

DEPARTAMENT DE MEDICINA

ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON  
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA: PREDIÁLISIS,  
HEMODIÁLISIS Y DIÁLISIS PERITONEAL.

M<sup>a</sup> JESÚS PUCHADES MONTESA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 6 de juny de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Juan Francisco Ascaso Gimilio
- Dr. Evaristo Jose Fernández Ruiz
- Dra. Carmina Gómez Roldán
- Dr. Federico Pallardó Calatayud

Va ser dirigida per:  
Dr. Alfonso Miguel Carrasco  
Dr. Guillermo Sáez Tormo

©Copyright: Servei de Publicacions  
M<sup>a</sup> Jesús Puchades Montesa

---

I.S.B.N.: 978-84-370-8517-3

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Arts Gràfiques, 13 baix  
46010 València  
Spain  
Telèfon:(0034)963864115

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN  
PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL  
CRÓNICA: PREDIÁLISIS, HEMODIÁLISIS Y  
DIÁLISIS PERITONEAL.**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> Jesús Puchades Montesa**

**2011**

Dirigida por:

- Dr. Alfonso Miguel Carrasco
- Dr. Guillermo Sáez Tormo

D. GUILLERMO SAEZ TORMO, Doctor en Medicina y Cirugía y  
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia

y

D. ALFONSO MIGUEL CARRASCO, Doctor en Medicina y Cirugía y  
Profesor Titular de Medicina de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Jesús Puchades Montesa, licenciada en Medicina y Cirugía, ha  
realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: “ ESTUDIO DEL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA:  
PREDIÁLISIS, HEMODIÁLISIS Y DIÁLISIS PERITONEAL” y reúne, según  
nuestro criterio, las condiciones necesarias para presentarlo y ser defendido ante la  
Comisión correspondiente para optar al grado de Doctor

Y para que así conste, firmamos la presente en Valencia a 15 de Diciembre  
del año 2010

Fdo: Dr Guillermo Sáez Tormo

Fdo: Dr Alfonso Miguel Carrasco

*A mi madre*

# Agradecimientos

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna u otra forma me apoyaron en la realización de este trabajo, especialmente al Dr. Alfonso Miguel, que me ha enseñado mucho, sobre todo a ser “inasequible al desaliento”, y *que además de ser mi Jefe es, inevitablemente, un amigo. Gracias por creer en mí y por permitirme ser parte de tu equipo.*

Al Dr. Guillermo Sáez, por darme la oportunidad de “meterme” en su laboratorio y aprender tantas cosas, y por supuesto a M<sup>a</sup> Carmen Muñoz Tormos, por su trabajo y dedicación con mis muestras.

A mis compañeros del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico que me prestaron su apoyo en todo momento y a las enfermeras de las Unidades de Hemodiálisis y Diálisis Peritoneal porque me ayudaron con una paciencia infinita en la obtención de las muestras sanguíneas.

A mi familia, mis padres y hermano por haber respetado siempre mis decisiones.

A Miguel por quererme, por saber siempre cómo solucionar mis dudas y no fallar nunca y por encima de todo, a nuestros hijos *Irene y Nacho* que nacieron y han crecido a la vez que esta tesis, ellos me han prestado lo más preciado que tienen: su tiempo. Prometo compensarles.

## *Indice*

	Pagina
1.-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (ERC).....	3
1.1.1.- Concepto y Clasificación.....	3
1.1.2.- Epidemiología. Situación actual en nuestro entorno.....	5
1.1.2.1.- Prevalencia e Incidencia en estadios 1-4.....	5
1.1.2.2.- Prevalencia e Incidencia en estadio 5.....	6
1.1.3.- Etiología. Características de la población.....	6
1.1.4.- Tratamiento renal sustitutivo (TRS).....	7
1.1.4.1.- Hemodiálisis (HD).....	7
- Membranas de diálisis	
- Tratamiento del agua y características del líquido de diálisis	
-Biocompatibilidad del proceso de HD	
-Complicaciones agudas de la HD	
1.1.4.2.- Diálisis Peritoneal (DP).....	13
- La membrana peritoneal	
- Fundamentos teóricos	
- Aspectos técnicos	
- Soluciones de DP	
- Principales complicaciones de la DP	
1.1.5.-Morbi-mortalidad.....	17
1.2.- ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ERC.....	20
1.2.1.- Factores tradicionales de Riesgo Cardiovascular.....	23
1.2.1.1.- Hipertensión arterial.....	23
1.2.1.2.-Diabetes mellitus.....	24
1.2.1.3- Dislipemia.....	25
1.2.1.4.- Obesidad.....	26
1.2.1.5.- Tabaquismo.....	27
1.2.2.- Factores emergentes o vinculados a la Insuficiencia Renal	
.....	28
1.2.2.1.- Anemia.....	28



1.2.2.2.- Alteraciones del metabolismo mineral y óseo asociadas a la ERC.....	29
1.2.2.3.- Síndrome cardiorenal.....	30
1.2.2.4.- Estado inflamatorio.....	32
1.2.2.5.- Disfunción endotelial.....	34
1.2.2.6.- Albuminuria.....	34
1.2.2.7.- Otros.....	35
1.2.2.8.- Estrés oxidativo.....	35
1.3.- ESTRÉS OXIDATIVO Y ATEROGÉNESIS.....	38
1.4.-ESTRÉS OXIDATIVO Y ERC. EVIDENCIAS ACTUALES.....	40
1.5.-ESTRÉS OXIDATIVO. DEFINICIONES Y FUNDAMENTOS...43	
1.5.1.- El inicio: la vida con oxígeno.....	43
1.5.2.-Concepto y características de radical libre.....	44
1.5.3.-Procedencia de las especies reactivas de oxígeno.....	46
1.5.4.-Tipos de especies reactivas de oxígeno.....	54
1.5.5.-Acciones de específicas de especies reactivas de oxígeno.....	62
1.5.6.-Sistema defensivo antioxidante.....	70
2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	91
3.- OBJETIVOS.....	95
3.1.- Principal.....	97
3.2.- Secundarios.....	97
4.-PACIENTES.....	99
4.1.- Reclutamiento de pacientes.....	101
4.2.- Criterios de inclusión.....	101
4.3.- Criterios de exclusión.....	102
5.-METODOLOGÍA.....	103
5.1.- Revisión de Historias Clínicas.....	105

5.2.- Toma de las muestras.....	105
5.3.- Cálculo de la función renal.....	106
5.4.- Procesamiento de las muestras.....	106
5.5.- Metodología de trabajo para la medición de estrés oxidativo.....	107
5.5.1.- Productos derivados de la oxidación molecular.....	108
5.5.1.1.- Determinación de GSH, GSSG y MDA.....	108
5.5.1.2.- Determinación de 8-oxo-deoxiguanosina en ADN nuclear y mitocondrial.....	109
5.5.1.3.-Determinación de proteínas carboniladas.....	111
5.5.1.4.- Determinación de F2-isoprostanos.....	112
5.5.2.- Determinación de actividades enzimáticas .....	113
5.5.2.1.- Determinación de la actividad SuperóxidoDismutasa (SOD).....	113
5.5.2.2.- Determinación de la actividad Catalasa (Cat)...	114
5.5.2.3.- Determinación de la actividad Glutación Peroxidasa (GPx).....	115
5.5.2.4.- Determinación actividad Glutación Reductasa (GSR).....	116
5.6.- Metodología estadística y soporte informático.....	117
 6.- RESULTADOS.....	 119
6.1.- Características generales de la población estudiada.....	121
6.1.1.- Características demográficas.....	121
6.1.2.- Nefropatía causal.....	122
6.1.3.- Prevalencia de factores tradicionales de riesgo. cardiovascular.....	122
6.2.- Análisis bioquímico general.....	125
6.3.- Parámetros inflamatorios.....	129
6.4.- Estudio del estrés oxidativo.....	131
6.4.1.-Parámetros oxidantes.....	131
<i>Peroxidación lipídica</i>	
<i>Oxidación proteica</i>	
<i>Daño oxidativo del material genético</i>	

