
- Tousoulis, D., Papageorgiou, N., Androulakis, E., Siasos, G., Latsios, G., Tentolouris, K., & Stefanadis, C. (2013). Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *Journal of the American College of Cardiology*, *62*(8), 667–76. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.089>
- Toyohara, T., Akiyama, Y., Suzuki, T., Takeuchi, Y., Mishima, E., Tanemoto, M., ... Abe, T. (2010). Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. *Hypertension Research*, *33*(9), 944–952. <http://doi.org/10.1038/hr.2010.113>
- Tucker, P. S., Scanlan, A. T., & Dalbo, V. J. (2015). Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*, 806358. <http://doi.org/10.1155/2015/806358>

## V

- van der Kloet, F. M., Tempels, F. W. A., Ismail, N., van der Heijden, R., Kasper, P. T., Rojas-Cherto, M., ... Hankemeier, T. (2012). Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics (FinnDiane study). *Metabolomics : Official Journal of the Metabolomic Society*, *8*(1), 109–119. <http://doi.org/10.1007/s11306-011-0291-6>

## Bibliografia

van der Velde, M., Matsushita, K., Coresh, J., Astor, B. C., Woodward, M., Levey, A., ... Manley, T. (2011). Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney International*, 79(12), 1341–1352. <http://doi.org/10.1038/ki.2010.536>;  
10.1038/ki.2010.536

Vural, A., MI, Y., Calglar, K., Aydin, A., Sonmez, A., Eyileten, T., ... Oner, K. (2005). Assessment of Oxidative Stress in the Early Posttransplant Period: Comparison of Cyclosporine A and Tacrolimus-Based Regimens - Karger Publishers.  
<http://doi.org/10.1159/000086079>

## W

Wang, X. H., & Mitch, W. E. (2014). Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 10(9), 504–516. <http://doi.org/10.1038/nrneph.2014.112>

Wheeler, C. R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T., & Korte Jr, D. W. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*, 184(2), 193–199.

Wu, C. C., Chen, J. S., Wu, W. M., Liao, T. N., Chu, P., Lin, S. H., ... Lin, Y. F. (2005). Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 20(6), 1134–1139. <http://doi.org/10.1093/ndt/gfh764>

Wu, P. S., & Otting, G. (2005). Rapid pulse length determination in high-

resolution NMR. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)*, 176(1), 115–119.  
<http://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.05.018>

## X

Xu, H., Cabezas-Rodriguez, I., Qureshi, A. R., Heimbürger, O., Barany, P., Snaedal, S., ... Lindholm, B. (2015). Increased Levels of Modified Advanced Oxidation Protein Products Are Associated with Central and Peripheral Blood Pressure in Peritoneal Dialysis Patients. *Peritoneal Dialysis International : Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 35(4), 460–70.  
<http://doi.org/10.3747/pdi.2013.00064>

## Y

Ying, W., Han, S. K., Miller, J. W., & Swanson, R. A. (1999). Acidosis potentiates oxidative neuronal death by multiple mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 73(4), 1549–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501200>

## Z

Zanetti, M., Barazzoni, R., & Guarnieri, G. (2008). Inflammation and insulin resistance in uremia. *Journal of Renal Nutrition : The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, 18(1), 70–5.  
<http://doi.org/10.1053/j.jrn.2007.10.015>

Zeis, T., Probst, A., Steck, A. J., Stadelmann, C., Bruck, W., & Schaeren-Wiemers, N. (2009). Molecular changes in white matter adjacent to an active demyelinating lesion in early multiple sclerosis. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 19(3), 459–466.



## Bibliografia

<http://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00231.x>

Zhao, Y.-Y. (2013). Metabolomics in chronic kidney disease. *Clinica Chimica Acta*, 422(0), 59–69.

<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.03.033>

Zhao, Y.-Y., Vaziri, N. D., & Lin, R.-C. (2015). Lipidomics: new insight into kidney disease. *Advances in Clinical Chemistry*, 68, 153–75.

<http://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.002>

Zinellu, A., Sotgia, S., Mangoni, A. A., Sanna, M., Satta, A. E., Carru, C., ... Oda, H. (2015). Impact of cholesterol lowering treatment on plasma kynurenine and tryptophan concentrations in chronic kidney disease: relationship with oxidative stress improvement.

*Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 25(2), 153–9. <http://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.11.004>

## *Bibliografia*





# Annex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DE L'ESTRÈS OXIDATIU I DEL PERFIL METABÒLIC DE MALALTS RENALS CRÒNICS  
NO DIALITZATS I DIALITZATS  
Mónica Muñoz Cortés



©2013 Dustri-Verlag Dr. K. Feistle  
ISSN 0301-0430

DOI 10.5414/CN107943  
e-pub: June 7, 2013

## Oxidative stress and other risk factors for white matter lesions in chronic hemodialysis patients

Mònica Muñoz-Cortés<sup>1</sup>, Carme Cabré<sup>2</sup>, Diasol Villa<sup>3</sup>, Joan Pere Vives<sup>3</sup>, Mercedes Arruche<sup>4</sup>, Jordi Soler<sup>4</sup>, Maria Teresa Compte<sup>5</sup>, Josep Aguilera<sup>6</sup>, Manel Jarrod<sup>7</sup>, Marta Romeu<sup>1</sup>, Montserrat Giral<sup>1</sup> and Alberto Martínez-Vea<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pharmacology Unit, Department of Basic Health Sciences, Universitat Rovira i Virgili, Catalonia, <sup>2</sup>Nephrology Service, <sup>3</sup>Image Diagnostic Institute, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, <sup>4</sup>Medical Care Nephrology Center, Reus, <sup>5</sup>Nephrology Assistance Unit, Hospital de Jesús, Tortosa, <sup>6</sup>Dialysis Center, Hospital Llevant, and <sup>7</sup>Information Systems, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain

### Key words

chronic kidney disease  
– oxidative stress –  
white matter lesions –  
hemodialysis

**Abstract.** **Background:** Chronic kidney disease (CKD) is a risk factor for cardiovascular disease and promotes oxidative stress (OS), which has been implicated in the pathogenesis of white matter lesions (WML), a form of small-vessel cerebrovascular disease. The relationship between OS and WML in chronic hemodialysis (HD) patients has not yet been studied. **Methods:** We studied 67 chronic HD patients, aged 40 – 65 years (average 54 years) without known cerebrovascular disease. All patients underwent brain magnetic resonance imaging and subcortical and periventricular WML were evaluated using semiquantitative measures. Patients were classified into two groups depending on the presence or absence of WML (Fazekas classification), and the WML were scored. Carotid ultrasonography was also performed to evaluate the presence of carotid artery plaques and/or stenosis. Markers of protein and lipid oxidation (protein carbonyl and ox-LDL antibodies), the glutathione system, enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and catalase) and total antioxidant capacity (ORAC) were measured. OS markers were compared to those of a group of 36 healthy subjects. **Results:** WML were present in 54% of the total population. Patients who had WML were older and had lower predialysis diastolic blood pressure than patients without WML. Other potential cardiovascular risk factors for WML, including obesity, hyperlipidemia, diabetes mellitus, presence of carotid artery plaques or stenosis, and duration and adequacy of HD were not related to the presence of WML. Compared to controls, HD patients had increased OS and decreased antioxidant capacity. However, OS did not

differ between patients with WML and those without, and we found no association between OS markers and mean WML scores. After adjusting for several factors, only age and low predialysis diastolic blood pressure independently predicted an increased risk of WML. **Conclusions:** Our results confirm that chronic HD patients have increased OS, but this is not related to the presence or severity of WML.

### Introduction

White matter lesions (WML), defined as areas with high signal intensities on T-weighted brain MRI scans, are caused by cerebral small-vessel disease, and their severity is related to cardiovascular risk factors [1, 2]. They are associated with an increased risk of stroke, cognitive dysfunction and dementia [3]. Age and hypertension are considered the main risk factors for WML [1]. There is some evidence that other factors such as oxidative stress (OS), inflammation, endothelial dysfunction and homocysteine levels are involved in the pathogenesis of WML [4, 5].

WML are assumed to be caused by chronic hypoperfusion or ischemia due to arteriolosclerosis [1, 6]. OS is probably an additional risk factor for WML. Reactive oxygen species produce structural and functional changes in the vessel wall complex that have implications for the regulation of cerebral perfusion and the permeability of the blood-brain barrier [7]. Thus, the cerebral vascula-

### Received

November 14, 2012;  
accepted in revised form  
March 13, 2013

Correspondence to  
Alberto Martínez-Vea,  
MD  
Servei de Nefrologia,  
Hospital Universitari de  
Tarragona Joan XXIII,  
Carrer del Doctor  
Mallafre Guasch, 4,  
43007 Tarragona, Spain  
amartinezv.hj23.ics@  
gencat.cat

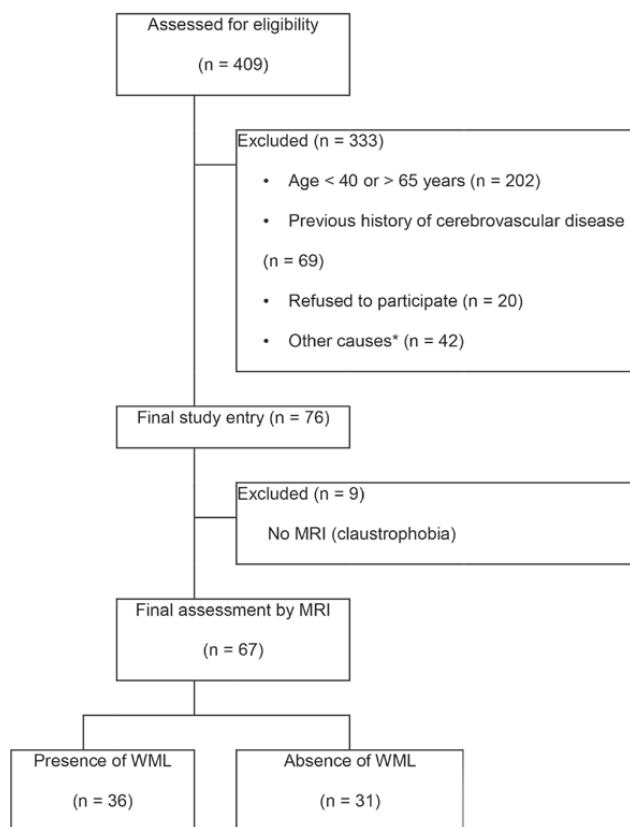


Figure 1. Chronic hemodialysis patients – flow chart. \*Other causes: dementia, psychiatric diseases, use of medications influencing central nervous system, blindness, malignant disease, extensive comorbidity.

ture is one of the major targets of OS, which plays a critical role not only in atherosclerosis in larger arteries but also in arteriosclerosis and the remodeling of smaller arteries [8]. Using diffusion tensor imaging, an MRI technique that provides information about white matter integrity, Back et al. [9] recently demonstrated that WML in older adults are characterized by increased free radical injury to myelin and neuroaxonal elements.

Patients with chronic kidney disease (CKD) have a higher prevalence of cardiovascular disease and neurological disorders (not only ischemic brain injury but also cognitive dysfunction) [10]. CKD is also associated with a high prevalence and higher grade of WML [11, 12, 13, 14]. We have reported that one third of middle-aged predialysis patients with CKD have silent WML and that

vascular nephropathy is the most important factor related to the presence of these lesions [15]. Little information is available about the prevalence and risk factors for these lesions in dialysis patients [16, 17, 18].

CKD patients have higher OS than healthy controls, and this may contribute to the elevated cardiovascular disease morbidity and mortality in these patients [19, 20]. The oxidative imbalance in CKD is probably the result of a combination of increased ROS production, reduced clearance and an ineffective antioxidant defense mechanism [19]. Several important antioxidant pathways have been reported to be altered in patients with CKD, including reduced erythrocyte SOD activity [21, 22], reduced plasma thiol groups, diminished plasma glutathione, and glutathione peroxidase function [23]. However, the total antioxidant capacity (TAC) of plasma remains normal or even increases as CKD progresses [24]. In hemodialysis (HD) patients, increased OS also appears to be due to an increase in free radicals generated on the surface of dialysis membranes by the activation of polymorphonuclear neutrophils due to bioincompatibility of treatments, and chronic inflammation, a common feature in these patients [25]. To the best of our knowledge, to date no studies have been made on the relationship between OS, and the presence and severity of WML in chronic HD patients.

The aim of this study was to analyze the relationship between OS and WML in chronic HD patients, with the hypothesis that OS may be a risk factor for WML in these patients.

## Subjects and methods

### Patients

The study was conducted in the Joan XXIII University Hospital in Tarragona (Spain). Patients were selected from the total population of HD patients (n = 409) treated in our region. Inclusion criteria included; 1) age between 40 and 65 years, 2) HD duration > 3 months and 3) no history of previous cerebrovascular disease. Of all the patients eligible for the study, we recruited 67 HD patients (Figure 1).

All of the enrolled patients underwent clinical evaluation for cardiovascular risk factors. The laboratory procedures included OS markers, carotid ultrasonography and magnetic resonance imaging in the middle of the week, 24 hours after the latest HD procedure.

In order to compare OS markers in HD patients with those of a general population, a control group of 36 age- and sex-matched healthy controls was included.

All patients gave their informed consent and the study was approved by the Ethics Committee of the Joan XXIII University Hospital.

### *WML risk factors*

Risk factors for WMLs such as hypertension, hyperlipidemia, obesity, diabetes mellitus, current smoking and prior cardiovascular disease, were evaluated.

Casual blood pressure was measured on the day of MRI exam, twice in sitting position on the right arm with a validated automatic oscillometric device (Omrom 705 CP, Healthcare GmbH, Hamburg, Germany). We used the average of these two measurements in the analyses. Hypertension was defined as a systolic blood pressure of 140 mmHg or greater, diastolic blood pressure of 90 mmHg or greater, or reported treatment for hypertension. Poor control of blood pressure was defined as systolic and diastolic blood pressure greater than 140 and 90 mmHg, respectively, despite treatment with antihypertensive agents. Predialysis blood pressure measurements were retrospectively collected from HD records for all HD sessions the month prior to the study. A single predialysis blood pressure measurement was taken by a dialysis unit nurse with patients in a sitting position, within 30 minutes prior to the dialysis session. The average value of blood pressure measurements was used to determine predialysis blood pressure.

Hyperlipidemia was defined as a low-density lipoprotein cholesterol level > 140 mg/dl or use of an oral lipid-lowering agent.

To define obesity, the weight of the day of MRI exam was used. Body mass index was calculated as weight (kilograms)/height

(square meters). Obesity was defined as a body mass index greater than 30 kg/m<sup>2</sup>.

Diabetes mellitus was defined as the administration of insulin therapy or prior diagnosis according to the Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus of the American Diabetes Association [26]. No patients were on non-insulin diabetes therapy, and 8 patients were receiving insulin therapy.

History of cardiovascular disease was evaluated by a retrospective chart review. Prior cardiovascular disease included a history of congestive heart failure, coronary artery disease, arrhythmia, peripheral vascular disease, carotid stenosis or aorta aneurysm.

The use of blood pressure-lowering medications, statins and/or fibrates, recombinant human erythropoietin and/or iron therapy, vitamin D, calcimimetics and anticoagulants and/or antiplatelet agents was assessed.

### *Adequacy of dialysis*

The spKt/V value used was the one measured the month before the beginning of the study. Adequacy of dialysis was defined as a spKt/V > 1.2 [27].

### *Carotid ultrasonography*

Ultrasonographic scanning of the carotid artery was performed using a high resolution ultrasonographer Siemens Acuson Antares, with a 13-MHz linear-array probe and pulsed Doppler imaging. Carotid stenosis was only considered if equal to or over 50% [28]. Carotid artery plaque was defined according to the Mannheim consensus, in which a plaque was diagnosed when the vessel wall thickness was > 1.5 mm or when the vessel wall appeared to be at least 0.5 mm or 50% thicker than the surrounding wall [29].

### *Magnetic resonance imaging*

Magnetic resonance imaging of the brain was performed using a 1.5-Tesla machine (Electric Signa HDxt. 1.5T), T1-, T2-weighted and FLAIR MRI in axial planes at 5-mm thick slices with an interslice gap of



1.5 mm. We define WML as hyperintense lesions located in the cerebral white matter that are visible on both T2 and fluid-attenuated inversion recovery and not visible on axial T1-weighted images (because of excluding lacunae and perivascular spaces). Lesions were considered to be periventricular when directly adjacent to the ventricles; otherwise, they were considered to be subcortical.

Subcortical and periventricular white matter signal changes were assessed by using visual semiquantitative measures in accordance with the Fazekas and Schmidt scale [30]. We classified our patients as having WML if there was: 1) Grade 2 or 3 periventricular hyperintensity, or 2) Grade 2 or 3 subcortical hypertense signals.

Finally, periventricular WML were rated semiquantitatively for each region (adjacent to the frontal horn, the lateral ventricles and the occipital horn) on a scale ranging from 0 (no lesions) to 3 (large confluent lesions) [31]. Subcortical WML were also rated semiquantitatively for each region in the right and left hemispheres separately (frontal, parieto-occipital and temporal areas), on a scale ranging from 0 (no lesions) to 3 (large confluent areas) [32]. Overall severity (global score) was calculated by adding the three periventricular subscores (range 0 – 9) and the four subcortical subscores (range 0 – 12).

Recordings were analyzed by two investigators (D.V. and J.P.V.) who were blinded to all clinical information. In the few cases of disagreement, the final diagnosis was made and the WML scored by consensus. WML grading was reliable and had an inter-reader intraclass correlation of 0.83.

### *Laboratory procedures*

A fasting venous sample was obtained. Serum glucose, albumin and prealbumin, total cholesterol, low-density lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol, triglyceride, hemoglobin and ferritin, calcium, inorganic phosphate and uric acid levels were determined by using routine laboratory methods. The serum parathyroid hormone level was determined by means of chemiluminescence (DPC Laboratories, Miami, FL, USA).

### *Oxidative stress biomarkers*

Several biomarkers of protein and lipid oxidation, antioxidant enzymes and total antioxidant capacity were determined.

Protein oxidation: Oxidized (GSSG) and reduced glutathione (GSH) was measured using the method described by Hissin and Hilf [33] based on the fluorimetric reaction of these compounds with o-phthalaldehyde in a Perkin Elmer LS50 B fluorometer. Oxidative damage in proteins, measured as a protein carbonization, was determined using the method described by Levine et al. [34] with variations introduced by Coto-Montes and Hardeland [35].

Lipid oxidation: Lipid damage was determined by quantifying oxidized low-density lipoprotein (LDLox) using an ELISA kit (Merckodia, ref. 10-1143-11. Uppsala, Sweden).

Antioxidant enzymes: Superoxide dismutase (SOD) measured by Misra and Fridovich's method [36] is based on auto-oxidation of epinephrine. Catalase (CAT) measured by Cohen et al.'s method [37] is based on determining the rate of hydrogen peroxide breakdown, and glutathione peroxidase (GPx), measured by the Wheeler et al.'s method [38], measures the consumption of NADPH by the reduction in t-butyl hydroperoxide. The three enzymes were analyzed in a Perkin Elmer Lambda 2 spectrophotometer.

Total antioxidant capacity: Total plasma antioxidant capacity was measured by the ORAC method (oxygen radical absorbance capacity) [39], which is based on a fluorimetric reaction that measures the antioxidant capacity to scavenge peroxide radicals induced by dihydrochloride of 2,2 azobis (2-amino-propane) on a Fluoroskan Ascent fluorescence plate reader.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using the statistical package SPSS/PC + (IMC, Chicago, IL, USA). Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Univariate analyses were performed to compare risk factors between patients according to WML status. Differences were tested with chi-square tests for categorized variables and Student's t-tests or Mann-Whitney U-tests for continuous

Table 1. Characteristics of patients with CKD and subgroups (presence or absence of WML).

|                                       | CKD patients<br>n = 67 | Presence of WML<br>n = 36 | Absence of WML<br>n = 31 | p-value |
|---------------------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|---------|
|                                       | Mean ± SD              | Mean ± SD                 | Mean ± SD                |         |
| Age (years)                           | 53.5 ± 7               | 56 ± 7                    | 51 ± 7                   | 0.002   |
| Male (%)                              | 72                     | 72                        | 71                       | 0.68    |
| Female (%)                            | 28                     | 28                        | 29                       |         |
| Current smoking (%)                   | 27                     | 19                        | 35                       | 0.37    |
| Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )  | 26.5 ± 4.5             | 26 ± 4                    | 27 ± 5                   | 0.82    |
| Dialysis duration (months)            | 75 ± 93                | 78 ± 91                   | 72 ± 95                  | 0.45    |
| Dialysis adequacy (%)                 | 88                     | 94                        | 81                       | 0.08    |
| Dyslipidemia (%)                      | 83                     | 86                        | 81                       | 0.74    |
| Obesity (%)                           | 21                     | 22                        | 19                       | 0.74    |
| Diabetes mellitus (%)                 | 15                     | 17                        | 13                       | 0.89    |
| Hypertension (%)                      | 66                     | 72                        | 58                       | 0.22    |
| History of cardiovascular disease (%) | 22                     | 25                        | 19                       | 0.77    |

CKD = chronic kidney disease; WML = white matter lesions; BP = blood pressure; SD = standard deviation. p-value between presence and absence of WML in hemodialysis patients.

Table 2. WML risk factors according to WML status.

|  | Presence of WML<br>n = 36 | Absence of WML<br>n = 31 | p-value |
|--|---------------------------|--------------------------|---------|
|  | Mean ± SD                 | Mean ± SD                |         |
| Casual systolic BP (mmHg)              | 128 ± 29                  | 127 ± 21                 | 0.05    |
| Casual diastolic BP (mmHg)             | 69 ± 15                   | 74 ± 10                  | 0.05    |
| Casual pulse pressure (mmHg)           | 59 ± 21                   | 52 ± 15                  | 0.19    |
| Pre-HD systolic BP (mmHg)              | 127 ± 20                  | 127 ± 13                 | 0.28    |
| Pre-HD diastolic BP (mmHg)             | 71 ± 10                   | 76 ± 10                  | 0.01    |
| Pre-HD pulse pressure (mmHg)           | 55 ± 15                   | 51 ± 10                  | 0.07    |
| Poor BP control (%)                    | 25.0                      | 16.1                     | 0.22    |
| Antihypertensive drugs (n)             | 1.7 ± 1.3                 | 1.1 ± 1.3                | 0.17    |
| ACE inhibitors/and or ARBs (%)         | 33                        | 35                       | 0.61    |
| Statins and/or fibrates (%)            | 61                        | 48                       | 0.32    |
| EPO therapy (%)                        | 90                        | 71                       | 0.53    |
| Anticoagulants/antiplatelet agents (%) | 47                        | 22                       | 0.04    |
| Carotid plaque (%)                     | 67                        | 52                       | 0.13    |
| Carotid stenosis (%)                   | 14                        | 3                        | 0.12    |

WML = white matter lesions; BP = blood pressure; HD = hemodialysis; ACE = angiotensin-converting enzyme; ARB = angiotensin receptor blocker; EPO = erythropoietin; SD = standard deviation. p-value between presence and absence of WML in HD patients.

variables. The univariate relation between variables was assessed by means of Pearson or Spearman correlation coefficients. Associations were tested through multivariate logistic regressions (maximum-likelihood method), and a backward stepwise procedure was used to identify independent predictors of WML. Odds ratios (i.e., exponentiated regression coefficients) were used to estimate relative risk, and the confidence interval was 95%. A value of p below 0.05 is considered statistically significant.

## Results

The characteristics of the patients are shown in Table 1. The mean age of the patients studied was 54 years and the mean duration of HD 75 months. 36 patients (54%) had WML, and the mean global WML score was 18 ± 8. 18 patients (27%) smoked habitually, 56 (83%) were dyslipemics, 14 (21%) were obese, 10 (15%) had diabetes mellitus, 44 (66%) had hypertension, 14 (21%) had uncontrolled blood pressure and 15 (22%) had a history of cardiovascular disease.

Table 3. Biochemical parameters according to WML status.

|                                  | Presence of WML<br>n = 36 | Absence of WML<br>n = 31 | p-value |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------|
|                                  | Mean ± SD                 | Mean ± SD                |         |
| Hemoglobin (g/l)                 | 130 ± 10                  | 130 ± 20                 | 0.57    |
| Plasma glucose (mmol/l)          | 5.1 ± 1.4                 | 5.7 ± 2.8                | 0.13    |
| Serum uric acid (µmol/l)         | 279.6 ± 95.2              | 315.2 ± 101.1            | 0.16    |
| Total serum cholesterol (mmol/l) | 4.6 ± 1.1                 | 4.4 ± 1.2                | 0.43    |
| HDL-cholesterol (mmol/l)         | 1.2 ± 0.4                 | 1.2 ± 0.4                | 0.71    |
| LDL-cholesterol (mmol/l)         | 2.6 ± 0.9                 | 2.5 ± 0.9                | 0.75    |
| Serum albumin (g/l)              | 40 ± 4                    | 44 ± 3                   | 0.43    |
| Serum prealbumin (mg/dl)         | 39 ± 10                   | 40 ± 8                   | 0.75    |
| Serum calcium (mmol/l)           | 2.5 ± 0.2                 | 2.5 ± 0.2                | 0.90    |
| Serum phosphorus (mmol/l)        | 1.6 ± 0.3                 | 1.4 ± 0.3                | 0.16    |
| Serum parathyroid hormone (ng/l) | 377 ± 434                 | 288 ± 354                | 0.58    |

WML = white matter lesions; LDL = low-density lipoprotein; HDL = high-density lipoprotein; SD = standard deviation. p-value between presence and absence of WML in HD patients.

Table 4. Oxidative stress parameters of HD patients and control group.

|                                     | Control group<br>n = 39 | HD patients<br>n = 39 | p-value |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------|
|                                     | Mean ± SD               | Mean ± SD             |         |
| Carbonyl groups (nmol/mg prot)*     | 0.72 ± 1.76             | 2.22 ± 2.05           | < 0.001 |
| GSH <sub>e</sub> (µmol/gHb)         | 4.32 ± 1.08             | 2.31 ± 1.22           | < 0.001 |
| GSSG <sub>e</sub> (µmol/gHb)        | 0.54 ± 0.22             | 1.27 ± 0.48           | < 0.001 |
| GSSG <sub>e</sub> /GSH <sub>e</sub> | 0.13 ± 0.07             | 0.79 ± 0.72           | < 0.001 |
| GSH <sub>p</sub> (nmol/ml)          | 17.61 ± 7.52            | 15.69 ± 5.78          | 0.21    |
| GSSG <sub>p</sub> (nmol/ml)         | 25.59 ± 3.71            | 26.15 ± 6.62          | 0.64    |
| GSSG <sub>p</sub> /GSH <sub>p</sub> | 1.71 ± 0.75             | 1.82 ± 0.66           | 0.50    |
| SOD <sub>e</sub> (U/gHb)            | 1,900 ± 532             | 1,416 ± 662           | 0.001   |
| GPX <sub>e</sub> (U/l)*             | 64.98 ± 1.36            | 35.63 ± 1.38          | < 0.001 |
| GPX <sub>p</sub> (U/l)              | 143.36 ± 50.93          | 54.47 ± 18.72         | < 0.001 |
| CAT <sub>e</sub> (mmol/min/gHb)     | 244.79 ± 38.39          | 182.98 ± 50.88        | < 0.001 |
| ORAC (µmolTE/ml)                    | 24.44 ± 11.34           | 28.87 ± 11.77         | 0.09    |

HD = hemodialysis; GSH = reduced glutathione; GSSG = oxidized glutathione; SOD = superoxide dismutase; GPx = glutathione peroxidase; CAT = catalase; ORAC = oxygen radical absorbance capacity; e = erythrocyte; p = plasma; SD = standard deviation. p-value between control group and HD patients. \*Geometric mean ± antilog SD.

The parameters of WML risk factors are shown in Table 2. HD patients with WML were older ( $56 \pm 7$  vs.  $51 \pm 7$  years,  $p = 0.002$ ), had lower casual diastolic blood pressure ( $69 \pm 15$  vs.  $74 \pm 10$  mmHg,  $p = 0.05$ ) and predialysis diastolic blood pressure ( $71 \pm 10$  vs.  $76 \pm 10$  mmHg,  $p = 0.01$ ) and took more anticoagulants and/or antiplatelet agents (47 vs. 22% patients,  $p = 0.04$ ) than those without WML. Carotid plaques were present in 40 patients (67%), whereas significant carotid stenosis was present in 6 patients (14%).

Other potential risk factors for WML, such as smoking, obesity, hyperlipidemia,

diabetes mellitus, history of cardiovascular disease, presence of carotid plaques or carotid stenoses, systolic blood pressure or poor blood pressure control, did not differ between the two groups. Causes of end-stage renal disease and dialysis duration and adequacy were similar in the two groups. Biochemical parameters did not differ between groups (Table 3).