6.4.2.-Parámetros antioxidantes.....	140
6.5.-Factores clásicos de riesgo cardiovascular y estrés oxidativo.....	146
6.5.1.- Diabetes y estrés oxidativo.....	146
6.5.2.-Cardiopatía isquémica y estrés oxidativo.....	147
6.5.3.-Accidente cerebrovascular y estrés oxidativo.....	147
6.6.- Insuficiencia renal, edad y estrés oxidativo.....	147
6.7.-Tiempo de permanencia en la técnica de diálisis y estrés oxidativo.....	147
6.8.- Función renal y estrés oxidativo.....	148
6.9.-Correlaciones de parámetros oxidativos.....	148
 7.- DISCUSIÓN.....	 149
7.1.- Consideraciones sobre los grupos estudiados.....	151
7.2.- Análisis del estado metabólico.....	152
7.3.- Análisis del estado inflamatorio.....	154
7.4.- Análisis del estrés oxidativo por grupos.....	154
7.4.1.- Grupo prediálisis.....	155
7.4.2.- Grupo Hemodiálisis.....	162
7.4.3.- Grupo Diálisis Peritoneal.....	169
7.5.- Análisis comparativo entre los grupos.....	172
 8.- FORTALEZAS Y DEBILIDADES.....	 175
 9.- CONCLUSIONES .....	 179
 10.- BIBLIOGRAFÍA.....	 183

## ANEXOS

## Abreviaturas

ERC: Enfermedad Renal Crónica  
FG: Filtrado Glomerular  
HD: Hemodiálisis  
DP: Diálisis Peritoneal  
Pre-D: Prediálisis  
TRS: Tratamiento Renal Sustitutivo  
LPS: Lipopolisacáridos  
DPCA: Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria  
DPA: Diálisis Peritoneal Automatizada  
AGEs: Advanced Glycosylation End products  
PRE-DG: Productos de Degradación de la Glucosa  
EROs: Especies Reactivas de Oxígeno  
NADPH: nicotinamidaadeninucleótido reducido  
LDL: Low density lipoprotein  
PTH: Hormonaparatiroidea  
PCR: Proteína C Reactiva  
IL-6: Interleuquina 6  
TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
MPO: mieloperoxidasa  
ADMA: dimetil arginina asimétrica  
HDL: High density lipoprotein  
MDA: Malonildialdehido  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: anión superóxido  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
•OH: radical hidroxilo  
SOD: SuperóxidoDismutasa  
GSH: glutation reducido  
GSSG: glutation oxidado  
GSR: Glutationreductasa  
GPx: Glutationperoxidasa  
PCRas: Proteína C Reactiva de alta sensibilidad

FRR: Función Renal Residual

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

AOPPs: Productos finales de oxidación proteica avanzada

## ***1.- Introducción***



## 1.1.- ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

### 1.1.1.-Concepto y Clasificación

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) se ha convertido en un problema de salud pública. En los últimos años asistimos a un progresivo incremento de su incidencia y prevalencia, así como del número de enfermos que alcanzan su estadio más avanzado y requieren técnicas de sustitución renal. Todo esto ha hecho que sea considerada como una verdadera epidemia<sup>1</sup>.

La ERC se define como una disminución de la función renal, expresada por un filtrado glomerular (FG) o un aclaramiento de creatinina estimado inferior a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, o como la presencia de daño renal (alteración histológica o presencia de marcadores urinarios como albuminuria o proteinuria elevadas, alteraciones en el sedimento urinario o en las pruebas de imagen) durante al menos 3 meses<sup>2</sup>.

La National Kidney Foundation (NKF) Kidney Disease Outcome Quality Initiative (K-DOQI) americana propuso en el año 2002 las guías clínicas para definir y clasificar los estadios de la ERC<sup>2</sup>. Estas guías fueron aceptadas en Noviembre de 2004 y ratificadas en 2006, por la Kidney Disease: Improving Global Outcomes (K/DIGO) con carácter internacional<sup>3,4</sup>**Tabla 1**

Existe un acuerdo general en que la clasificación de la ERC se base en la estimación del filtrado glomerular, como parámetro de medición de la función renal, especialmente en rangos inferiores de FG (< 60 ml/min). Para estadios anteriores parecen más adecuados otros marcadores de “daño” renal (albuminuria, hematuria, alteraciones en pruebas de imagen, etc)<sup>5</sup>. La fórmula más recomendada actualmente para la estimación del FG es la ecuación abreviada del estudio MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)<sup>6</sup> como lo han manifestado la mayoría de las sociedades nefrológicas, entre las que se encuentra la española<sup>7</sup>, la American Heart Association<sup>8</sup> y guías clínicas como las del Joint Nacional Committiee 7 (JNC 7)<sup>9</sup>.



**Tabla 1.-Clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica según las guías K/DOQI 2002 de la National Kidney Foundation.**

Estadio	Descripción	FG (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )
---	Riesgo aumentado de ERC	≥ 60 con factores de riesgo*
1	Daño renal † con FG normal	≥ 90
2	Daño renal † con FG ligeramente disminuido	60-89
3a	FG moderadamente disminuido	59-45
3b		44-30
4	FG gravemente disminuido	15-29
5	Fallo renal	<15
5d		diálisis (HD o DP)
5t		trasplante renal

**Factores de riesgo de ERC:** edad avanzada, historia familiar de ERC, hipertensión arterial, diabetes, reducción de masa renal, bajo peso al nacer, enfermedades autoinmunes y sistémicas, infecciones urinarias, litiasis, enfermedades obstructivas de las vías urinarias bajas, uso de fármacos nefrotóxicos, raza afroamericana y otras minorías en Estados Unidos y bajo nivel educativo o social.

† **Daño Renal:** alteraciones patológicas o marcadores de daño, fundamentalmente una relación proteinuria/albuminuria elevada de forma persistente (índice albúmina/creatinina >30 mg/g aunque se han propuesto cortes sexo-específicos en >17 mg/g en varones y >25 mg/g en mujeres); otros marcadores pueden ser las alteraciones en el sedimento urinario y alteraciones morfológicas en las pruebas de imagen.

## **1.1.2.- Epidemiología. Situación actual en nuestro entorno.**

### **1.1.2.1.- Prevalencia e Incidencia en estadios 1-4**

La mayoría de datos de los que disponemos para evaluar la prevalencia de la ERC provienen de registros de enfermos que reciben tratamiento sustitutivo renal, por tanto, se trata de enfermos que se encuentran en su estadio más avanzado. Conocemos menos de la epidemiología de la enfermedad en sus estadios anteriores, probablemente por la falta de uniformidad a la hora de medir la función renal que existía hasta hace poco tiempo. Por ejemplo, en un estudio realizado por Simai y cols. en un área de Valladolid, calcularon el aclaramiento de creatinina usando cuatro métodos: la concentración de creatinina sérica, el aclaramiento de creatinina usando recogidas de orina de 24 horas, mediante la fórmula de Cockcroft-Gault y aplicando la fórmula MDRD abreviada. La conclusión fue que la prevalencia de los estadios 2 y 3 de ERC estaba influida por el método de cálculo que se utilizara, de manera que la del estadio 3 tenía una prevalencia que oscilaba entre el 3,3 al 8,5% según el método utilizado<sup>10</sup>. Con el fin de estudiar la prevalencia de la ERC en España se inició en 2003 el estudio EPIRCE que además tenía como objetivos secundarios por un lado, estudiar factores asociados a la ERC en nuestra población y por otro evaluar la prevalencia de microalbuminuria-proteinuria. Sus datos, recientemente publicados, han revelado una prevalencia total de ERC en estadios 3-5 del 6.83%, mientras que en el grupo de población por encima de 64 años, llega a ser del 24.42%. Cuando la presencia de albuminuria/creatinuria se añadió a los criterios diagnósticos la prevalencia total era del 9.16%<sup>11</sup>. La prevalencia por estadios fue del 0.99% para estadio 1, 1.3% para el estadio 2; 5.4% para el estadio 3a, 1.1% para el estadio 3b, 0.27% para estadio 4 y 0.03% para estadio 5.

En Estados Unidos el análisis de la tercera edición del estudio NHANES (National Health and Nutricional Examination Survey) puso de manifiesto que la prevalencia de la ERC en población adulta no institucionalizada fue del 11% y estimaba que por cada enfermo en situación de ERC avanzada había 100 individuos en estadios previos<sup>12</sup>.