Erythrocyte GSH, SOD, GPx, CAT and plasma GPX levels in the HD patients were significantly lower than those of healthy controls. Carbonyl groups, erythrocyte GSSG and the GSSG/GSH ratio were greater in HD patients than in controls (Table 4). OS markers did not differ between HD patients with or without WML (Table 5).

The WML score had a significant positive correlation with age ( $r = 0.36$ ,  $p = 0.003$ ) and tended to have a negative correlation with pre-HD diastolic blood pressure ( $r = -0.20$ ,  $p = 0.07$ ). The WML score was not associated with any of the OS markers.

Multivariate predictors of WML, including variables associated with WML in univariable analyses, were assessed by means of logistic regression. Only age and pre-dialysis diastolic blood pressure showed a significant association with the presence of WML (Table 6).

## Discussion

In this study we assessed the relationship between specific markers of OS and antioxi-

Table 5. Oxidative stress parameters of HD patients according to WML status.

|                                 | Presence of WML n = 36 | Absence of WML n = 31 | p-value |
|---------------------------------|------------------------|-----------------------|---------|
|                                 | Mean ± SD              | Mean ± SD             |         |
| Carbonyl groups (nmol/mg prot)* | 3.7 ± 4.5              | 4.9 ± 5.4             | 0.32    |
| Oxidized LDL (U/l)              | 43.4 ± 14.6            | 40.9 ± 16.1           | 0.51    |
| GSHe (µmol/gHb)                 | 2.5 ± 1.2              | 2.1 ± 1.1             | 0.20    |
| GSSGe (µmol/gHb)                | 1.3 ± 0.4              | 1.4 ± 0.6             | 0.61    |
| GSSGe/GSHe                      | 0.8 ± 0.6              | 1.3 ± 2.1             | 0.18    |
| GSHp (nmol/ml)                  | 15.2 ± 6.9             | 16.0 ± 6.3            | 0.63    |
| GSSGp (nmol/ml)                 | 24.3 ± 7.7             | 25.3 ± 7.9            | 0.61    |
| GSSGp/GSHp                      | 1.9 ± 0.7              | 1.7 ± 0.6             | 0.36    |
| SODe (U/gHb)                    | 1,517.0 ± 691.6        | 1,297.4 ± 455.7       | 0.13    |
| GPXe (U/l)*                     | 33.6 ± 11.6            | 36.5 ± 11.6           | 0.32    |
| GPXp (U/l)                      | 49.9 ± 19.4            | 54.7 ± 15.5           | 0.29    |
| CATe (mmol/min/gHb)             | 186.6 ± 46.6           | 175.9 ± 38.4          | 0.33    |
| ORAC (µmolTE/ml)                | 32.2 ± 11.8            | 27.5 ± 11.5           | 0.11    |

WML = white matter lesions; LDL = low-density lipoprotein; GSH = reduced glutathione; GSSG = oxidized glutathione; SOD = superoxide dismutase; GPx = glutathione peroxidase; CAT = catalase; ORAC = oxygen radical absorbance capacity; e = erythrocyte; p = plasma; SD = standard deviation. p-value between presence and absence of WML. \*Geometric mean ± antilog SD.

Table 6. Multiple logistic regression analysis for the presence of WML

|                     | β      | Odds ratio | 95% CI        | p-value |
|---------------------|--------|------------|---------------|---------|
| Age                 | 0.089  | 1.093      | 1.004 – 1.191 | 0.04    |
| Gender              | 0.257  | 1.293      | 0.387 – 4.325 | 0.67    |
| Pre-HD systolic BP  | 0.038  | 1.039      | 0.993 – 1.86  | 0.09    |
| Pre-HD diastolic BP | -0.085 | 0.919      | 0.848 – 0.995 | 0.03    |
| Constant = -3.322   |        |            |               |         |

WML = white matter lesions; HD = hemodialysis; BP = blood pressure.

dant enzymes and the presence of WML in chronic HD patients. We confirmed that HD patients had higher OS and a lower antioxidant capacity than healthy subjects. However, OS was not implicated in the presence or severity of WMS in this population. Other important findings were the high prevalence of WML in these middle-aged HD patients, and the negative correlation between pre-dialysis diastolic blood pressure and the presence of WML. Our patients were selected on the basis of age between 40 and 65 years to exclude involutive brain changes occurring with age [2].

CKD is associated with the presence and severity of WML, even in the early stages of CKD, suggesting that renal impairment may be involved in the pathogenesis of WML [11, 12, 13, 14]. In our previous study [15, 40], WML were found in 6% of normotensive control subjects, 28% of hypertensive

subjects with normal renal function and 33% of predialysis patients with CKD. It is well known that CKD patients have a high risk of cardiovascular disease [41]. Therefore, it is not surprising to find such a high prevalence of WML in this population.

There is little information available about the prevalence of WML in dialysis patients and which risk factors are involved in the presence of these lesions [16, 17, 18]. The present study showed that 54% of HD patients had WML. This high prevalence is striking because the HD patients included in the study were relatively young and showed no evidence of previous clinical cerebrovascular disease. The prevalence of WML in the present study was similar to that reported recently by Naganuma et al. [18] in a group of HD patients (52%, mean age of patients 58 years) and lower than that reported by Kim et al. [17] in a group of patients on peritoneal dialysis (68%, mean age of patients 57 years). Age and systolic blood pressure were independent and significant factors associated with the presence of WML in the HD group reported by Naganuma et al. [18]. In peritoneal dialysis, Kim et al. [17] found a tendency to poor control of blood pressure in their patients with WML, although systolic or diastolic blood pressure had no effect on WML status. In the present study neither systolic blood pressure nor poorly controlled hypertension were related to the presence of WML. Our study comprises a group of HD patients with well-controlled blood pressure; in fact, it was poorly controlled in only 21%. In hypertensive patients with well-controlled blood pressure, a recent study [42] has demonstrated that the presence of WML were not associated with either brachial or central systolic blood pressure. Thus, the lack of relationship between systolic blood pressure and the presence of WML in our HD population is not surprising.

One striking finding in our study was that low pre-dialysis diastolic blood pressure was an independent risk factor for the presence of WML. Previous studies have demonstrated the association between a decrease in diastolic blood pressure and periventricular WML [31, 43], especially in subjects with a history of myocardial infarction [31]. In predialysis CKD patients [44], severe lacunes, a form of cerebral small-vessel disease, were

associated with lower diastolic blood pressure, although when assessed by multivariate analysis, diastolic BP was not directly related with the presence of these lesions. In a recent article, Dorresteijn et al. [45] evaluated the effects of baseline blood pressure levels on vascular events in patients with manifest vascular disease, and concluded that lower levels of blood pressure, especially diastolic blood pressure, were an independent risk for recurrent vascular events. In the general population, white matter hypoperfusion and impaired autoregulation are important factors in the development of WML [46]. Adequate perfusion of brain white matter depends on blood pressure and the brain's autoregulatory capacity [47]. HD patients have impaired autonomic function [48]. Thus, our findings are in accordance with these observations, and suggest that low diastolic blood pressure may have a negative impact on WML in HD patients. Though non-significant, the patients with WML also appeared to have higher pulse pressure. This might suggest vascular stiffness and/or calcification as playing a role as a risk factor for WML.

Other potential explanations of the role that CKD may have in WML development include elevated levels of inflammatory and procoagulant mediators, endothelial dysfunction and oxidative load [25, 49, 50, 51]. OS is a constant feature of CKD and plays a major role in the accelerated atherosclerosis in these patients. OS has been linked to surrogate markers of cardiovascular disease, such as carotid intima-media thickness, endothelial dysfunction and left ventricular hypertrophy [19]. However, there is a lack of information about the relationship between OS biomarkers and the presence of WML in HD patients. Evidence suggesting the possible role of OS in the presence and progression of WML has been provided by experimental and human studies. In experimental models of chronic hypoperfusion, a decrease in oxidative damage protects against the development of WML [52]. In the general population, plasma NO metabolites and urinary 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub> are associated with the severity of periventricular WML [53]. A genotype of the paraoxonase 1 gene influences the extension and progression of WML in elderly subjects [54]. Reduced levels of plasma glutathione may be an important fac-

tor for the development of cerebral small vessel disease in patients with cardiovascular disease [55].

Our data suggest that in HD patients, OS is not associated with the presence and severity of WML. These negative results may be explained in several ways. First, it is possible that OS plays a less important role on WML in established CKD. The more advanced renal disease might attenuate the impact of OS on these lesions. Second, WML stratification in the present study did not adequately detect the effects of OS on WML. Nevertheless, the scales used to assess WML in our study were previously validated and show a good correlation with the quantitative volumetric measurements of WML [30]. Third, it is difficult to clinically evaluate OS because free radicals have very short half-lives [19]. It is possible that the molecular mechanisms that cause OS (e.g., increased NADPH-oxidase activity) and contribute to the development of cerebrovascular disease [7] were not detected in our HD patients. The biomarkers that we evaluated measure systemic changes in the prooxidant-antioxidant balance such as ox-LDL, carbonyl groups and plasma glutathione levels. To study intracellular oxidative damage we used erythrocytes, so the results are an approximation of what happens in other cells and organs such as the cerebrovascular system. Further studies are required to determine the most appropriate marker of cellular OS in this population.

There are other limitations to this study. Our study design is cross-sectional and, therefore, the results do not indicate causality. This study is also limited by the small sample size; future studies on larger HD cohorts will be needed to confirm our results. Finally, we measured casual and pre-dialysis blood pressure with standard methods. Blood pressure measurements obtained using ambulatory blood pressure monitoring are of greater prognostic value than measurements obtained in the dialysis unit [56]. In this context, studies to check 24-hour ambulatory blood pressure are necessary to confirm the relationship between pre-dialysis diastolic blood pressure and WML in our HD patients.

Despite these limitations, this is the first study that evaluates the relationship between OS and the presence and severity of WML in HD patients. We confirm that these patients

have increased OS, but this is not related to the presence and severity of the WML that are present in these patients.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest: Mònica Muñoz-Cortés, Carme Cabré, Diasol Villa, Joan PereVives, Mercedes Arruche, Jordi Soler, Maria Teresa Compte, Josep Aguilera, Manel Jariod, Marta Romeu, Montserrat Giralt, Alberto Martinez-Vea.

## References

- [1] Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 689-701. [CrossRef PubMed](#)
- [2] Grueter BE, Schulz UG. Age-related cerebral white matter disease (leukoaraiosis): a review. *Postgrad Med J.* 2012; 88: 79-87. [CrossRef PubMed](#)
- [3] Debette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010; 341 (jul26 1): c3666 [Cross-Ref PubMed](#)
- [4] Sierra C, Lopez-Soto A, Coca A. Connecting cerebral white matter lesions and hypertensive target organ damage. *J Aging Res.* 2011; 2011: 438978.
- [5] Schmidt R, Hayn M, Fazekas F, Kapeller P, Esterbauer H. Magnetic resonance imaging white matter hyperintensities in clinically normal elderly individuals. Correlations with plasma concentrations of naturally occurring antioxidants. *Stroke.* 1996; 27: 2043-2047. [CrossRef PubMed](#)
- [6] Swieten JC, van den Hout JH, van Ketel BA, Hijdra A, Wokke JH, van Gijn J. Periventricular lesions in the white matter on magnetic resonance imaging in the elderly. A morphometric correlation with arteriosclerosis and dilated perivascular spaces. *Brain.* 1991; 114: 761-774. [CrossRef PubMed](#)
- [7] Chrissobolis S, Faraci FM. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med.* 2008; 14: 495-502. [CrossRef PubMed](#)
- [8] Zalba G, Fortuño A, San José G, Moreno MU, Beloqui O, Diez J. Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis.* 2007; 24 (Suppl 1): 24-29. [CrossRef PubMed](#)
- [9] Back SA, Kroenke CD, Sherman LS, Lawrence G, Gong X, Taber EN, Sonnen JA, Larson EB, Montine TJ. White matter lesions defined by diffusion tensor imaging in older adults. *Ann Neurol.* 2011; 70: 465-476. [CrossRef PubMed](#)
- [10] Mogi M, Horiuchi M. Clinical Interaction between Brain and Kidney in Small Vessel Disease. *Cardiol Res Pract.* 2011; 2011: 306189.
- [11] Khatri M, Wright CB, Nickolas TL, Yoshita M, Paik MC, Kranwinkel G, Sacco RL, DeCarli C. Chronic kidney disease is associated with white matter hyperintensity volume: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Stroke.* 2007; 38: 3121-3126. [CrossRef PubMed](#)
- [12] Wada M, Nagasawa H, Iseki C, Takahashi Y, Sato H, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Daimon M, Kato T. Cerebral small vessel disease and chronic kidney disease (CKD): results of a cross-sectional study in community-based Japanese elderly. *J Neurol Sci.* 2008; 272: 36-42. [CrossRef PubMed](#)
- [13] Ikram MA, Vernooij MW, Hofman A, Niessen WJ, van der Lugt A, Breteler MM. Kidney function is related to cerebral small vessel disease. *Stroke.* 2008; 39: 55-61. [CrossRef PubMed](#)
- [14] Takahashi W, Tsukamoto Y, Takizawa S, Kawada S, Takagi S. Relationship between chronic kidney disease and white matter hyperintensities on magnetic resonance imaging. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2012; 21: 18-23. [CrossRef PubMed](#)
- [15] Martinez-Vea A, Salvadó E, Bardaji A, Gutierrez C, Ramos A, Garcia C, Compte T, Peralta C, Broch M, Pastor R, Angelet P, Marcas L, Sauri A, Oliver JA. Silent cerebral white matter lesions and their relationship with vascular risk factors in middle-aged predialysis patients with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47: 241-250. [CrossRef PubMed](#)
- [16] Fazekas G, Fazekas F, Schmidt R, Kapeller P, Offenbacher H, Krejs GJ. Brain MRI findings and cognitive impairment in patients undergoing chronic hemodialysis treatment. *J Neurol Sci.* 1995; 134: 83-88. [CrossRef PubMed](#)
- [17] Kim CD, Lee HJ, Kim DJ, Kim BS, Shin SK, Do JY, Jang MH, Park SH, Kim YS, Kim YL. High prevalence of leukoaraiosis in cerebral magnetic resonance images of patients on peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis.* 2007; 50: 98-107. [CrossRef PubMed](#)
- [18] Naganuma T, Takemoto Y, Shoji T, Shima H, Ishimura E, Okamura M, Nakatani T. Factors associated with cerebral white matter hyperintensities in haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton).* 2012; 17: 561-568. [CrossRef PubMed](#)
- [19] Del Vecchio L, Locatelli F, Carini M. What we know about oxidative stress in patients with chronic kidney disease on dialysis – clinical effects, potential treatment, and prevention. *Semin Dial.* 2011; 24: 56-64. [CrossRef PubMed](#)
- [20] Coombes JS, Fassett RG. Antioxidant therapy in hemodialysis patients: a systematic review. *Kidney Int.* 2012; 81: 233-246. [CrossRef PubMed](#)
- [21] Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Sonmez A, Ozgurtas T, Aydin A, Eyleten T, Ozcan O, Acikel C, Tasar M, Genctoy G, Erbil K, Vural A, Zoccali C. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47: 42-50. [Cross-Ref PubMed](#)
- [22] Himmelfarb J, McMenamin E, McMonagle E. Plasma aminothiol oxidation in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002; 61: 705-716. [CrossRef PubMed](#)
- [23] Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thévenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. Glutathione antioxidant system as a marker of oxida-

- tive stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med*. 1996; 21: 845-853. [CrossRef PubMed](#)
- [24] Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, Stamopoulos KC, Tsakiris D. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis*. 2006; 48: 752-760. [CrossRef PubMed](#)
- [25] Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A. Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem*. 2011; 44: 1189-1198. [CrossRef PubMed](#)
- [26] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997; 20: 1183-1197. [PubMed](#)
- [27] Hemodialysis Adequacy 2006 Work Group. Clinical practice guidelines for hemodialysis adequacy, update 2006. *Am J Kidney Dis*. 2006; 48 (Suppl 1): S2-S90. [CrossRef PubMed](#)
- [28] Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katarick S, Needleman L, Pellerito J, Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, Zierler E; Society of Radiologists in Ultrasound. Carotid artery stenosis: grayscale and Doppler ultrasound diagnosis – Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference. *Ultrasound Q*. 2003; 19: 190-198. [CrossRef PubMed](#)
- [29] Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004 – 2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis*. 2007; 23: 75-80. [CrossRef PubMed](#)
- [30] Kapeller P, Barber R, Vermeulen RJ, Adèr H, Scheltens P, Freidl W, Almkvist O, Moretti M, del Ser T, Vaghfeldt P, Enzinger C, Barkhof F, Inzitari D, Erkinjuntti T, Schmidt R, Fazekas F; European Task Force of Age Related White Matter Changes. Visual rating of age-related white matter changes on magnetic resonance imaging: scale comparison, interrater agreement, and correlations with quantitative measurements. *Stroke*. 2003; 34: 441-445. [CrossRef PubMed](#)
- [31] de Leeuw FE, de Groot JC, Oudkerk M, Witteman JC, Hofman A, van Gijn J, Breteler MM. A follow-up study of blood pressure and cerebral white matter lesions. *Ann Neurol*. 1999; 46: 827-833. [CrossRef PubMed](#)
- [32] Wahlund LO, Barkhof F, Fazekas F, Bronge L, Augustin M, Sjögren M, Wallin A, Ader H, Leys D, Pantoni L, Pasquier F, Erkinjuntti T, Scheltens P; European Task Force on Age-Related White Matter Changes. A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT. *Stroke*. 2001; 32: 1318-1322. [CrossRef PubMed](#)
- [33] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74: 214-226. [CrossRef PubMed](#)
- [34] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 464-478. [CrossRef PubMed](#)
- [35] Coto-Montes A, Hardeland R. Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *J Pineal Res*. 1999; 27: 154-158. [CrossRef PubMed](#)
- [36] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972; 247: 3170-3175. [PubMed](#)
- [37] Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem*. 1970; 34: 30-38. [CrossRef PubMed](#)
- [38] Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem*. 1990; 184: 193-199. [CrossRef PubMed](#)
- [39] Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1993; 14: 303-311. [CrossRef PubMed](#)
- [40] Martínez Vea A, Salvadó E, Bardaji A, Gutierrez C, Ramos A, García C, Compte T, Oliver JA. Lesiones silentes de sustancia blanca cerebral en pacientes de mediana edad afectos de insuficiencia renal crónica prediálisis. Existe una mayor prevalencia que en la hipertensión arterial esencial? *Nefrología*. 2006; 26: 61
- [41] Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Gansevoort RT; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*. 2010; 375: 2073-2081. [CrossRef PubMed](#)
- [42] Takami T, Yamano S, Okada S, Sakuma M, Morimoto T, Hashimoto H, Somekawa S, Saito Y. Major risk factors for the appearance of white-matter lesions on MRI in hypertensive patients with controlled blood pressure. *Vasc Health Risk Manag*. 2012; 8: 169-176. [CrossRef PubMed](#)
- [43] van Dijk EJ, Breteler MM, Schmidt R, Berger K, Nilsson LG, Oudkerk M, Pajak A, Sans S, de Ridder M, Dufouil C, Fuhrer R, Giampaoli S, Launer LJ, Hofman A; CASCADE Consortium. The association between blood pressure, hypertension, and cerebral white matter lesions: cardiovascular determinants of dementia study. *Hypertension*. 2004; 44: 625-630. [CrossRef PubMed](#)
- [44] Washida N, Wakino S, Hayashi K, Kuwahara T, Itoh H. Brachial-ankle pulse wave velocity predicts silent cerebrovascular diseases in patients with end-stage renal diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2010; 17: 165-172. [CrossRef PubMed](#)
- [45] Dorresteyn JA, van der Graaf Y, Spiering W, Grobbee DE, Bots ML, Visseren FL; Secondary Manifestations of Arterial Disease Study Group. Relation between blood pressure and vascular events and mortality in patients with manifest vascular disease: J-curve revisited. *Hypertension*. 2012; 59: 14-21. [CrossRef PubMed](#)

- [46] *Markus HS, Lythgoe DJ, Ostegaard L, O'Sullivan M, Williams SC.* Reduced cerebral blood flow in white matter in ischaemic leukoaraiosis demonstrated using quantitative exogenous contrast based perfusion MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000; *69*: 48-53. [CrossRef PubMed](#)
- [47] *Birns J, Jarosz J, Markus HS, Kalra L.* Cerebrovascular reactivity and dynamic autoregulation in ischaemic subcortical white matter disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; *80*: 1093-1098. [CrossRef PubMed](#)
- [48] *Chesterton LJ, Sigrist MK, Bennett T, Taal MW, McIntyre CW.* Reduced baroreflex sensitivity is associated with increased vascular calcification and arterial stiffness. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; *20*: 1140-1147. [CrossRef PubMed](#)
- [49] *Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, Furberg CD, Psaty BM.* Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly patients with renal insufficiency. *Circulation.* 2003; *107*: 87-92. [CrossRef PubMed](#)
- [50] *Baylis C.* Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; *294*: F1-F9. [CrossRef PubMed](#)
- [51] *Romeu M, Nogues R, Marcas L, Sánchez-Martos V, Mulero M, Martínez-Vea A, Mallol J, Giralt M.* Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with chronic renal failure: a case control study. *BMC Res Notes.* 2010; *3*: 20. [CrossRef PubMed](#)
- [52] *Kim JS, Yun I, Choi YB, Lee KS, Kim YI.* Ramipril protects from free radical induced white matter damage in chronic hypoperfusion in the rat. *J Clin Neurosci.* 2008; *15*: 174-178. [CrossRef PubMed](#)
- [53] *Shibata H, Nabika T, Moriyama H, Masuda J, Kobayashi S.* Correlation of NO metabolites and 8-iso-prostaglandin F2a with periventricular hyperintensity severity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; *24*: 1659-1663. [CrossRef PubMed](#)
- [54] *Schmidt R, Schmidt H, Fazekas F, Kapeller P, Roob G, Lechner A, Kostner GM, Hartung HP.* MRI cerebral white matter lesions and paraoxonase PON1 polymorphisms : three-year follow-up of the austrian stroke prevention study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; *20*: 1811-1816. [CrossRef PubMed](#)
- [55] *Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, Kitazono T, Tanizaki Y, Kubo M, Ueno H, Ibayashi S, Fujishima M, Iida M.* Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke.* 2004; *35*: 2072-2077. [CrossRef PubMed](#)
- [56] *Chazot C.* Dialysis: prognostic value of blood pressure in patients on hemodialysis. *Nat Rev Nephrol.* 2010; *6*: 506-508. [CrossRef PubMed](#)



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DE L'ESTRÈS OXIDATIU I DEL PERFIL METABÒLIC DE MALALTS RENALS CRÒNICS  
NO DIALITZATS I DIALITZATS  
Mónica Muñoz Cortés

# Acute and sub-acute effect of ferric carboxymaltose on inflammation and adhesion molecules in patients with predialysis chronic renal failure

Merche Prats<sup>1</sup>, Ramon Font<sup>1</sup>, Carmen García-Ruiz<sup>1</sup>, Carmen Cabré<sup>1</sup>, Mónica Muñoz-Cortés<sup>2</sup>, M. Rosa Nogués<sup>2</sup>, Manel Jarrod<sup>3</sup>, Marta Romeu<sup>2</sup>, Alberto Martínez-Vea<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Nefrología. Hospital Universitari Joan XXIII. Tarragona (Spain)

<sup>2</sup> Unidad de Farmacología. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universitat Rovira i Virgili. Reus, Tarragona (Spain)

<sup>3</sup> Unidad de Sistemas de Información de la Gestión. Hospital Universitari Joan XXIII. Tarragona (Spain)

Nefrología 2013;33(3):355-61

doi:10.3265/Nefrología.pre2013.Jan.11774

## ABSTRACT

**Background:** Treatment with parenteral iron causes oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction. Ferric carboxymaltose (FCM) is a new preparation of non-dextran iron which, due to its pharmacokinetics and stability, may induce less toxicity than other iron molecules. The aim of this study was to analyse the effect of FCM on inflammation and adhesion molecules in chronic kidney disease (CKD). **Methods:** Forty-seven patients with predialysis CKD and iron-deficiency anaemia received a single dose of FCM (15mg/kg, maximum dose 1 gram). At baseline and after 60 minutes (acute effect) and after 3 weeks and 3 months (sub-acute effect), we determined inflammatory markers: C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and endothelial dysfunction: intercellular adhesion molecule (ICAM) and vascular adhesion molecule (VCAM). **Results:** Treatment with FCM was associated with a significant increase in haemoglobin levels: 10 (0.7) vs. 11.4 (1.3)g/dl,  $P < .0001$ . CRP, IL-6, ICAM and VCAM levels did not correlate with baseline haemoglobin or ferritin levels and there was no relationship between changes in these markers and those of haemoglobin after administration of FCM. No significant, acute or sub-acute changes occurred in any of the inflammatory or endothelial markers studied. Statin therapy was associated with lower VCAM concentrations. **Conclusions:** Treatment with high doses of FCM in patients with predialysis CKD has no proinflammatory effect and does not alter levels of adhesion molecules ICAM and VCAM in this population.

**Keywords:** Ferric carboxymaltose. Chronic kidney disease. Inflammation. Adhesion molecules.

*Efecto agudo y subagudo de la carboximaltosa férrica sobre la inflamación y moléculas de adhesión en pacientes con insuficiencia renal crónica prediálisis*

## RESUMEN

**Antecedentes:** El tratamiento con hierro parenteral provoca estrés oxidativo, inflamación y disfunción endotelial. La carboximaltosa férrica (CMF) es un nuevo preparado de hierro no dextrano que, por sus características farmacocinéticas y estabilidad, podría inducir menor toxicidad que otras moléculas de hierro. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la CMF sobre la inflamación y moléculas de adhesión en la enfermedad renal crónica (ERC). **Métodos:** Cuarenta y siete pacientes con ERC prediálisis y anemia ferropénica recibieron una dosis única de CMF (15 mg/kg, dosis máxima 1 gramo). De forma basal, a los 60 minutos (efecto agudo), y a las 3 semanas y 3 meses (efecto subagudo), se determinaron marcadores de inflamación: proteína C reactiva (PCR) e interleucina 6 (IL-6), y de disfunción endotelial: moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y vascular (VCAM). **Resultados:** El tratamiento con CMF se asoció a un incremento significativo de los niveles de hemoglobina: 10 (0,7) vs. 11,4 (1,3) g/dl,  $p < 0,0001$ . Los niveles de PCR, IL-6, ICAM y VCAM no se correlacionaron con los niveles basales de hemoglobina ni ferritina, y no se observó ninguna relación entre los cambios en estos marcadores y los de hemoglobina después de la administración de CMF. No se observaron cambios significativos ni de forma aguda o subaguda en ninguno de los marcadores inflamatorios o endoteliales estudiados. El tratamiento con estatinas se asoció a menores concentraciones de VCAM. **Conclusiones:** El tratamiento con dosis elevadas de CMF en pacientes con ERC prediálisis no tiene efecto proinflamatorio ni modifica los niveles de moléculas de adhesión ICAM y VCAM en esta población.

**Palabras clave:** Carboximaltosa férrica. Insuficiencia renal crónica. Inflamación. Moléculas de adhesión.

## INTRODUCTION

Anaemia in chronic kidney disease (CKD) has a multifactorial origin with iron deficiency being one of the main mechanisms,

**Correspondence:** Merche Prats

Servicio de Nefrología.

Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona (Spain).

pfk21@hotmail.com

## originals

and a prevalence of about 50% according to studies.<sup>1</sup> This deficiency also implies a risk of arteriosclerosis,<sup>2,3</sup> since there is a defect in iron-containing protein production with antioxidant capacity.

It has been observed how iron-deficient patients have a higher level of adhesion molecules, which are *per se* a risk factor for developing arteriosclerosis<sup>4</sup> and are independent factors of cardiovascular death.<sup>5</sup> In CKD, inflammatory markers and adhesion molecules expression are increased and there is an inverse relationship with renal function: the lower the glomerular filtration (GF), the higher its expression.<sup>6</sup> This relationship is maintained in haemodialysis.<sup>7</sup> In the population with normal renal function, the correction of iron deficiency decreases the expression of these molecules,<sup>8</sup> although there are no studies in predialysis CKD patients.

Treatment with intravenous iron is safe and effective in correcting anaemia in patients with CKD in which iron requirements are increased. However, there are some studies, especially on dialysis, that demonstrate that the aforementioned treatment increases the inflammatory state,<sup>9-11</sup> however, in other studies that use different preparations at different doses and frequencies of administration, the aforementioned increase is not observed.<sup>12-16</sup> There is little evidence of the action of iron on the expression of adhesion molecules. Experimental studies examining the effect of different iron molecules on mononuclear cells of patients on haemodialysis demonstrate there is a lesion and an activation of these cells.<sup>17,18</sup>

It has been suggested that differences in the pharmacological characteristics of iron preparations and administration dosage (dose and administration intervals) of the iron administered may involve variations in the inflammatory effect<sup>19-22</sup> and on adhesion molecules.