### **1.1.2.2.- Prevalencia e incidencia en estadio 5d**

En cuanto a los pacientes que reciben tratamiento sustitutivo, disponemos de más datos gracias a los Registros autonómicos y nacional de Enfermos Renales. En 2007 la incidencia en España fue de 125 ppm (pacientes por millón de población) , aunque presentaba una variabilidad acusada según el grupo de edad estudiado, mientras que era de 35 ppm en el grupo de edad de 15-44 años, se superaban los 400 ppm en los grupos de edades superiores a los 75 años. En cuanto a la prevalencia, a 31 de Diciembre de 2007 había un total de 36.588 pacientes en tratamiento sustitutivo lo que suponía una prevalencia total de 1009 ppm. La modalidad de tratamiento de los pacientes prevalentes varía ampliamente según el grupo de edad estudiado, mientras que el grupo de 15 a 44 años más de un 45% de los pacientes estaba trasplantado, en el grupo de mayores de 75 años más del 85% recibían tratamiento con Hemodiálisis (HD). En general la técnica más prevalente considerando todos los grupos de población fue la HD con un 46,13% de prevalencia, mientras que la modalidad de tratamiento menos utilizada fue la Diálisis Peritoneal (DP) con un 6,15 % en total<sup>13</sup>.

Tanto las cifras de incidencia como las de prevalencia de España en 2007 la sitúan en la zona intermedia de los países de nuestro entorno en Europa, en cuanto a riesgo de inicio de tratamiento de la Insuficiencia Renal Crónica Terminal, por encima de los Países Nórdicos, Holanda y Reino Unido y muy por debajo de Grecia, Alemania y Portugal.

### **1.1.3.- Etiología. Características de la población.**

La justificación de estas cifras tan elevadas de prevalencia e incidencia de ERC la encontramos en diferentes causas. Por un lado el envejecimiento de la población, problema especialmente grave en España y en general en Europa, y por otro al alarmante incremento en la incidencia de Diabetes Mellitus tipo 2 y consecuentemente de la nefropatía diabética, así como el incremento de la prevalencia de Hipertensión arterial asociada al envejecimiento y a un insuficiente control de la misma.

Las causas de la ERC en España tienen una distribución similar a la del resto de Europa. En 2007, la Nefropatía Diabética representó la etiología más frecuente (23.6%), seguida de la Enfermedad Vasculare Renal asociada a Hipertensión (14%), aunque en un elevado porcentaje de pacientes (19.3%) la etiología no estaba filiada<sup>13</sup>.

El estudio EPIRCE puso de manifiesto una prevalencia considerable de factores de riesgo cardiovascular clásicos: dislipemia (29.3%), obesidad (26.1%), hipertensión (24.1%), diabetes (9.2%) y tabaquismo activo (25.5%). Los factores predictores independientes de ERC fueron la edad, la obesidad y la hipertensión previamente diagnosticada<sup>11</sup>.

El objetivo principal del estudio ANSWER<sup>14</sup> fue identificar y cuantificar los factores de riesgo de morbi-mortalidad cardiovascular en la población incidente en hemodiálisis en España. Sobre 2341 pacientes que iniciaron HD entre enero de 2003 y Septiembre de 2004, un 87% eran hipertensos, un 44% tenían antecedentes de eventos cardiovasculares, un 36% eran diabéticos, un 11% presentaban signos de desnutrición y un 1% ya había sufrido una paratiroidectomía.

### **1.1.2.- Tratamiento renal sustitutivo (TRS)**

Las tres técnicas de TRS para los pacientes con ERC estadio 5 son actualmente la Hemodiálisis, la Diálisis Peritoneal y el trasplante renal.

#### **1.2.1.- Hemodiálisis.**

Constituye la modalidad terapéutica más ampliamente utilizada en el mundo para el tratamiento de la ERC. La diálisis se basa en procesos de intercambio entre dos compartimentos, la sangre y la solución dializante, gobernados por gradientes de concentración (*difusión*) o de presión hidrostática (*convección*) individualmente o asociados entre sí, por lo que resulta determinante el papel de

la membrana como elemento de separación y de transporte selectivo de solutos<sup>15</sup>.

### ***Membranas de diálisis***

Los requisitos básicos de las membranas de HD se pueden resumir de la siguiente forma:

- Capacidad de extracción del agua plasmática
- Capacidad de extracción de solutos hasta un peso molecular de aproximadamente 50 kD.
- Permeabilidad nula o insignificante a la albúmina y moléculas de dimensiones superiores.
- Biocompatibilidad
- Fiabilidad, resistencia mecánica y reproducibilidad-repetibilidad de las prestaciones durante el tratamiento

El mercado actual ofrece una extensa gama de membranas. Las características físicas y químicas de una membrana de diálisis están determinadas fundamentalmente por la composición del polímero. El modo de esterilización final del dializador, la resistencia frente a los agentes esterilizantes, así como la biocompatibilidad, son características todas ellas influidas por el tipo de polímero. En la actualidad se utilizan dos clases de materiales en la producción de las membranas de diálisis: celulosas y productos sintéticos.

Las membranas de celulosa han debido de sufrir una serie de modificaciones para minimizar la interacción de los grupos nucleofílicos hidróxilo del polímero de celulosa con los sistemas humorales de la sangre como las proteínas del complemento. Se comercializan varios tipos de membranas de acetato de celulosa con distintos grados de sustitución de los radicales hidroxilo, distinta permeabilidad hidráulica y diferencias en el proceso de fabricación.

En cuanto a las membranas sintéticas, su propósito principal es poseer una porosidad elevada a fin de reproducir con mayor fidelidad el proceso de filtración del riñón y eliminar las moléculas de peso molecular medio y las toxinas urémicas de alto peso molecular, respetando siempre la mayor biocompatibilidad. Entre los materiales utilizados para la fabricación de estas membranas se encuentran: Poliacrilonitrilo (entre la que se encuentra la membrana AN69), Polimetilmetacrilato, Polisulfona y Poliamida<sup>15</sup>.

### ***Tratamiento del agua y características del agua y del líquido de diálisis***

El líquido de diálisis es uno de los elementos fundamentales del tratamiento dialítico, tan importante como lo pueda ser el dializador o el propio monitor. La sangre de un paciente en HD se pondrá en contacto con 270 a 600 litros de agua a la semana. Junto a la preocupación de los síndromes agudos causados por los contaminantes presentes en el agua potable: partículas (minerales, coloides), solutos (inorgánicos: iones como sodio, calcio, magnesio zinc, cobre... u orgánicos: endotoxinas, insecticidas, pesticidas), microorganismos (bacterias, hongos, protozoos, virus) o sustancias añadidas por las autoridades sanitarias (cloro, cloraminas, sulfato de aluminio y flúor), se suma el interés por evitar las repercusiones a medio y largo plazo. Actualmente, sabemos que muchos pacientes están expuestos a endotoxinas, las cuales no sólo son responsables de la aparición de las llamadas “reacciones a pirógenos”, sino que además, condicionan una situación inflamatoria crónica que repercute a la larga, en diversos aspectos clínicos de los enfermos<sup>16,17</sup>. El objetivo, por tanto de las plantas de tratamiento de agua de cada unidad de hemodiálisis debe ser conseguir un líquido ultrapuro que contenga sólo agua y sus componentes necesarios, con un grado de pureza similar al exigido en las soluciones empleadas en infusión intravenosa. El tipo de tratamiento va a depender de la calidad del agua suministrada por la red municipal, de la cantidad de agua que es necesario tratar atendiendo al tamaño de la unidad de hemodiálisis y de la pureza que se quiera alcanzar.

Por otro lado la composición del líquido de diálisis, resultado de la mezcla entre un concentrado ácido, una base (generalmente bicarbonato) y el agua obtenida del tratamiento en la planta de agua, debe ser semejante a la del líquido intersticial o extracelular<sup>18</sup>.