Ferric carboxymaltose (FCM) is a new generation of non-dextran iron, which may be administered quickly and at high doses; it involves a controlled release of iron to the tissues and has minimal side effects.<sup>23-25</sup> Due to these characteristics, it has been suggested that this iron molecule would have less effect on inflammation and adhesion molecules. In fact, in experiments, it has been shown that FCM, compared with other iron preparations with lower molecular weight, does not induce oxidative stress or increase inflammation.<sup>22</sup>

The aim of our study was to analyse the effect of FCM administration in predialysis CKD patients with iron deficiency on adhesion molecules and inflammation.

## METHODS

### Study population

50 patients were recruited from the Nephrology department's outpatient service of the Hospital Universitari Joan XXIII in

Tarragona. They were above 18 years of age, had predialysis CKD and presented the following inclusion criteria: serum haemoglobin <11g/dl, serum ferritin <100ng/ml and/or transferrin saturation index <20%. Patients excluded were those who in the previous three months had received oral iron or blood transfusion or who had bleeding, infection or active acute inflammatory process and a history of hypersensitivity to treatment with intravenous iron.

Of the initial 50 patients, 3 were excluded (2 due to gastrointestinal bleeding and 1 due to active infection during follow-up), and therefore, the final study population consisted of 47 patients.

This study was approved by the hospital ethics committee and all patients signed the informed consent.

### Study design

This was a prospective study that lasted for 18 months (beginning in April 2010 and ending in October 2011). Patients received a single dose of FCM (Ferinject®) at 15mg/kg (maximum 1g) diluted in 250cc of saline solution with an infusion time of 30 minutes.

### Determination of clinical variables

Some cardiovascular risk factors such as hypertension, dyslipidaemia and obesity were determined.

Arterial hypertension (HTN): blood pressure was determined on three occasions during the procedure (with three measurements in each of them) for assessment of haemodynamic tolerance during the process. We used a validated automatic device (Omron 705CP, Healthcare GmbH, Hamburg, Germany). HTN was defined as systolic blood pressure of 140 mmHg or higher, diastolic blood pressure of 90mmHg or higher, or treatment with antihypertensive drugs.

Obesity: body mass index (BMI) expressed as weight (kg)/height (square metre) was calculated. Obesity was defined as BMI>30kg/m<sup>2</sup>.

Dyslipidaemia: was defined as total cholesterol greater than 240mg/dl or being on statin therapy.

Diabetes mellitus: was defined as fasting plasma glucose above 126mg/dl or patients treated with oral anti-diabetic drugs and/or insulin.

### Biochemical determinations

At baseline, 60 minutes after administration of FCM (acute effect), and after 3 weeks and 3 months of treatment (sub-

acute effect), the determination of haemoglobin (Hb) and ferrokinetic parameters (ferritin, transferrin saturation index [TSI] was carried out by conventional methods and inflammatory markers: ultrasensitive C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6) and adhesion molecules: soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble vascular cellular adhesion molecule-1 (sVCAM-1). Levels of IL-6 were determined using the commercial kit Human IL-6 Quantikine HS High Sensitivity (R&D Systems, Lille, France). The N High Sensitivity CRP kit was used to determine CRP (Dade Bering, Newark, USA). Levels of ICAM and VCAM were determined by the Quantikine® ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, USA).

In all patients, routine methods were used to determine levels of creatinine and GF through the formula MDRD-4.

## STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using the SPSS v. 15 software. Ultrasensitive CRP values were not distributed normally and were therefore transformed logarithmically. The verification or rejection of the hypothesis of normality of continuous variables was performed with the Shapiro-Wilk test. The association between nominal variables was studied by contingency tables and Fisher's exact probability test. To analyse the association between a continuous variable and a nominal variable, the Mann-Whitney "U" test or the Kruskal-Wallis test were used in accordance with whether or not it was dichotomous. We used Spearman's correlation coefficient to measure the linear association between two continuous variables. For analysis involving repeated measurements of continuous variables, we used analysis of the variance for repeated measurements with the criterion of Wilks' lambda. The level of statistical significance was set at  $P < .05$  in a two-tailed test.

## RESULTS

### Population characteristics

This is an older population (mean age 72 years) with CKD: 13 patients in stage 3; 27 in stage 4 (57.4%) and 7 non-dialysis patients in stage 5 CKD. The aetiology of the CKD was of vascular origin (48.9%), followed by diabetic nephropathy (25.5%); other causes included: interstitial/polycystic kidney disease (6.4%), glomerular (4.3%) and unknown origin (14.9%).

All patients were hypertensive, overweight (mean BMI of 29kg/m<sup>2</sup>), 75% were dyslipidaemic and 40% had diabetes.

The characteristics of the population are summarised in Table 1.

### Effect of ferric carboxymaltose on anaemia

After treatment with FCM, we observed a significant increase in levels of Hb, ferritin and TSI (Table 2).

### Acute effect of ferric carboxymaltose on adhesion molecules and inflammation

No significant differences were observed between the baseline levels and levels after 60 minutes of VCAM and ICAM treatment, and no significant differences were observed in inflammatory markers (Table 3).

### Sub-acute effect of ferric carboxymaltose on adhesion molecules and inflammation

We did not observe any significant changes in adhesion molecules or inflammatory markers after 3 weeks or 3 months of treatment with FCM. In an analysis differentiated in accordance with the CKD stage: stage 3 vs. stage 4 + 5, no significant changes were observed in any of the markers analysed. Albumin levels remained unchanged throughout the study.

Table 1. Clinical variables of the population.

|                                 |              |
|---------------------------------|--------------|
| Age (years)                     | 72 (11.6)    |
| Sex (M/F)                       | 23/24        |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )        | 29.3 (4.5)   |
| HTN                             | 47 (100%)    |
| SBP (mmHg)                      | 150.5 (31.6) |
| DBP (mmHg)                      | 71.3 (14.6)  |
| Use of ACE inhibitor/ARBs       | 28 (59.6%)   |
| DM                              | 19 (40.4%)   |
| Dyslipidaemia                   | 35 (74.5%)   |
| Use of statins                  | 26 (53.3%)   |
| Use of ESA                      | 23 (48.9%)   |
| Creatinine (mg/dl)              | 2.56 (0.95)  |
| GF (ml/min/1.73m <sup>2</sup> ) | 26.1 (10.4)  |

ESA: erythropoiesis-stimulating agents; ARBs: angiotensin II receptor antagonists; DM: diabetes mellitus; GF: glomerular filtration rate; M: male; AHT: arterial hypertension; ACE inhibitors: angiotensin converting enzyme inhibitors; BMI: body mass index; F: female; DBP: diastolic blood pressure; SBP: systolic blood pressure.

## originals

**Table 2.** Effect of ferric carboxymaltose on anaemia.

|                    | Baseline    | 3 weeks       | 3 months    | P       |
|--------------------|-------------|---------------|-------------|---------|
| Haemoglobin (g/dl) | 10.0 (0.71) | 10.8 (0.87)   | 11.4 (1.3)  | <0.0001 |
| Ferritin (ng/ml)   | 67.8 (61.7) | 502.5 (263.3) | 230 (144.6) | <0.0001 |
| TSI (%)            | 14.6 (6.4)  | 28.9 (10.0)   | 25.6 (12.7) | <0.0001 |

TSI: transferrin saturation index.

After adjusting the effect of treatment with FCM and various parameters such as the presence of diabetes mellitus, dyslipidaemia, the use of erythropoiesis stimulating agents, the use of angiotensin converting enzyme inhibitors and/or angiotensin II receptor antagonists and statins, we only observed that statin use changed the response of the adhesion molecules on treatment with FCM. VCAM levels were lower in patients treated with statins than in untreated patients ( $P=.02$ ). In addition, they significantly increased in untreated patients, while they remained unchanged in treated patients ( $P=.02$ ) (Table 4). No significant differences were perceived in ICAM levels.

Lastly, we examined the influence of treatment with paricalcitol on the effect of FCM on inflammatory markers and endothelial cells, without perceiving significant differences between treated and untreated patients.

The effect of FCM on adhesion molecules and inflammation is summarised in Table 3.

### The relationship between anaemia, inflammatory markers and adhesion molecules

No correlation was observed between baseline levels of Hb, ferritin, CRP, IL-6, VCAM or ICAM, or between the percentage of change in levels of Hb, CRP, IL-6, VCAM and ICAM after 3 weeks and 3 months.

## DISCUSSION

The result of our study shows that in patients with predialysis CKD and iron deficiency anaemia, treatment with FCM does not induce inflammation or cause an increase in adhesion molecules.

Iron deficiency anaemia in CKD patients is a major problem because of its high prevalence and its contribution to the morbidity and mortality associated with CKD.<sup>5</sup> It is considered one of the non-traditional cardiovascular risk factors<sup>24</sup> and, although less well-known, it is also considered an independent risk factor in the development of arteriosclerosis, probably due to a defect in the production of other Fe<sup>2+</sup>-containing proteins such as peroxidases, catalases involved in preventing the latter.<sup>25</sup>

Patients with iron deficiency anaemia have higher levels of adhesion molecules.<sup>8</sup> These molecules are directly involved in the initiation and aggravation of arteriosclerotic lesions.<sup>26</sup> In CKD, there is an overexpression of these molecules, which are higher the lower the GF, and they remain high in the population on renal replacement therapy. High levels of these molecules are associated with malnutrition, inflammation and cardiovascular disease; this suggests that there is a relationship between vascular activation, systemic inflammation and uraemic toxicity. Lastly, CKD is considered to be an inflammatory state involved in different complications of CKD, such as malnutrition and accelerated atherosclerosis.<sup>27-29</sup>

**Table 3.** Acute and sub-acute effect of ferric carboxymaltose on inflammatory markers and adhesion molecules.

|              | Baseline       | 1 hour         | 3 weeks       | 3 months       | P  |
|--------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----|
| VCAM(ng/ml)  | 1281.5 (695.1) | 1325.2 (684.4) | 1281.6 (698)  | 1262.4 (713.9) | ns |
| ICAM (ng/ml) | 340.7 (112.0)  | 343.6 (123.5)  | 336.8 (117.8) | 348.3 (104.2)  | ns |
| Log CRP      | 0.60 (0.55)    | 0.48 (0.54)    | 0.59 (0.54)   | 0.57 (0.59)    | ns |
| IL-6 (pg/ml) | 4.74 (4.76)    | 4.57 (7.06)    | 4.49 (4.5)    | 4.0 (3.27)     | ns |

ICAM: intercellular adhesion molecules; IL-6: interleukin 6; ns: not significant; CRP: C-reactive protein; VCAM: vascular cell adhesion molecules.

**Table 4.** Influence of treatment with statins in the response of adhesion molecules to ferric carboxymaltose.

|                     | Baseline       | 3 weeks        | 3 months       |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>VCAM (ng/ml)</b> |                |                |                |
| no statins          | 1479.9 (883.7) | 1481.5 (913.6) | 1565.8 (984.5) |
| statins             | 1151.4 (482.3) | 1150.6 (444.9) | 1039.6 (222.6) |
| <b>ICAM (ng/ml)</b> |                |                |                |
| no statins          | 344.5 (94.8)   | 351.1 (105.3)  | 366.8 (132.7)  |
| statins             | 339.6 (127.2)  | 325.5 (129.6)  | 333.5 (76.8)   |

ICAM: intercellular adhesion molecules; VCAM: vascular cell adhesion molecules.

### Ferric carboxymaltose and inflammation

It has been suggested that treatment with parenteral iron could contribute to morbidity and mortality in patients with CKD due to increased oxidative stress and inflammation. In our study, treatment with FCM did not have an acute or a short-term proinflammatory effect.

One of the possible mechanisms responsible for the neutral effect of FCM on inflammation could be that correcting anaemia would improve or rather counteract the inflammatory stimulus of FCM. In fact, there are studies in patients with anaemia treated with erythropoiesis-stimulating agents in which, after an improvement in Hb figures, there is a decrease of inflammatory parameters,<sup>30</sup> even if taking iron.<sup>31</sup> By contrast, in our study, we did not find a correlation between changes in Hb levels and inflammatory parameters, which suggests that the neutral effect of treatment with FCM on inflammation would not be mediated by the improvement of anaemia.

Another possible explanation could be the characteristics of the FCM molecule. Iron preparations of low molecular weight and low thermokinetic stability (iron gluconate, iron sucrose) cause an abrupt rise in serum iron, with transferrin oversaturation and more free iron, which determines an increase in inflammatory molecules. By contrast, ferric carboxymaltose is a macromolecular carbohydrate-iron hydroxide complex, designed to allow a controlled release of iron in the cells of the reticuloendothelial system, minimising the risk of releasing large amounts of ionic iron in serum. In a study conducted in rats,<sup>22</sup> we compared the effect of different iron preparations, including carboxymaltose, on inflammation and oxidative stress, concluding that the aforementioned molecule would induce less inflammation than other preparations.

Lastly, we must mention the lack of a proinflammatory effect of FCM with high doses of this molecule used in this study. In most publications, intravenous iron doses are low

compared to those of our study, and some also advocate the slow administration of the product in order to minimise the aforementioned proinflammatory effect. We have not observed this effect despite using large doses (about 1 gram on average) in a short interval of time (maximum 30 minutes). However, given that there are no studies with a follow-up time longer than three months, the implications of long-term use of FCM on inflammatory status is unknown.

### Ferric carboxymaltose and adhesion molecules

There are few studies that analyse the effect of parenteral iron administration on adhesion molecules in patients with CKD and iron deficiency anaemia.

In the population with normal renal function, it has been observed that administration of oral iron causes a decrease in VCAM, but not ICAM.<sup>8</sup>

Treatment with four intravenous iron preparations (ferric gluconate, iron sucrose, iron dextran and FCM) causes an increase in the expression of ICAM-1, reactive oxygen species and apoptosis in the mononuclear cells of patients with stage 5 CKD and in haemodialysis patients, regardless of the iron used. By contrast, in our study, treatment with FCM had no effect on the levels of adhesion molecules, as has been described with iron sucrose on endothelial function in patients on haemodialysis<sup>16</sup> or peritoneal dialysis.<sup>15</sup>

The mechanism by which FCM would not produce endothelial lesion could also be related to the characteristics of the molecule itself, with a lower release of ionic iron in serum and lower endothelial lesion.