### ***Biocompatibilidad del proceso de HD***

Como se ha comentado en este apartado, el procedimiento de la HD supone la utilización de materiales no biológicos de diversa naturaleza que entran en contacto con la sangre del paciente de forma repetida. Esta situación provoca en el organismo una serie de reacciones sistémicas diversas, complejas y sobre todo no deseadas que en su conjunto se denominan “biocompatibilidad”. Los factores que determinan la biocompatibilidad del proceso de hemodiálisis son varios:

- *Composición química de las membranas de diálisis:* las celulósicas como el cuprofán y hemofán, tienen un bajo coste, pero son las menos biocompatibles debido a la presencia de grupos hidroxilo libres, por lo que las modificaciones en éstas van destinadas a sustituir estos grupos por otros con menos capacidad de interacción con los componentes plasmáticos. Las membranas sintéticas se caracterizan por ser más porosas que las celulósicas, poseen una elevada capacidad de adsorción de proteínas y son relativamente hidrófobas. En general son membranas de alta permeabilidad (existen también de baja permeabilidad) y poseen un mejor grado de biocompatibilidad, aunque su coste es algo más elevado.

Las reacciones más importantes como consecuencia de la interacción entre la membrana y la sangre son la activación de la coagulación, la activación del complemento y la activación de las células sanguíneas<sup>19</sup>. Todas las membranas de diálisis activan en mayor o menor grado la vía intrínseca de la coagulación y producen una activación plaquetaria, por lo que la capacidad trombogénica de las membranas se ha utilizado como un índice de biocompatibilidad. Aparte las membranas con cargas eléctricas negativas en su superficie como la AN69, tienen mayor capacidad de activar la vía intrínseca de la coagulación y de generar bradisininas.

Las membranas menos biocompatibles activan la vía alterna del complemento generándose las anafilotoxinas C3a y C5a. Son las membranas celulósicas no sustituidas las que mayor capacidad de activación del complemento y de inducir leucopenia tienen, mientras que las sintéticas como las polisulfonas no inducen leucopenia y provocan sólo ligeros incrementos de C3a cuando se comparan con el cuprofán<sup>20</sup>.

La activación de las células mononucleares provocará la liberación de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) y  $\beta$ 2-microglobulina y la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria, lo que junto con la activación del complemento desempeña un papel destacado en las reacciones de intolerancia a la diálisis, en la inducción de daño tisular y probablemente en la morbi-mortalidad de la diálisis a largo plazo<sup>21</sup>.

*-Permeabilidad de la membrana de diálisis:* las membranas con alta capacidad de transporte convectivo, depuran eficazmente moléculas de mediano peso molecular, a las que se atribuye un papel patogénico en la uremia y entre ellas se incluyen derivados de las purinas como el ácido úrico, xantinas e hipoxantinas,  $\beta$ 2-microglobulina, productos finales de la glicosidación avanzada, endotelina, diversos péptidos y otros. La depuración de estas moléculas con diálisis de alta eficacia y transporte convectivo mejora la respuesta inmune celular de neutrófilos y macrófagos frente a la infección. Sin embargo, aunque la permeabilidad es un factor a considerar, la composición de la membrana parece ser un factor de mayor relevancia<sup>22</sup>.

*- Adsorción de proteínas:* la capacidad de adsorción proteica depende principalmente de la composición y geometría de la membrana y puede oscilar entre 300-2000 mg/m<sup>2</sup> de superficie. La biocompatibilidad de la membrana también está relacionada con la cantidad y el tipo de proteína depositada. El cuprofán no adsorbe  $\beta$ 2-microglobulina, mientras que el AN69 y el polimetilmetacrilato son las membranas con mayor capacidad adsortiva. La capacidad adsortiva de un dializador es un fenómeno positivo cuando se trata de citoquinas,  $\beta$ 2-microglobulina o factores del complemento. Pero en ocasiones la adsorción de proteínas puede ser perjudicial, ya que disminuye el aclaramiento



de moléculas de elevado peso molecular o bien adsorben sustancias beneficiosas como la eritropoyetina (por el AN69)<sup>23,24</sup>.

*-Geometría y proceso de fabricación:* Se ha demostrado mayor nivel de activación leucocitaria y mayor aumento de la agregación plaquetaria cuando se compara cuprofan en placa frente a capilares<sup>25</sup>. Estos datos tienen un limitado interés dado que los dializadores en placa están cada vez más en desuso. Se han encontrado diferencias también entre mismas membranas fabricadas por diferentes marcas, atribuyéndose los cambios a los procesos de fabricación a partir del polímero base.

*-Procedimientos de esterilización:* los dializadores y las líneas de hemodiálisis se esterilizan mediante óxido de etileno, radiación gamma o vapor. Los agentes esterilizantes y los métodos difieren ampliamente en su biocompatibilidad. Las reacciones adversas descritas con los esterilizadores son reacciones anafilactoides, activación del complemento e hipersensibilidad mediada por IgE a los pocos minutos de comenzar la diálisis. Los poliuretanos, utilizados como material adhesivo para anclar los capilares a la carcasa del dializador, tienen una elevada capacidad de atrapar óxido de etileno; si el cebado es insuficiente, el óxido entra en contacto con la sangre provocando la reacción de hipersensibilidad. El vapor de agua evita los problemas que acontecen con el óxido de etileno, sin embargo, muchas membranas no soportan las altas temperaturas y se degradan. La radiación gamma parece también más segura que el óxido de etileno, aunque se ha descrito la liberación de metilenedianilina, sustancia con potencial carcinógeno cuando se pone en contacto con poliuretanos aunque en cantidades muy pequeñas que no suponen riesgo para el paciente<sup>26</sup>.

*- Líquido de diálisis:* participa en la biocompatibilidad de la membrana debido al alcalinizante empleado en su composición, su temperatura y su posible contaminación por bacterias y endotoxinas. Durante la hemodiálisis con membranas de alta permeabilidad se han descrito reacciones febriles sin aislamiento de gérmenes en sangre. Estas reacciones pirógenas se deben a la contaminación del agua de diálisis por endotoxinas bacterianas, un grave

problema en las unidades de diálisis que utilizan membranas de alta permeabilidad por la posibilidad de retrofiltración de sustancias desde el líquido de diálisis a la sangre. Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana de las bacterias gramnegativas, generalmente enterobacterias, que contaminan el agua de diálisis. Estos LPS activan el sistema de complemento generando C5a y bradicininas y provoca una respuesta inflamatoria activando la síntesis y liberación de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) por monocitos<sup>27</sup>.

### ***Complicaciones agudas de la HD***

Aunque pueden clasificarse según el momento donde aparecen entre agudas y crónicas, la separación entre unas y otras es un artificio en gran medida teórico. De hecho, las complicaciones agudas influyen negativamente en la eficiencia y dosis de diálisis y crean un problema de repercusión a medio-largo plazo. Las complicaciones agudas aparecen durante la diálisis o en las horas posteriores a ésta. Se deben a trastornos orgánicos asociados a los intercambios físico-químicos establecidos entre el líquido de diálisis, el dializador y el resto del circuito extracorpóreo, con la sangre del enfermo. Entre las más frecuentes destacan las hipotensiones y otras típicas aunque menos frecuentes: náuseas y vómitos, calambres, cefaleas, reacciones de hipersensibilidad, fiebre, dolor torácico y de espalda, hemorragias, arritmias, síndrome de desequilibrio, embolia aérea, hipoxemia, hemólisis, acidosis-alcalosis metabólica o prurito.

#### **1.4.2.- Diálisis Peritoneal**

##### ***La membrana peritoneal***

El peritoneo constituye la membrana serosa más extensa del organismo. Desde el punto de vista embriológico, el peritoneo deriva del mesénquima, e histológicamente está compuesto por una lámina delgada de tejido conectivo laxo cubierta en su vertiente cavitaria por una capa monocelular de mesotelio. Su principal función es permitir el movimiento de las vísceras abdominales para

reducir su fricción, y facilitar además la llegada a ellas de circulación arterial, venosa y linfática<sup>28</sup>. Precisamente, son la membrana peritoneal, la vascularización peritoneal y el drenaje linfático, las estructuras anatómicas que van a jugar el papel principal en el proceso de la DP.

### ***Fundamentos teóricos***

La técnica de DP consiste básicamente en el uso de una estructura fisiológica, la membrana peritoneal, para realizar el intercambio de solutos que permita una depuración suficientemente eficaz como para poder sustituir la función renal. Para ello se utiliza el espacio virtual de la cavidad peritoneal a la que se introduce a través de un catéter una solución acuosa a la que se añade un agente osmótico (generalmente glucosa) con objeto de crear un gradiente que permita la ultrafiltración efectiva, es decir, no sólo que evite la absorción del líquido instilado, sino que además elimine el líquido retenido por la situación de uremia. Será a través del intercambio periódico de la solución instilada en la cavidad peritoneal como se conseguirá el objetivo de sustitución renal<sup>29</sup>.

Los procesos físicos de los cuales va a depender la DP son tres: los dos principales son la *difusión* según la diferencia de concentraciones de solutos a ambos lados de la membrana peritoneal y la *ultrafiltración* resultante de los gradientes de presión hidrostática y osmótica creados entre la luz capilar, el intersticio y la cavidad peritoneal. El tercer proceso implicado es la *reabsorción linfática* cuya contribución aunque menor no puede ser obviada<sup>30</sup>. El proceso físico de difusión se lleva a cabo gracias a que el peritoneo no es una membrana semipermeable perfecta, y por tanto, permite no sólo el paso de agua sino también de solutos. Por definición el intercambio se produce hacia ambos lados de la membrana según gradiente de concentraciones, lo que condiciona que no sólo se produzca una eliminación de toxinas urémicas como la urea y la creatinina, sino que también se genere un balance positivo de otros solutos cuya concentración es superior en el líquido de diálisis, tales como el agente tampón (lactato o bicarbonato), o la glucosa utilizada como agente osmótico. La facilidad con la que un determinado soluto difunde a través del peritoneo

dependerá no sólo de las concentraciones del mismo a ambos lados de la membrana, sino también de su peso molecular y de las características propias de la membrana, que varían en cada individuo y a lo largo del tiempo de permanencia en la técnica<sup>29,31</sup>. El segundo mecanismo implicado en el proceso de la DP es la ultrafiltración resultante del balance de presiones osmótica e hidrostática a ambos lados del peritoneo. Para conseguir dicha ultrafiltración efectiva se añade al líquido de diálisis un agente osmótico, que puede ser glucosa, icodextrina o incluso aminoácidos. Es importante destacar como el agua resultante de dicha ultrafiltración arrastra desde el plasma a la cavidad peritoneal diversos solutos mediante transporte convectivo, contribuyendo de esta forma a un mayor aclaramiento de moléculas, especialmente las de mediano peso molecular<sup>30</sup>.

### ***Aspectos técnicos***

Para la realización de la técnica de DP se requiere la implantación de un catéter en la cavidad abdominal cuyo segmento distal se aloja preferentemente en un espacio libre de la pelvis. Dicho catéter posee uno o dos manguitos de dacron que tienen como objetivo facilitar la adherencia del catéter a la cavidad abdominal para minimizar la posibilidad de fugas y aislar la cavidad abdominal del exterior para impedir las infecciones. El otro componente indispensable es el sistema a través del cual se infunde y se drena el líquido de diálisis. Dependiendo de si la técnica se realiza de forma manual se habla de Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (DPCA) o de Diálisis Peritoneal Automatizada (DPA) si los intercambios se realizan con la ayuda de un dispositivo automático.

En DPCA el paciente realizará en su domicilio, tras una adecuada enseñanza por personal especializado, y de la forma más estéril, posible entre tres y cuatro intercambios diarios de la solución de diálisis a través del catéter. En la DPA los intercambios del líquido de diálisis se realizan a través de un dispositivo automático denominado “maquina cicladora”, generalmente mientras el paciente duerme por la noche.

## ***Soluciones de diálisis peritoneal***

La diferencia fundamental entre las diferentes soluciones existentes en el mercado se basa en el tampón ácido-base utilizado, sobre todo, en el agente osmótico. El agente tampón utilizado hasta la actualidad por su mayor estabilidad ha sido el lactato, si bien actualmente existen soluciones más biocompatibles (bicarbonato).

El agente osmótico más utilizado en las soluciones de DP es la glucosa a concentración variable de 1,36 mg/dl, 2,27 mg/dl y 3,86 mg/dl, según los requerimientos de ultrafiltración de menor a mayor respectivamente. Estas concentraciones de glucosa no están exentas de efectos secundarios, condicionando al enfermo a hiperglucemia e hiperinsulinemia. Además a nivel local se consideran tóxicas para la célula mesotelial y para los mecanismos de defensa leucocitarios, tanto de forma directa, como a través de la formación y depósito de productos finales de la glicosidación avanzada (AGEs, del inglés Advanced Glycosylation End products)<sup>32</sup>. Además, la esterilización por calor a la que se someten las soluciones de diálisis provoca productos de la degradación de la glucosa (PRE-DG), que contribuyen notablemente a la generación de AGEs, incrementando de esta forma la toxicidad local<sup>32</sup>.

## ***Principales complicaciones de la diálisis peritoneal***

### ***Infeciosas***

*-Peritonitis:* la causa principal es la inoculación de microorganismos a través del catéter de forma inadvertida por una técnica deficiente durante el intercambio (vía intraluminal), o menos frecuentemente que provenga de una infección previa del catéter (vía periluminal) o de la penetración de enterobacterias en la cavidad peritoneal a través de la pared intestinal (vía transluminal).

*-Infección del orificio de salida y/o del túnel subcutáneo.*

No infecciosas

*-Peritonitis esclerosante:* es una de las complicaciones más graves de la técnica de DP, ya que en muchas ocasiones condiciona la muerte del paciente. El cuadro está provocado por una progresiva fibrosis de la membrana peritoneal que llega a rodear y comprimir las asas intestinales<sup>33</sup>.

*-Otras:* malfunción del catéter, derivadas del incremento de presión intraabdominal, fallo de ultrafiltración, hemoperitoneo o quiloperitoneo.

### **1.5.- Morbi-mortalidad**

En cualquiera de los estadios de ERC la principal causa de morbi-mortalidad es la causa cardiovascular seguida de la infecciosa<sup>34</sup>.

La tasa bruta de mortalidad en España de los pacientes con ERC en tratamiento sustitutivo es del 14 % en Hemodiálisis, 8,8% en Diálisis Peritoneal y el 1,7% en los Trasplantados Renales<sup>13</sup>.

En un estudio llevado a cabo en el Registro de Enfermos Renales de la Comunidad Valenciana, en un total de 3648 pacientes se comprobó la influencia de la comorbilidad al inicio del tratamiento sustitutivo y su influencia negativa sobre la supervivencia. En este estudio, donde se comparaba la evolución de los pacientes según la técnica dialítica utilizada (HD o DP) no se encontraron en principio, diferencias en la supervivencia global de ambas poblaciones con una evolución casi idéntica desde el inicio de diálisis hasta los 32 meses, y un mejor comportamiento de la HD a partir de entonces justificado por la pérdida de función renal residual en la DP y el grado de subdiálisis, desnutrición, etc. que esto conllevaría<sup>35</sup>. **Figuras 1 y 2**

**Figura.1.- Supervivencia global en HD y DP**

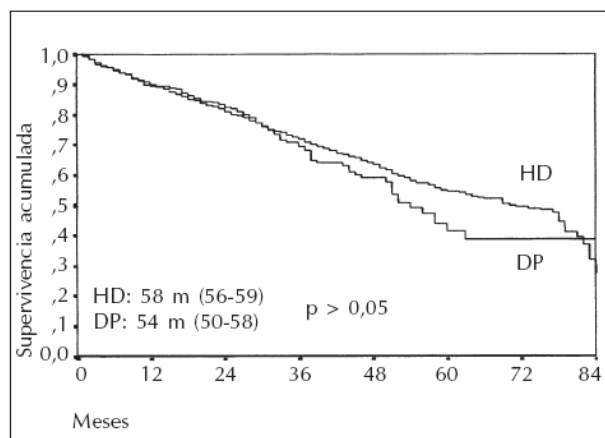
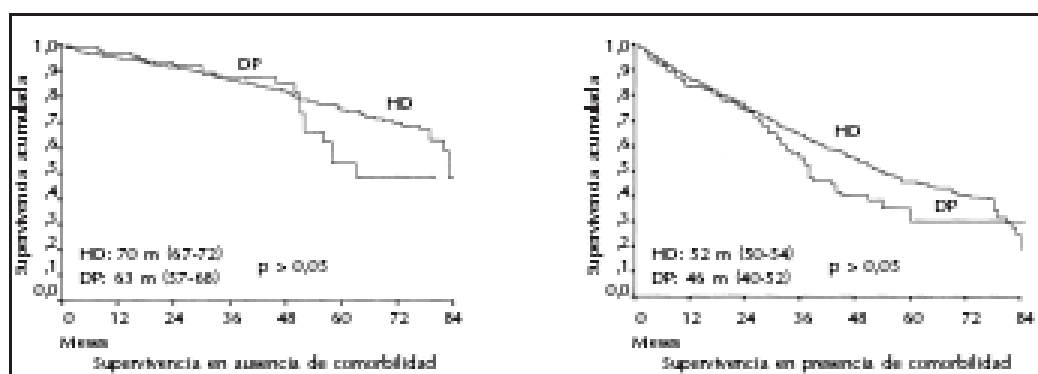


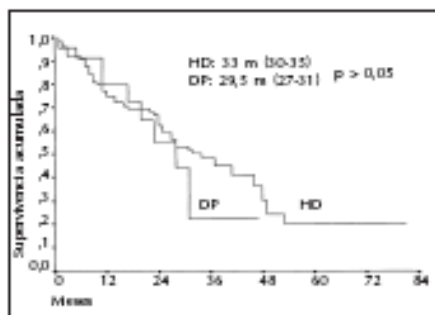
Fig. 3.—Supervivencia global.