Lastly, we must note the effect of statins on adhesion molecules. The relationship between arteriosclerosis and inflammation is known,<sup>32</sup> as well as that statins reduce systemic inflammation and improve endothelial function.<sup>33,34</sup> In our study, we observed lower levels of VCAM in patients

## originals

who were on lipid-lowering treatment, which suggests that statins may counteract the stimulation of treatment with FCM on the aforementioned adhesion molecule.

### Limitations of the study

The number of patients included in the study was small and the follow-up time was short. Studies with larger numbers of patients and longer follow-up periods are necessary to confirm the lack of effect of FCM on inflammation and adhesion molecules in this population.

Our study did not evaluate endothelial function. However, plasma concentrations of adhesion molecules analysed correlate with the expression of these molecules in the surface of the endothelial cells,<sup>35</sup> they reflect endothelial activation and vascular inflammation<sup>36</sup> and are considered to be markers of endothelial dysfunction.

In conclusion, treatment with high doses of FCM in patients with predialysis CKD has no proinflammatory effect and does not change the levels of adhesion molecules in these patients. Concomitant treatment with statins is associated with a lower concentration of these molecules.

### Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest related to the contents of this article.

### REFERENCES

1. Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J. Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med* 2002;162:1401.
2. Akins PT, Glenn S, Nemeth PM, Derdeyn CP. Carotid artery thrombus associated with severe iron deficiency anemia and thrombocytosis. *Stroke* 1996;27:1002-5.
3. Hartfield DS, Lowry NJ, Keene DL, Yager JY. Iron deficiency: a cause of stroke in infants and children. *Pediatr Neurol* 1997;16:50-3.
4. De Caterina R, Basta G, Lazzarini G, Dell'Omo G, Petrucci R, Morale M. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biochemical correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2646-54.
5. Suliman M, Qureshi R, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P. Soluble adhesion molecules in end-stage renal disease: a predictor of outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1603-10.
6. Stinghen AE, Gonçalves SM, Martines EG, Nakao LS, Riella MC, Aita CA, et al. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 2009;111:c117-26.
7. Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion

- molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol* 2005;16 Suppl 1:S83-8.
8. Yuksel A, Kebapçilar L, Erdur E, Bozkaya G, Sari I, Alacacioglu A, et al. The Effect of iron treatment on adhesion molecules in patients with iron deficiency anemia. *Biol Trace Elem Res* 2010;137:317-23.
9. Agarwal R. Proinflammatory effects of iron sucrose in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006;69:1259-63.
10. Kamanna VS, Ganji SH, Shelkovnikov S, Norris K, Vaziri ND. Iron sucrose promotes endothelial injury and dysfunction and monocyte adhesion/infiltration. *Am J Nephrol* 2012;35:114-9.
11. Jairam A, Das R, Aggarwal PK, Kohli HS, Gupta KL, Sakhuja V, et al. Iron status, inflammation and hepcidin in ESRD patients: The confounding role of intravenous iron therapy. *Indian J Nephrol* 2010;20:125-31.
12. Malindretos P, Sarafidis PA, Rudenco I, Raptis V, Makedou K, Makedou A, et al. Slow intravenous iron administration does not aggravate oxidative stress and inflammatory biomarkers during hemodialysis: a comparative study between iron sucrose and iron dextran. *Am J Nephrol* 2007;27:572-9.
13. Borawski J, Gozdziakiewicz J, Abramowicz P, Naumnik B, Mysliwiec M. Endothelial injury markers with high-dose intravenous iron therapy in renal failure. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:403-6.
14. Kumbasar A, Gursu M, Kaya C, Ozturk S, Ergen A, Kemik A, et al. The effect of different doses and types of intravenous iron on oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *J Nephrol* 2012;25(5):825-32.
15. Bolaños L, González-Juanatey C, Testa A, Ranero R. Intravenous iron sucrose does not impair sonographic brachial vasodilation in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2008;24:90-5.
16. Ozkurt S, Ozenc F, Degirmenci NA, Temiz G, Musmul A, Sahin G, et al. Acute and subacute effects of EV iron sucrose on endothelial functions in hemodialysis patients. *Ren Fail* 2012;34:1-6.
17. Martin-Malo A, Merino A, Carracedo J, Alvarez-Lara MA, Ojeda R, Soriano S, et al. Effects of intravenous iron on mononuclear cells during the haemodialysis session. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:2465-71.
18. Sonnweber T, Theurl I, Seifert M, Schroll A, Eder S, Mayer G, et al. Impact of iron treatment on immune effector function and cellular iron status of circulating monocytes in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:977-87.
19. Toblli JE, Cao G, Olivieri L, Angerosa M. Comparison of the renal, cardiovascular and hepatic toxicity data of original intravenous iron compounds. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:3631-40.
20. Barton Pai A, Conner TA. Oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease: role of intravenous iron and vitamin D. *J Pharmacy Practice* 2008;21:214-24.
21. De Vecchi A, Novembrino C, Lonati S, Hipólito S, Bamonti F. Two different modalities of iron gluconate i.v. administration: effects on iron, oxidative and inflammatory status in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1709-13.
22. Toblli JE, Cao G, Oliveri L, Angerosa M. Assessment of the extent of oxidative stress induced by intravenous ferumoxytol, ferric carboxymaltose, iron sucrose and iron dextran in a nonclinical model. *Arzneimittelforschung* 2011;61:399-410.

23. Funk F, Ryle P, Canclini C, Neiser S, Geisser P. The new generation of intravenous iron: chemistry, pharmacology, and toxicology of ferric carboxymaltose. *Arzneimittelforschung* 2010;60:345-53.
24. Sood MM, Oudit G, Mohammadi H, Huang H, Lok CE. Effects of parenteral iron on inflammation and the myocardium in hemodialysis patients. *Hemodial Int* 2008;12:362-8.
25. Aslan M, Kosecik M, Horoz M, Selek S, Celik H, Erel O. Assessment of paraoxonase and arylesterase activities in patients with iron deficiency anemia. *Atherosclerosis* 2007;191:397-402.
26. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138:419-20.
27. Shen L, Lu G, Dong N, Jiang L, Ma Z, Ruan C. Von Willebrand factor, ADAMTS13 activity, TNF- $\alpha$  and their relationships in patients with chronic kidney disease. *Exp Ther Med* 2012;3:530-4.
28. Ozkok A, Elcioglu OC, Cukadar T, Bakan A, Sasak G, Atilgan KG, et al. Low serum pancreatic enzyme levels predict mortality and are associated with malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome in patients with chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol* 2012 Aug 2. [Epub ahead of print].
29. Yadav AK, Lal A, Jha V. Cytotoxic CD4CD28(null) T Lymphocytes, Systemic Inflammation and Atherosclerotic Risk in Patients with Chronic Kidney Disease. *Nephron Clin Pract* 2012;120:c185-c193.
30. Kourea K, Parissis JT, Framakis D, Panou F, Paraskevidis I, Venetsanou K, et al. Effects of darbepoetin-alpha on plasma pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokine interleukin-10 and soluble Fas/Fas ligand system in anemic patients with chronic heart failure. *Atherosclerosis* 2008;199:215-21.
31. Weiss G, Meusburger E, Radacher G, Garimorth K, Neyer U, Mayer G. Effect of iron treatment on circulating cytokine levels in ESRD patients receiving recombinant human erythropoietin. *Kidney Int* 2003;64:572-8.
32. Wong BW, Meredith A, Lin D, McManus BM. The biological role of inflammation in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 2012;28:631-41.
33. Hot A, Lavocat F, Lenief V, Miossec P. Simvastatin inhibits the pro-inflammatory and pro-thrombotic effects of IL-17 and TNF- $\alpha$  on endothelial cells. *Ann Rheum Dis* 2012 Aug 21. [Epub ahead of print].
34. Brili S, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Antoniadis C, Htazis G, Bakogiannis C, et al. Effects of atorvastatin on endothelial function and the expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in young subjects with successfully repaired coarctation of aorta. *Heart* 2012;98:325-9.
35. Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neeffjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TN, et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 1992;77:543-9.
36. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* 2002;252:283-94.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DE L'ESTRÈS OXIDATIU I DEL PERFIL METABÒLIC DE MALALTS RENALS CRÒNICS  
NO DIALITZATS I DIALITZATS  
Mónica Muñoz Cortés



©2014 Dustri-Verlag Dr. K. Feistle  
ISSN 0301-0430

DOI 10.5414/CN108166  
e-pub: April 2, 2014

## Oxidative stress markers in predicting response to treatment with ferric carboxymaltose in non-dialysis chronic kidney disease patients

Mercedes Prats<sup>1</sup>, Ramon Font<sup>1</sup>, Carmen García<sup>1</sup>, Mònica Muñoz-Cortés<sup>2</sup>, Carmen Cabré<sup>1</sup>, Manel Jariod<sup>3</sup>, Marta Romeu<sup>2</sup>, Montserrat Giralt<sup>2</sup>, and Alberto Martínez-Vea<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nephrology Service, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, <sup>2</sup>Pharmacology Unit, Department of Basic Health Sciences, Universitat Rovira i Virgili, and <sup>3</sup>Information Systems, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain

### Key words

ferric carboxymaltose  
– iron deficiency anemia  
– response predictors –  
chronic kidney disease  
– oxidative stress

**Abstract. Background:** Nearly half of all non-dialysis chronic kidney disease (CKD) patients respond to iron therapy. Factors affecting anemia response to iron therapy are not well characterized. Oxidative stress (OS) is a recognized factor for anemia in CKD and promotes erythropoiesis stimulating agent (ESA) resistance; however, the influence in predicting response to intravenous (IV) iron has not been evaluated. **Methods:** Patients (n = 47) with non-dialysis CKD stages 3 – 5 (mean eGFR:  $26 \pm 10.4$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) and iron-deficiency anemia (hemoglobin < 11 g/dL, transferrin saturation (TSAT) index < 20%, and/or ferritin < 100 ng/mL) received a single injection of 1,000 mg of ferric carboxymaltose (FCM) and were observed for 12 weeks. Based on erythropoietic response (defined as  $\geq 1$  g/dL increase in hemoglobin level), patients were classified as responders or non-responders. Baseline conventional markers of iron status (TSAT and ferritin), inflammatory markers (C-reactive protein and IL-6), OS markers (oxidized LDL, protein carbonyl groups, erythrocyte superoxide dismutase, and glutathione peroxidase (GPx)), and catalase activity were measured. **Results:** FCM resulted in a significant increase in hemoglobin, TSAT, and ferritin ( $10 \pm 0.7$  vs.  $11.4 \pm 1.3$  g/dL,  $p < 0.0001$ ;  $14.6 \pm 6.4\%$  vs.  $28.9 \pm 10\%$ ,  $p < 0.0001$ ;  $67.8 \pm 61.7$  vs.  $502.5 \pm 263.3$  ng/dL,  $p < 0.0001$ , respectively). Responders and non-responders were 34 (72%) and 13 (28%), respectively. Age, baseline hemoglobin, estimated glomerular filtration rate, parathyroid hormone, and use of ESA or angiotensin-modulating agents were similar in both groups. Responders showed a tendency towards lower TSAT than non-responders ( $13.6 \pm 6.5\%$  vs.  $17.2 \pm 5.6\%$ ,  $p = 0.06$ ) but similar ferritin levels. Inflammatory markers were similar in both groups. eGPx activity was lower in non-responders compared to responders ( $103.1 \pm 50.9$  vs.  $144.9 \pm 63.1$  U/g

Hb,  $p = 0.01$ , respectively), although the other proteins, lipid oxidation markers, and enzymatic antioxidants did not differ between the two groups. In the multivariate adjusted model, odds (95% CI) for achieving erythropoietic response to FCM were 10.53 (1.25 – 88.16) in the third tertile of eGPx activity and 3.20 (0.56 – 18.0) in the second tertile compared to those in the lowest tertiles ( $p = 0.02$ ). **Conclusions:** Decreased eGPx activity has adverse influences on response to FCM, suggesting that impaired erythrocyte antioxidant defense may be involved in the response to iron therapy in CKD patients.

### Introduction

Between 50% and 75% of patients with chronic kidney disease (CKD) have iron deficiency [1] and treatment with intravenous (IV) iron is standard practice in this patient population [2]. However, only half the numbers of pre-dialysis CKD patients respond to this treatment [3]. The conventional tests to assess iron status and to predict response to treatment are transferrin saturation (TSAT) index and ferritin levels. In general, TSAT would be the better predictor of response than ferritin [4]. Nevertheless, none of these tests can predict the grade of response with any great precision because these markers are affected by the presence of inflammation, malnutrition, and infection, which are presented in CKD [4, 5, 6]. As such, a third of patients with CKD respond to iron treatment in the presence of iron-replete stores as assessed by bone marrow parameters of iron status [3]. In the DRIVE study, administra-

Received  
August 7, 2013;  
accepted in revised form  
January 30, 2014

Correspondence to  
Alberto Martínez-Vea,  
MD  
Servicio de Nefrología,  
Hospital Universitari de  
Tarragona Joan XXIII,  
Carrer del Doctor  
Mallafra Guasch 4,  
43007 Tarragona, Spain  
amartinezv.hj23.ics@  
gencat.cat

tion of IV ferric gluconate was more effective in improving hemoglobin levels in a group of patients with CKD on hemodialysis, ferritin levels  $> 500$  ng/mL, and TSAT  $\leq 25\%$  than in patients who were not treated with iron [7]. Administration of IV iron in pre-dialysis patients with CKD, or in hemodialysis patients, is associated with an increase in the liver concentration of iron that is not related to the conventional markers of iron status [8].

Other tests used, such as hemoglobin content of the reticulocytes and percentage of hypochromic red cells, can have a higher predictive value in response to IV iron than classical markers [9].

The factors that can affect the response of anemia to treatment with IV iron in CKD are not well defined. One of these factors could be oxidative stress (OS). There is high OS in patients with CKD, which is observed as an increase in markers of protein oxidation and lipid peroxidation and by a decrease in antioxidant systems [10, 11, 12]. Further, anemia from iron deficiency is associated with an increase in OS and a decrease in the antioxidant capacity of red blood cells (RBC) [13, 14]. OS aggravates anemia in CKD by direct lesion of DNA of the cellular erythrocyte precursors [15], diminishing the bioactivity of erythropoietin [16] and provoking lipid peroxidation in RBC via neutrophil-generated superoxide anions [17]. Finally, OS promotes resistance to erythropoietin-stimulating agents (ESA) via lipid peroxidation of RBC membranes, with depletion of adenosine triphosphate generation by interference of mitochondrial function [18]. The pro-oxidative state would favor the "downregulation" of the generation of hypoxia-inducible factor, which contributes to the reduction of erythropoietin synthesis and the production of RBC [19]. It is not known whether the basal oxidative state characteristic of CKD could have an influence on the response to treatment with IV iron in patients with anemia due to iron deficiency and CKD.