**Figura. 2.-. Supervivencia según la presencia de comorbilidad en HD y DP**



Analizados los diferentes factores comórbidos sólo la edad mayor de 70 años determinó diferencias significativas en la supervivencia mientras que respecto a la presencia de diabetes mellitus las poblaciones de ambas técnicas mostraron supervivencias similares. Al analizar los pacientes diabéticos según su edad, se evidenciaron mejores supervivencias en HD para los diabéticos mayores de 70 años con diferencias significativas. **Figura3**

**Figura 3.- Supervivencia en pacientes diabéticos mayores de 70 años en HD y DP**



Los pacientes con ERC terminal consumen una gran cantidad de recursos sanitarios, derivados directamente de su tratamiento e indirectamente de su morbilidad asociada, con una elevada tasa de ingresos hospitalarios, Se ha estimado que el gasto de esta población supone aproximadamente el 2% del presupuesto sanitario nacional.



## 1.2.- ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ERC

El enfermo renal es un paciente extremadamente vulnerable frente a la patología cardiovascular. A pesar de que la prevalencia de los factores de riesgo tradicionales del estudio Framingham es muy alta, la extensión y la severidad de las complicaciones cardiovasculares son claramente desproporcionadas al perfil de riesgo que estos proporcionan. Es por ello, que en las últimas dos décadas ha aumentado el interés en los factores de riesgo no tradicionales o emergentes, como la inflamación, la malnutrición o el estrés oxidativo.

Además, se ha demostrado que la enfermedad renal es un factor de riesgo independiente para la aterosclerosis carotídea, sugiriendo que la insuficiencia renal *per se* acelera el proceso aterosclerótico<sup>36</sup>. En su trabajo, Buzzelo et al sugieren que incluso deterioros ligeros de la función renal son capaces de causar rápidos aumentos de tamaño en las placas arterioscleróticas pre-existentes y su agresividad morfológica en ratones Apo E *knockout*<sup>37</sup>.

La intensidad y la extensión de la enfermedad vascular en la insuficiencia renal son mayores que en otras poblaciones. En la uremia se producen mayor número de placas de ateroma que progresan más rápidamente y se calcifican con más facilidad que en pacientes no renales.

El análisis del estudio *Atherosclerosis Risk in Communities* mostró que los pacientes de edad media con insuficiencia renal moderada tenían un 38% de exceso de riesgo de complicaciones cardiovasculares comparados con sujetos con función renal normal.<sup>38</sup> Estudios como el Canadian Heart Failure Clinic Study como el Digitalis Intervention Group Trial<sup>39,45</sup> mostraron en que pacientes con fallo cardíaco, incluso mínimos descensos del FG se relacionaban con un mayor riesgo de muerte.

El riesgo vascular en los enfermos con ERC tiene importancia incluso desde los estadios iniciales de la enfermedad y sabemos que se trata del principal problema de estos enfermos por encima del problema renal en sí mismo. El

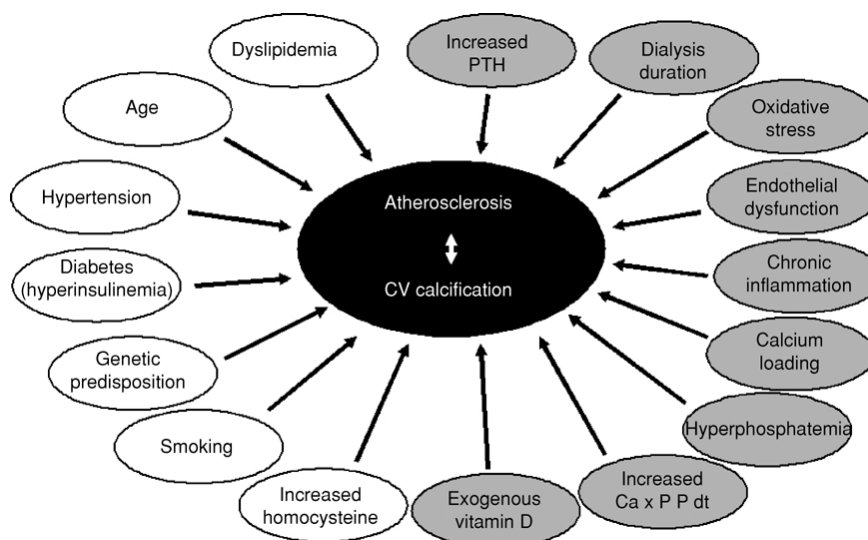
estudio retrospectivo *Kaiser Permanent Center* evaluó el riesgo cardiovascular en pacientes con leves descensos del filtrado glomerular. El seguimiento en años posteriores demostró que sólo un 1% de los pacientes llegarían a fases avanzadas de insuficiencia renal pero sin embargo, entre un 19 a un 24% con enfermedad renal leve-moderada moriría de alguna complicación cardiovascular en los siguientes cinco años<sup>40</sup>.

En las fases avanzadas de ERC el riesgo cardiovascular es alarmante, si bien en edades muy avanzadas, entre 85-95 años supone un riesgo cinco veces mayor respecto a la población sana, en el rango de edad entre 45 a 54 es de 65 veces más y en el grupo de 25 a 35 años llega a ser hasta 500 veces mayor<sup>41</sup>. Visto de otro modo, el riesgo de enfermedad cardiovascular en un enfermo renal crónico de 30 años es similar al riesgo calculado para la población “no-renal” en la década de 70 a 80 años<sup>42</sup>.

La afectación cardiovascular subyacente en el enfermo con ERC incluye varios tipos de lesiones vasculares con sus correspondientes presentaciones clínicas<sup>43</sup>.

La lesión vascular más característica es la **aterosclerosis** que consiste en la presencia de calcificaciones de localización preferente en la capa media junto a hiperplasia intimal. Su patogénesis es multifactorial (figura 4) y su presentación clínica suele caracterizarse por cardiopatía isquémica, muerte súbita y enfermedad cerebrovascular.

**Figura 4.- Enfermedad vascular en la enfermedad renal: factores fidiopatológicos.** De: Charles R Nolan. Phosphate binder therapy for attainment of K/DOQI<sup>tm</sup> bone metabolism guidelines. *Kidney Internat* 2005; 68, S7-S14



Nolan CR. *Kidney Int* 2005

La otra afectación vascular presente es la **arteriosclerosis** caracterizada por un engrosamiento y remodelado de los grandes vasos. El diámetro arterial y el espesor de la pared se ven aumentados como consecuencia del exceso de presión ejercida contra la pared vascular lo que se acompaña de una disminución de la *compliance* arterial, responsable del aumento de la presión arterial sistólica, hipertrofia ventricular izquierda, aumento de la presión de pulso y disminución de la perfusión coronaria. Tanto la disminución de la *compliance* aórtica como el aumento de la presión de pulso han demostrado ser factores de riesgo independientes para la enfermedad cardiovascular en pacientes en diálisis.

Los pacientes con ERC presentan además una alta prevalencia de **cardiomiopatía**. Factores como la hipertrofia ventricular izquierda, la anemia, la sobrecarga hídrica o la presencia de fístulas arterio-venosas pueden derivar en una disfunción sistólica y diastólica. Esta cardiomiopatía conlleva insuficiencia cardíaca y enfermedad isquémica incluso en ausencia de enfermedad coronaria.