The objective of the present study was to assess whether OS could be implicated in the response to treatment with ferric carboxymaltose (FCM) in pre-dialysis patients with CKD. FCM is a macromolecular complex of ferric hydroxide core, stabilized by a carbohydrate shell (carboxymaltose) allowing controlled delivery of iron into target

tissues [20]. In pre-dialysis CKD patients and in patients undergoing hemodialysis, FCM is effective and well tolerated and is associated with few adverse events [21, 22, 23].

## Material and methods

---

### *Patients*

---

Non-dialysis CKD patients ( $n = 50$ ) were selected from those attending Nephrology Service of the Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII over a 1 year period. The inclusion criteria were:  $\geq 18$  years of age with an estimated glomerular filtration rate (eGFR)  $< 60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, serum hemoglobin  $< 11$  g/dL, and either serum ferritin  $< 100$  ng/dL or TSAT  $< 20\%$ . Exclusion criteria included: oral or IV iron treatment or blood transfusion during the previous 3 months, active infection or bleeding, anticipated dialysis in the next 3 months, and known hypersensitivity to other IV iron preparations.

Of the 50 patients, 2 were withdrawn during the study because of bleeding, and 1 patient was excluded due to non-adherence to the study protocol. Thus, 47 patients were included in the final analysis.

The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII, and written, informed consent was obtained from each participant.

### *Study design*

---

The design was an open-label, single-arm study in which all patients received a single dose of FCM (Ferinject®, Vifor Pharma, Villars-sur-Glâne, Switzerland) of 15 mg/kg body-weight (maximum dose of 1,000 mg), diluted in 250 mL physiological saline over 30 minutes. The patients were observed for 12 weeks.

Depending on the erythropoietic response, defined as an increase of  $\geq 1$  g/dL of the hemoglobin levels above that of baseline at any time during follow-up, the patients were classified as responders or non-responders.

### *Clinical and demographic variables*

With the objective of assessing possible factors, which can be implicated in the response to FCM treatment, the following factors were determined: body mass index (BMI), primary renal disease, CKD stage, presence or absence of diabetes mellitus, use of angiotensin-modifying agents, and use of ESA. The doses of ESA were kept unchanged throughout the study.

### *Biochemical determinations*

Levels of hemoglobin, TSAT, and ferritin were determined by conventional methods at baseline, at 3 and at 12 weeks follow-up. The levels of creatinine and serum albumin were measured at baseline, and the eGFR was calculated using the abbreviated formula of Modification of Diet in Renal Disease [24]. The serum levels of parathyroid hormone (PTH) were measured using chemiluminescence (DPC Laboratories, Miami, FL, USA) and 25-hydroxyvitamin D by chemiluminescence (Diasorin, Saluggia, Italy).

### *Inflammation markers*

The plasma levels of interleukin-6 (IL-6) were measured using Human IL-6 Quantine High Sensitivity commercial kit (R&D Systems, Lille, France), and those of high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) were measured with the N High Sensitivity CRP kit (Dade-Behring, Newark, NJ, USA). Patients with inflammation were defined as having IL-6 and/or CRP values  $\geq$  laboratory median.

### *OS markers*

Protein carbonization was determined using the method described by Levine et al. [25] with modifications introduced by Coto-Montes and Hardeland [26]. Lipid damage was determined by quantifying oxidized low-density lipoprotein using an ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Superoxide dismutase measured by Misra and Fridovich's method [27] is based on auto-oxidation of epinephrine. Catalase measured by the Cohen et al. method [28] is based on deter-

mining the rate of hydrogen peroxide breakdown. Using the Wheeler et al. method [29], glutathione peroxidase (GPx) measured the consumption of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by the reduction in tert-butyl hydroperoxide.

### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using SPSS/PC version 15 (IMC, Chicago, IL, USA). Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Student t-test (paired or unpaired), Mann-Whitney U-test,  $\chi^2$ -test, or Wilcoxon test were used as appropriate to compare groups.

Mean levels of hemoglobin, transferrin saturation, and ferritin were compared between time-points using the repeated measures of ANOVA.

Multivariate logistic regression analyses, using a backward elimination method, and incorporating variables associated with response to ferric carboxymaltose, such as ferritin, TSAT, and eGPx, was constructed to determine independent predictors of iron responsiveness. p-values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## **Results**

### *Study population*

The mean age of the study population was 72 years (range 39 – 89). Vascular and diabetic nephropathy were the most frequent causes of CKD. The levels of creatinine and eGFR were 2.5 mg/dL (SD: 0.9 mg/dL) and 26.1 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> (SD: 0.4 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>), respectively. The majority of patients (68%) had CKD stage 3 or 4. The presence of inflammation was elevated (68%), and 87% of patients had calcidiol deficiency. The mean cumulative dose of FCM was 971.7 mg (SD: 69.3 mg), and no adverse effects associated with FCM infusion were observed.

### *Effect of FCM on iron-deficiency anemia*

Changes in hemoglobin levels and the markers of iron status before and after ad-

Table 1. Effect of FCM on iron-deficiency anemia.

| Variable                | Baseline Mean (SD) | Week 3 Mean (SD) | Week 12 Mean (SD) | p        |
|-------------------------|--------------------|------------------|-------------------|----------|
| <b>Hemoglobin, g/dL</b> |                    |                  |                   |          |
| Overall group           | 10 (0.7)           | 10.8 (0.8)       | 11.4 (1.3)        | < 0.0001 |
| Responders              | 10 (0.75)          | 11 (0.8)         | 11.9 (1)          | < 0.001  |
| Non-responders          | 10.1 (0.6)         | 10.2 (0.8)       | 10.2 (1.2)        | NS       |
| <b>TSAT, %</b>          |                    |                  |                   |          |
| Overall group           | 14.6 (6.4)         | 28.9 (10)        | 25.6 (12.7)       | < 0.0001 |
| Responders              | 13.6 (6.5)         | 27 (9)           | 27 (13.5)         | < 0.001  |
| Non-responders          | 17.2 (5.6)         | 33.8 (11.1)      | 22.2 (10.1)       | 0.001    |
| <b>Ferritin, ng/mL</b>  |                    |                  |                   |          |
| Overall group           | 67.8 (61.7)        | 502.5 (262.3)    | 230 (144.6)       | < 0.0001 |
| Responders              | 60 (57.7)          | 491.3 (268.3)    | 219.1 (134.8)     | < 0.001  |
| Non-responders          | 88.3 (69.2)        | 531.6 (257.9)    | 258.0 (170.5)     | < 0.001  |

TSAT = transferrin saturation index.

ministration of FCM are summarized in Table 1. The levels of hemoglobin, TSAT, and ferritin increased significantly and remained elevated to the end of study. There were 34 (72%) responders and 13 (28%) non-responders. There were no significant differences in the increase of ferritin levels or in TSAT between the two groups.

### Responders vs. non-responders

Age, gender, BMI, eGFR, stage and etiology of CKD, use of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEi) and/or angiotensin receptor blockers (ARB), and ESA were similar in both groups. The responders showed a tendency towards a lower TSAT than non-responders ( $p = 0.06$ ) but with similar baseline levels of hemoglobin and ferritin (Table 2).

The levels of PTH and calcidiol were similar in the two groups. Serum albumin, levels of IL-6 and hs-CRP, and the number of patients with inflammation were not different between the two groups.

The responders had higher baseline levels of GPx than non-responders: 144.9 (SD: 63.1) vs. 103.1 U/gHb (SD: 50.9), respectively ( $p = 0.01$ ). There were no significant differences between the two groups with respect to the other antioxidant systems, the markers of protein damage, and lipid peroxidation.

In the adjusted multivariate analysis, only levels of GPx were independent predictors of response to FCM treatment (Table 3). The odds ratio was 10.53 (95% CI: 1.25 – 88.10)

in the third tertile of GPx activity and 3.20 (95% CI: 0.50 – 18.0) in the second tertile compared to the lowest tertile ( $p = 0.02$ ).

## **Discussion**

The results of our study demonstrate that: 1) three-quarters of patients with CKD and ferropenic anemia respond to treatment with FCM; 2) conventional markers of iron status are not predictors of response to FCM; 3) decrease in baseline activity of erythrocytic GPx, a marker of antioxidant activity of RBC, could contribute to the lack of response to treatment with FCM in this patient population.

### FCM and hemoglobin response

Of the patients treated, 72% responded to a single dose of FCM. The criterion used as erythropoietic response in our study was an increase of  $\geq 1$  g/dL in hemoglobin levels. This criterion has been used in the majority of studies that analyzed the response to treatment with IV iron [3, 21, 22, 23], and it is a useful predictive test recommended by KDOQI in cases of discordant iron indices [30]. The grade of response to FCM in our study was higher than that reported for other injectable iron preparations, which varied between 39 and 68% [3, 31, 32, 33, 34], and similar to that obtained in other studies with pre-dialysis patients with CKD or patients on hemodialysis treated with FCM, albeit at

Table 2. Characteristics of patients segregated with respect to response of FCM.

| Variable   | Overall         | Responders      | Non-responders       | p*   |
|--|-----------------|-----------------|----------------------|------|
| Age (years)  | 72.2 (11.6)     | 73.6 (10)       | 69 (15.4)            | NS   |
| Male gender (%)  | 48.9            | 50              | 46                   | NS   |
| Primary renal disease (%)                              |                 |                 |                      | NS   |
| Vascular nephropathy                                   | 49              | 52.9            | 38.4                 |      |
| Glomerulonephritis                                     | 4               | 2.9             | 7.6                  |      |
| Interstitial nephropathy/<br>polycystic kidney disease | 6               | 5.8             | 7.6                  |      |
| Diabetes   | 26              | 26.4            | 23                   |      |
| Unknown  | 15              | 11.7            | 23                   |      |
| CKD stage (%)  |                 |                 |                      | NS   |
| Stage 3  | 28              | 26              | 31                   |      |
| Stage 4  | 57              | 56              | 61                   |      |
| Stage 5  | 15              | 18              | 8                    |      |
| Serum creatinine, mg/dL                                | 2.5 (0.9)       | 2.5 (0.8)       | 2.5 (1.2)            | NS   |
| eGFR, mL/min   | 26.1 (10.4)     | 25.3 (9.6)      | 28.3 (12.4)          | NS   |
| Diabetes mellitus (%)                                  | 40.4            | 47              | 23                   | NS   |
| Use of ACE <sub>i</sub> and/or ARB (%)                 | 59.6            | 53              | 77                   | NS   |
| Use of ESA (%)   | 48.9            | 47              | 54                   | NS   |
| FCM dose (mg)  | 971.7 (69.3)    | 967.2 (76.6)    | 983.4 (45.7)         | NS   |
| Hemoglobin, g/dL                                       | 10 (0.7)        | 10 (0.7)        | 10.1 (0.6)           | NS   |
| TSAT (%)   | 14.6 (6.4)      | 13.6 (6.5)      | 17.2 (5.6)           | NS   |
| Serum ferritin, ng/mL                                  | 67.8 (61.7)     | 60 (57.7)       | 88.3 (69.2)          | NS   |
| Serum albumin, g/dL                                    | 4.1 (0.3)       | 4.1 (0.3)       | 4.2 (0.2)            | NS   |
| PTH, pg/mL   | 161.4 (128.6)   | 181.2 (139.9)   | 109.6 (74.9)         | NS   |
| 25-hydroxyvitamin D, ng/mL                             | 12.8 (6.6)      | 13.7 (7.1)      | 10.7 (5.2)           | NS   |
| CRP, mg/L  | 8.56 (12.4)     | 8.8 (13.5)      | 8.1 (9.6)            | NS   |
| IL-6, pg/mL  | 4.7 (4.7)       | 4.5 (4.7)       | 5.3 (5.2)            | NS   |
| Patients with inflammation (%)                         | 68              | 68              | 75                   | NS   |
| OS markers   |                 |                 |                      |      |
| Ox-LDL, U/L  | 31.3 (15.6)     | 31.2 (13.2)     | 31.9 (21.4)          | NS   |
| Carbonyl groups, nmol/mg prot.                         | 3.3 (1.7)       | 3.4 (1.9)       | 3 (1.4)              | NS   |
| eSODE, U/g/Hb  | 1,871.7 (733.2) | 1,711.6 (5,319) | 2,228.5<br>(1,032.5) | NS   |
| eGPx, U/g Hb   | 131.4 (62.7)    | 144.9 (63.1)    | 103.1(50.9)          | 0.01 |
| eCAT, mmol/min/gHb                                     | 176.1 (39.9)    | 176.6 (41.3)    | 173(38.3)            | NS   |

\*Responders vs. non-responders. CKD = chronic kidney disease; eGFR = estimated glomerular filtration rate; ACE<sub>i</sub> = angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB = angiotensin receptor blockers; ESA = erythropoietin stimulating agents; FCM = ferric carboxymaltose; TSAT = transferrin saturation index; PTH = parathyroid hormone; CRP = C-reactive protein; IL-6 = interleukin 6; ox-LDL = oxidized low-density lipoprotein; eSODE = erythrocyte superoxide dismutase; eGPx = erythrocyte glutathione peroxidase; eCAT = erythrocyte catalase.

Table 3. Multivariate adjusted odds ratios for variables predictive of response to ferric carboxymaltose.

| Baseline variables                             | Odds ratios (95% CI) | p      |
|--|----------------------|--------|
| Tertiles of eGPx (median, range), (U/gHb)      |                      | 0.029* |
| 1 <sup>st</sup> tertile (76.6, 54.4 – 92.4)    | 1 (Reference)        |        |
| 2 <sup>nd</sup> tertile (110.6, 100.8 – 129.8) | 3.20 (0.56 – 18)     |        |
| 3 <sup>rd</sup> tertile (220.1, 134 – 261.8)   | 10.53 (1.25 – 88.16) |        |
| Ferritin, ng/mL                                | 0.99 (0.98 – 1.00)   | 0.24   |
| TSAT, %  | 0.89 (0.78 – 1.01)   | 0.07   |

\*Test for linear trend. Model adjusted for age and gender; eGPx = erythrocyte glutathione peroxidase; TSAT = transferrin saturation index.

higher doses than those used in our patients [21, 22, 23].

The predictors of response to treatment with IV iron in patients with CKD are not well defined. The conventional markers of iron status used in our patients did not have any predictive value with respect to response to treatment with FCM. Although we observed a tendency towards lower levels of TSAT in the responder patients, this marker did not demonstrate an independent predictive value in the treatment response in the multivariate analysis.

In our study we analyzed other factors that have been implicated in resistance to treatment with ESA [35] and which theoretically could be implicated in the response to FCM. The presence of hyperparathyroidism and vitamin D deficiency (as measured by PTH and calcidiol) and the use of ACEi and/or ARB and of ESA were similar in both groups.

The prevalence of inflammation was high in our patients, and similar to that reported in other patients with CKD and anemia [3, 36]. However, the inflammation did not have any significant relationship with the response-to-treatment with FCM. Also, levels of serum albumin, IL-6 and CRP, and the number of patients with inflammation did not differ between the responders and non-responders. Similar results have been reported by Stancu et al. [3] in a group of patients with CKD and anemia treated with iron sucrose, and by Jenq et al. [37] in a small group of patients on hemodialysis treated with ferric chloride hexahydrate.

### *OS and FCM hyporesponsiveness*

The main finding in our study was the association between eGPx and iron responsiveness. The decrease in the antioxidant capacity of RBC (as measured as a decrease in the activity of GPx) was a factor independently predictive of response to FCM treatment. GPx is an important antioxidant enzyme that, using glutathione as a reducing agent [38], protects the erythrocytes from oxidative damage, via reduction of organic peroxides and hydrogen peroxide. A deficiency of GPx implies an increase in free radicals that, in turn, would induce oxidation of the components of RBC and aggravate anemia [39].

It is well documented that iron deficiency anemia is accompanied by an increase in OS of RBC, with an increase in the lipid peroxidation, a decrease in antioxidant capacity, and a greater susceptibility to prooxidant substances [13, 14]. Further, iron deficiency and renal insufficiency accelerate the programmed death of RBC (termed eryptosis) [40]. OS is present in CKD (including the initial stages of the disease) and is manifested by an elevation of the prod-

ucts of lipid and protein oxidation, oxidative damage of DNA, and a deficiency in antioxidant systems [10, 11, 12]. Previous studies in our group [41] and others [42, 43] demonstrated that pre-dialysis patients with CKD, on hemodialysis or on peritoneal dialysis, present with a deficiency in GPx activity. Finally, OS aggravates anemia of patients with renal disease [15, 16, 17] and is a factor that promotes resistance to ESA [18, 19]. As such, it is not surprising that a lower activity of GPx levels could be implicated in the lack of response to treatment with FCM in our patients.

Other antioxidant systems such as catalase were not implicated in the response to FCM treatment in our study and could be explained by the differential expression that GPx and catalase have on hydrogen peroxide generated in RBC membranes. GPx has a high affinity for hydrogen peroxide and reacts with lower concentrations of this free radical than does catalase [44]. Cytoplasmic catalase does not act as an effective scavenger because it does not react with hydrogen peroxide on the surface of the membrane of RBC [13]. Conversely, the enzymes that react with hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide generated in the membranes are GPx and peroxiredoxin 2 [45]. In the case of a reduction in GPx activity, an increase in hydrogen peroxide generated on the surface of the membrane cannot be neutralized by other antioxidant systems and would contribute to oxidation and dysfunction of RBC [13]. Finally, the lack of association between markers of lipid and protein oxidation that we measured in our study in relation to the response to FCM treatment could be due to the difficulty of clinically evaluating OS. Free radicals have a very short biological half-life [46], and the determination of more specific end products of the oxidative process has an elevated intra- and inter-individual variability. Also, the precision of measurement of these markers can vary considerably depending on the type of marker [47]. In a recent study, for example, the measurement of malondialdehyde (a final product generated from lipid peroxidation) did not have a predictive value in the hematological response to treatment with erythropoietin in a group of patients with CKD on hemodialysis [48].

## Study limitations

Our study has some limitations. First, it is a single-center study with a small sample of patients. As such, it may be underpowered in evaluating the role of different factors predictive of response to FCM treatment. Second, the study did not measure other, perhaps more specific, markers of iron status such as hemoglobin content in reticulocytes and percentage of hypochromic RBC. These markers may have greater ability to predict response to IV iron treatment than do classical markers [9].

## Conclusions

The novel finding in our study is that decreased GPx activity has an adverse influence on response to FCM treatment, suggesting that impaired erythrocyte antioxidant defense may be involved in the response to iron therapy in CKD patients.

## Funding

No external funding

## Conflict of interest

None.

## References

- [1] Fishbane S, Pollack S, Feldman HI, Joffe MM. Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988-2004. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4: 57-61. [CrossRef PubMed](#)
- [2] Lankhorst CE, Wish JB. Anemia in renal disease: diagnosis and management. *Blood Rev.* 2010; 24: 39-47. [CrossRef PubMed](#)
- [3] Stancu S, Bârsan L, Stanciu A, Mircescu G. Can the response to iron therapy be predicted in anemic nondialysis patients with chronic kidney disease? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5: 409-416. [CrossRef PubMed](#)
- [4] Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1 (Suppl 1): S4-S8. [CrossRef PubMed](#)
- [5] Kalantar-Zadeh K, Rodriguez RA, Humphreys MH. Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19: 141-149. [CrossRef PubMed](#)
- [6] Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood.* 2003; 101: 4148-4154. [CrossRef PubMed](#)
- [7] Coyne DW, Kapoor T, Suki W, Singh AK, Moran JE, Dahl NV, Rizkala AR; DRIVE Study Group. Ferric gluconate is highly efficacious in anemic hemodialysis patients with high serum ferritin and low transferrin saturation: results of the Dialysis Patients' Response to IV Iron with Elevated Ferritin (DRIVE) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 975-984. [CrossRef PubMed](#)
- [8] Ferrari P, Kulkarni H, Dheda S, Betti S, Harrison C, St Pierre TG, Olynyk JK. Serum iron markers are inadequate for guiding iron repletion in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6: 77-83. [CrossRef PubMed](#)
- [9] Chung M, Moorthy D, Hadar N, Salvi P, Iovin RC, Lau J. Biomarkers for assessing and managing iron deficiency anemia in late-stage chronic kidney disease. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); Comparative Effectiveness Reviews. 2012; 83. p. 17-56.
- [10] Popolo A, Autore G, Pinto A, Marzocco S. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Radic Res.* 2013; 47: 346-356. [CrossRef PubMed](#)
- [11] Kao MP, Ang DS, Pall A, Struthers AD. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J Hum Hypertens.* 2010; 24: 1-8. [CrossRef PubMed](#)
- [12] Romeu M, Nogués R, Marcas L, Sánchez-Martos V, Mulero M, Martínez-Vea A, Mallol J, Giral M. Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with chronic renal failure: a case control study. *BMC Res Notes.* 2010; 3: 20. [CrossRef PubMed](#)
- [13] Nagababu E, Gulyani S, Earley CJ, Cutler RG, Mattson MP, Rifkind JM. Iron-deficiency anaemia enhances red blood cell oxidative stress. *Free Radic Res.* 2008; 42: 824-829. [CrossRef PubMed](#)
- [14] Yoo JH, Maeng HY, Sun YK, Kim YA, Park DW, Park TS, Lee ST, Choi JR. Oxidative status in iron-deficiency anemia. *J Clin Lab Anal.* 2009; 23: 319-323. [CrossRef PubMed](#)
- [15] Umegaki K, Hashimoto M, Yamasaki H, Fujii Y, Yoshimura M, Sugisawa A, Shinozuka K. Docosahexaenoic acid supplementation-increased oxidative damage in bone marrow DNA in aged rats and its relation to antioxidant vitamins. *Free Radic Res.* 2001; 34: 427-435. [CrossRef PubMed](#)
- [16] Uchida E, Morimoto K, Kawasaki N, Izaki Y, Abdu Said A, Hayakawa T. Effect of active oxygen radicals on protein and carbohydrate moieties of recombinant human erythropoietin. *Free Radic Res.* 1997; 27: 311-323. [CrossRef PubMed](#)
- [17] Tonon J, Guarnier FA, Cecchini AL, Cecchini R. Anemia associated with extraerythrocytic oxidative stress damage mediated by neutrophil superoxide anion production in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis. *Pathophysiology.* 2012; 19: 261-268. [CrossRef PubMed](#)
- [18] Gallucci MT, Lubrano R, Meloni C, Morosetti M, Manca di Villahermosa S, Scoppi P, Palombo G, Castello MA, Casciani CU. Red blood cell membrane lipid peroxidation and resistance to erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 1999; 52: 239-245. [PubMed](#)
- [19] Suliman HB, Ali M, Piantadosi CA. Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia. *Blood.* 2004; 104: 43-50. [CrossRef PubMed](#)
- [20] Lyseng-Williamson KA, Keating GM. Ferric carboxymaltose: a review of its use in iron-deficient



- cy anaemia. *Drugs*. 2009; 69: 739-756. [CrossRef PubMed](#)
- [21] Covic A, Mircescu G. The safety and efficacy of intravenous ferric carboxymaltose in anaemic patients undergoing haemodialysis: a multi-centre, open-label, clinical study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25: 2722-2730. [CrossRef PubMed](#)
- [22] Qunibi WY, Martinez C, Smith M, Benjamin J, Mangione A, Roger SD. A randomized controlled trial comparing intravenous ferric carboxymaltose with oral iron for treatment of iron deficiency anaemia of non-dialysis-dependent chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26: 1599-1607. [CrossRef PubMed](#)
- [23] Charytan C, Bernardo MV, Koch TA, Butcher A, Morris D, Bregman DB. Intravenous ferric carboxymaltose versus standard medical care in the treatment of iron deficiency anemia in patients with chronic kidney disease: a randomized, active-controlled, multi-center study. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28: 953-964. [CrossRef PubMed](#)
- [24] Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2006; 145: 247-254. [CrossRef PubMed](#)
- [25] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltil S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 464-478. [CrossRef PubMed](#)
- [26] Coto-Montes A, Hardeland R. Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *J Pineal Res*. 1999; 27: 154-158. [CrossRef PubMed](#)
- [27] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972; 247: 3170-3175. [PubMed](#)
- [28] Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem*. 1970; 34: 30-38. [CrossRef PubMed](#)
- [29] Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem*. 1990; 184: 193-199. [CrossRef PubMed](#)
- [30] KDOQI. KDOQI Clinical Practice Guideline and Clinical Practice Recommendations for anemia in chronic kidney disease: 2007 update of hemoglobin target. *Am J Kidney Dis*. 2007; 50: 471-530. [CrossRef PubMed](#)
- [31] Gotloib L, Silverberg D, Shostak A. Iron deficiency is a very common cause of anemia in chronic kidney insufficiency and can often be corrected with IV iron. *J Nephrol*. 2006; 19: 161-167. [PubMed](#)
- [32] Mircescu G, Gârneata L, Capusa C, Ursea N. Intravenous iron supplementation for the treatment of anaemia in pre-dialyzed chronic renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 120-124. [CrossRef PubMed](#)
- [33] Van Wyck DB, Roppolo M, Martinez CO, Mazey RM, McMurray S; United States Iron Sucrose (Venofer) Clinical Trials Group. A randomized, controlled trial comparing IV iron sucrose to oral iron in anemic patients with nondialysis-dependent CKD. *Kidney Int*. 2005; 68: 2846-2856. [CrossRef PubMed](#)
- [34] Spinowitz BS, Kausz AT, Baptista J, Noble SD, Sothinathan R, Bernardo MV, Brenner L, Pereira BJ. Ferumoxytol for treating iron deficiency anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 1599-1605. [CrossRef PubMed](#)
- [35] Bangbola OF. Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011; 80: 464-474. [CrossRef PubMed](#)
- [36] Chonchol M, Lippi G, Montagnana M, Muggeo M, Targher G. Association of inflammation with anaemia in patients with chronic kidney disease not requiring chronic dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 2879-2883. [CrossRef PubMed](#)
- [37] Jenq CC, Tian YC, Wu HH, Hsu PY, Huang JY, Chen YC, Fang JT, Yang CW. Effectiveness of oral and intravenous iron therapy in haemodialysis patients. *Int J Clin Pract*. 2008; 62: 416-422. [CrossRef PubMed](#)
- [38] Levander OA. A global view of human selenium nutrition. *Annu Rev Nutr*. 1987; 7: 227-250. [CrossRef PubMed](#)
- [39] Waggiallah H, Alzohairy M. The effect of oxidative stress on human red cells glutathione peroxidase, glutathione reductase level, and prevalence of anemia among diabetics. *N Am J Med Sci*. 2011; 3: 344-347. [CrossRef PubMed](#)
- [40] Lang F, Lang E, Föller M. Physiology and pathophysiology of erythropoiesis. *Transfus Med Hemother*. 2012; 39: 308-314. [CrossRef PubMed](#)
- [41] Muñoz-Cortés M, Cabré C, Villa D, Vives JP, Arruche M, Soler J, Compte MT, Aguilera J, Jariod M, Romeu M, Giralt M, Martínez-Vea A. Oxidative stress and other risk factors for white matter lesions in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol*. 2013; 80: 161-167. [CrossRef PubMed](#)
- [42] Kuchta A, Pacanis A, Kortas-Siempak B, Cwiklińska A, Ziętkiewicz M, Renke M, Rutkowski B. Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*. 2011; 34: 12-19. [CrossRef PubMed](#)
- [43] Puchades MJ, Saez G, Muñoz MC, Gonzalez M, Torregrosa I, Juan I, Miguel A. Study of oxidative stress in patients with advanced renal disease and undergoing either hemodialysis or peritoneal dialysis. *Clin Nephrol*. 2013; 80: 177-186. [CrossRef PubMed](#)
- [44] Cohen G, Hochstein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*. 1963; 2: 1420-1428. [CrossRef PubMed](#)
- [45] Low FM, Hampton MB, Peskin AV, Winterbourn CC. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood*. 2007; 109: 2611-2617. [CrossRef PubMed](#)
- [46] Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2012; 17: 311-321. [CrossRef PubMed](#)
- [47] Kato I, Ren J, Heilbrun LK, Djuric Z. Intra- and inter-individual variability in measurement of biomarkers for oxidative damage in vivo: Nutrition and Breast Health Study. *Biomarkers*. 2006; 11: 143-152. [CrossRef PubMed](#)
- [48] Agarwal R, Davis JL, Smith L. Serum albumin is strongly associated with erythropoietin sensitivity in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3: 98-104. [CrossRef PubMed](#)