### **1.2.1.- Factores Tradicionales de Riesgo Cardiovascular.**

Varios estudios poblacionales han puesto de manifiesto la alta prevalencia de factores de riesgo tradicionales en esta población. Factores como la hipertensión, diabetes, dislipemia o el tabaquismo se consideran de especial importancia en las fases iniciales de insuficiencia renal, sin embargo los factores denominados emergentes o no tradicionales (anemia, elevación producto calcio-fósforo, hiperhomocisteinemia, inflamación...) adquieren mayor relevancia a medida que la función renal empeora.

El estudio MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) sobre 1795 pacientes encontró una relación inversa entre el filtrado glomerular y la hipertensión arterial<sup>44</sup>. En el *Framingham Heart Study* la insuficiencia renal se asoció a diabetes mellitus, hipertensión arterial, obesidad, tabaco y colesterol total.<sup>45</sup> El *Cardiovascular Heart Study*, con 5888 sujetos relacionó la presencia de insuficiencia renal con los sujetos de mayor edad, varones, con mayor presencia de diabetes, hipertensión, tabaquismo y sedentarismo<sup>46</sup>. Establecer el rol que cada factor ejerce sobre el riesgo es una tarea difícil ya que suelen coexistir en un mismo enfermo, compartir mecanismos fisiopatológicos similares y posiblemente interactuar de forma sinérgica.

#### **1.2.1.1.- Hipertensión arterial**

Existe una estrecha relación entre enfermedad renal e hipertensión. Entre un 70 a un 80% de los pacientes con ERC tienen hipertensión y su prevalencia aumenta a medida que el filtrado glomerular disminuye, de hecho incluso cifras leves o moderadas de hipertensión arterial se comportan como un importante riesgo de progresión de la enfermedad renal<sup>47,48</sup>. En el estudio español COPARENAL, realizado con 2501 pacientes con Insuficiencia Renal Crónica, se observó una elevada prevalencia de hipertensión arterial (presión arterial >130/80) ya que estaba presente en el 83% de los pacientes<sup>49</sup>.

La angiotensina II implicada en mecanismos patogénicos responsables de la hipertensión es capaz de actuar como un potente estímulo de enzimas prooxidantes como la NADPH, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y consecuentemente el estrés oxidativo. Las EROs pueden producir vasoconstricción de forma directa o disminuyendo la disponibilidad del óxido nítrico, induciendo también disfunción endotelial<sup>50,51</sup>. Además el descenso, del óxido nítrico y el aumento de las EROs pueden activar otra serie de mecanismos involucrados en la génesis de la aterosclerosis (oxidación de moléculas de LDL-Colesterol, quimiotaxis de monocito-macrófagos y proliferación de células espumosas). La presión sanguínea elevada sobre las células de la pared vascular ejerce un mecanismo mecánico de estiramiento que estimulará también la producción de angiotensina II, de EROs, activación de factores de crecimiento de matriz extracelular colaborando así en el proceso aterosclerótico<sup>52,53,54</sup>.

#### **1.2.1.2.- Diabetes Mellitus**

La Diabetes Mellitus está reconocida como el principal causante y responsable de la progresión de enfermedad renal. Entre un 20 a un 40% de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo II desarrollará nefropatía y muchos de ellos progresarán a la insuficiencia renal terminal<sup>55</sup>. La diabetes mellitus está íntimamente asociada a la enfermedad vascular y varios estudios como el *Copenhagen Heart Study* o el INTERHEART han llevado a considerar a la diabetes como una auténtica enfermedad vascular<sup>56</sup>. La hiperglucemia es un importante factor de riesgo para el desarrollo de micro y macroangiopatía y el estricto control de la glucemia protege de enfermedad vascular<sup>57</sup>. En el riñón, la hiperglucemia estimula de manera directa factores de crecimiento, como angiotensina II y TGF- $\beta$ , en las células tubulares y a nivel glomerular en probable relación con el estrés oxidativo<sup>58</sup>.

La aterosclerosis es la más común de sus complicaciones y presenta un desarrollo temprano y rápido en los pacientes diabéticos, afectando tanto grandes como pequeños vasos<sup>59</sup>. A nivel molecular la hiperglucemia disminuirá la

producción de óxido nítrico y aumentará la producción de EROs, favoreciendo la glicosidación de lipoproteínas con la consiguiente formación de AGES que conducirán a su vez a una mayor inhibición del óxido nítrico, provocando agregación plaquetaria, migración de macrófagos, formación de células espumosas y oxidación de las partículas lipídicas de LDL, todo lo cual favorecerá el desarrollo y la progresión de la aterogénesis, máxime en un ambiente de uremia<sup>60,61,62</sup>.

La relación entre función renal y aterogénesis es por tanto recíproca, ya que la diabetes es un poderoso factor de progresión de la arteriosclerosis y enfermedad renal y por otro lado la insuficiencia renal acelera la progresión de la aterosclerosis en pacientes diabéticos, lo cual la convierte en un factor de riesgo independiente<sup>63</sup>.

### **1.2.1.3.- Dislipemia**

Las anormalidades lipídicas frecuentemente acompañan y agravan la patología renal, favorecen la aterogénesis acelerada y la progresión de la enfermedad cardiovascular<sup>64</sup>.

Ciertas alteraciones enzimáticas presentes en insuficiencia renal, como la reducción de la lipoprotein lipasa y de la lecitina-colesterol acetiltransferasa producen un acúmulo de partículas altamente aterogénicas<sup>65,66,67</sup>.

El patrón de las alteraciones lipídicas puede variar entre las diferentes situaciones de afectación renal, dependiendo especialmente del grado de insuficiencia renal y de la proteinuria.

Los depósitos de lipoproteínas y de células espumosas a nivel del mesangio, sugieren que a dicho nivel tiene lugar la oxidación de las lipoproteínas, las cuales estimularán la inflamación y la producción de citoquinas fibrogénicas, así como la disfunción endotelial con superproducción de endotelina y tromboxano, además de la activación del sistema renina-angiotensina.<sup>68,69,70</sup> Además, estas

lipoproteínas tienen capacidad inmunogénica por lo que se han podido aislar inmunocomplejos LDL oxidadas- Ig anti-LDL oxidadas en pacientes diabéticos con nefropatía diabética, lo que indica que los lípidos pueden contribuir a la progresión de la afectación renal a través del daño mediado por inmunocomplejos<sup>71</sup>. Otros estudios experimentales han demostrado que la hipercolesterolemia inducida por dieta condiciona disfunción endotelial, inflamación y fibrosis intrarrenal, daño vascular, remodelado microvascular, glomeruloesclerosis, estando el estrés oxidativo en el centro de estos efectos<sup>72,73,74,75,76</sup>.

Varios estudios en población general y en pacientes renales han documentado que la dislipemia se correlaciona con el descenso de la función renal, sin embargo, no hay bases suficientes para poder sustentar que la dislipemia es un factor independiente de afectación renal, si bien parece clara la existencia de un sinergismo entre dislipemia, hipertensión arterial y diabetes mellitus para la progresión de la enfermedad renal crónica hacia estadios terminales<sup>77,78,79</sup>.

Las estatinas han demostrado ser eficaces en reducir la mortalidad de origen cardiovascular y global en la población general, sin embargo, el papel de estos fármacos en los pacientes con ERC es todavía controvertido. En un reciente metaanálisis, se ha podido demostrar que si bien reducen las muertes de origen cardiovascular en la población con ERC, su eficacia en reducir las muertes por otras causas y su papel en la prevención primaria debe ser establecido por futuros ensayos clínicos, algunos de los cuales como el SHARP (Study Heart and Renal Protection) y el AURORA (A Study to Evaluate the use of Rosuvastatin on Regular Haemodialysis: an assessment of survival and cardiovascular events.) están en la actualidad en desarrollo<sup>80</sup>.

#### **1.2.1.4.- Obesidad**

La obesidad se ha descrito también como factor de progresión de insuficiencia renal y su correlación con la proteinuria es evidente, estando asociada en los

pacientes en hemodiálisis, con una mayor probabilidad de producir un evento coronario.<sup>81,82,83,84,85</sup>

Varios mecanismos explican cómo la obesidad condiciona hipertensión arterial al incrementar la reabsorción tubular de sodio, desplazando así la curva de presión natriuresis y produciendo expansión de volumen. Por otro lado, la asociación de diabetes y dislipemia con obesidad es un hecho bien demostrado, y todo ello facilita el desarrollo de la arteriosclerosis en estos pacientes obesos y con daño renal<sup>86,87,88,89</sup>.

Además la obesidad es un marcador de síndrome metabólico, cuya prevalencia está aumentando progresivamente y que contribuye al desarrollo de diabetes, hipertensión arterial y enfermedad cardiovascular. Se ha descrito una interesante coincidencia entre obesidad, síndrome metabólico y enfermedad renal, al mismo tiempo que la susceptibilidad de padecer insuficiencia renal aumenta con el número de componentes del síndrome metabólico<sup>87,90,91,92,93,94</sup>.

#### **1.2.1.5.- Tabaquismo**

El tabaco es un factor de riesgo cardiovascular indiscutible con gran poder predictor de aterosclerosis. En los pacientes renales se ha demostrado la relación del tabaco con morbilidad y mortalidad cardiovascular, así como con la progresión de la ERC en pacientes en estadios 2,3 y 4 y en trasplantados renales<sup>95,96,97</sup>. En análisis secundarios de estudios como el Framingham Heart Study, CHS y el ARIC, se ha establecido correlación entre tabaco e insuficiencia renal<sup>45,46,98</sup>. El tabaco favorece la peroxidación lipídica y la activación de factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , y la endotelina, así como el estrés oxidativo. Esto junto a efectos hemodinámicas condicionados por acción vasoconstrictora directa, puede conllevar a la isquemia intrarrenal<sup>99</sup>.



## **1.2.2.- Factores emergentes o vinculados a la Insuficiencia Renal**

A pesar de la alta prevalencia de factores de riesgo tradicionales, siguen siendo incapaces por sí solos de justificar la elevada prevalencia de morbi-mortalidad cardiovascular. Por otro lado, la asociación entre los factores de riesgo tradicionales y el pronóstico cardiovascular en esta población resulta a veces complicada por el llamado fenómeno de “epidemiología inversa”, por el que un excesivo control de estos factores como la dislipemia o la tensión arterial se relaciona con peor pronóstico, por estar asociado a estados de malnutrición o inestabilidad clínica.

### **1.2.2.1.- Anemia**

La anemia es una característica típica de la Insuficiencia Renal que puede aparecer desde estadios intermedios de la misma<sup>100</sup>. De manera llamativa la anemia es un factor condicionante de hipertrofia ventricular izquierda, lo que implica un elevado riesgo de enfermedad coronaria y muerte cardíaca. Aproximadamente el 70% de los pacientes que inician diálisis tienen hipertrofia ventricular izquierda diagnosticada por ecocardiografía, y esta prevalencia aumenta progresivamente con el declinar de la función renal<sup>101,102</sup>. La significativa asociación entre la anemia y la hipertrofia de ventrículo izquierdo en pacientes en fases iniciales de insuficiencia renal y en diálisis sugiere que la anemia está principalmente implicada en el desarrollo de la hipertrofia ventricular.

Se ha demostrado una relación inversa entre los niveles de hematocrito y la morbi-mortalidad cardiovascular en pacientes en prediálisis y en diálisis<sup>103,104</sup>. Además diversos estudios han demostrado que la corrección de la anemia limita la progresión de la enfermedad renal y, en parte, regresa la hipertrofia ventricular izquierda<sup>105</sup>.

Es obligado tratar la anemia cuando se presenta. Un problema relevante lo constituye la resistencia a la eritropoyetina, que afecta aproximadamente a un 30% de los pacientes con ERC. Las causas de resistencia a la eritropoyetina son

diversas, teniendo un papel preponderante el estrés oxidativo y la inflamación, así como la hepcidina, que es un péptido de 25 aminoácidos producido a nivel hepático y que parece ser un auténtico puente de unión entre inflamación y anemia, actuando sobre la ferroprotina, que es un transportador celular del hierro<sup>106,107</sup>

### **1.2.2.2.- Alteraciones del metabolismo mineral y óseo asociadas a la enfermedad renal crónica**

Diferentes estudios epidemiológicos muestran un nexo de unión entre el metabolismo mineral y la mortalidad cardiovascular en pacientes con ERC<sup>108,109</sup>. El aumento progresivo de los niveles de fósforo plasmático en pacientes con ERC se relaciona con un aumento del riesgo de mortalidad de manera que por cada aumento de 1 mg/dl de fósforo aumenta un 23% la mortalidad. La diferencia alcanza significación estadística a partir de 3.5 mg/dl de fósforo sérico independientemente de los factores de riesgo cardiovascular clásicos<sup>110</sup>. El fósforo actúa aumentando la fibrosis cardíaca y el grosor de la pared arterial de las coronarias en ratas urémicas con dietas ricas en fósforo<sup>111</sup>. Niveles de fósforo elevados tienen la capacidad de inducir cambios en la pared vascular por lo que influye directamente en el riesgo cardiovascular<sup>112</sup>.

El hiperparatiroidismo secundario ha sido motivo de estudio también. Marco et al encontraron relación directa del nivel de PTH con el riesgo relativo de muerte cardiovascular. El riesgo es casi cuatro veces superior si los niveles de PTH están por encima de 50 pmol /L (RR= 3.9, el 95% de IC 1.2-12.9)<sup>109</sup>. También en pacientes en HD, Block et al encontraron que el no cumplimiento de los parámetros del metabolismo mineral: calcio, fósforo, producto calcio x fósforo y PTH dentro de los rangos recomendados por las nuevas K/DOQI comporta un aumento del riesgo de mortalidad próximo al 50% respecto que tienen todos los parámetros dentro del rango<sup>113</sup>. La elevación de las cifras de PTH se ha relacionado con un aumento de la rigidez arterial, medida mediante velocidad de la onda del pulso y la presión de pulso, desde estadios precoces de insuficiencia renal. En pacientes en HD se ha demostrado una asociación entre la calcificación

arteriolar y la elevación de la velocidad de la onda de pulso<sup>114</sup> y en enfermedad renal crónica sin diálisis se ha descrito un aumento de la prevalencia de calcificación en estos pacientes<sup>115</sup>. En estadios avanzados de enfermedad renal crónica y en pacientes ancianos el fósforo tendría un papel principal en la rigidez arterial. Niveles de fósforo elevados tienen la capacidad de inducir cambios en la pared vascular que conducen a la calcificación. In vitro se ha demostrado que el fósforo puede producir engrosamiento de la pared arterial por aumento de la fibrosis intersticial<sup>116</sup> y puede actuar sobre la diferenciación de las células de músculo liso vascular a “Osteoblastic-like cells”, favoreciendo el proceso activo de mineralización y calcificación del vaso incluso con cifras de fósforo dentro de la normalidad<sup>112</sup>. Se ha descrito que las calcificaciones vasculares siguen un proceso similar al de la formación del hueso. Es un proceso en gran medida activo. En condiciones normales las células musculares lisas vasculares (CMLV) tienen mínima expresión de proteínas calcificantes (fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, proteína matriz GLA). Cuando se pone en marcha el proceso de calcificación las CMLV expresan Cbfa-1 (core-binding factor a-1) y BMP2 (“bone matrix protein 2”) que actúan como promotores. El Cbfa es el factor de transcripción específico de gen osteoblástico, que regula la expresión de proteínas procalcificantes<sup>117,118</sup>. El siguiente paso es la acumulación de pequeñas vesículas (“matrix vesicles”) y de cuerpos apoptoicos calcificados con alta concentración de calcio y fósforo. Con la liberación de éstos y por efecto de las proteínas procalcificantes comienza la nucleación y acumulación de hidroxiapatita, la misma base estructural de hueso calcificado<sup>118,119,120,121</sup>.

Respecto a la PTH, sólo ha demostrado tener algún efecto *in vitro* acelerando o favoreciendo la calcificación de las CMLV, pero no se ha podido demostrar ninguna asociación directa o independiente a nivel clínico<sup>122</sup>.

### **1.2.2.3.-Síndrome cardiorenal**

Ronco y cols<sup>123</sup> describieron en 2008 las cinco categorías clínicas de un síndrome extraordinariamente frecuente que acontece cuando el fallo agudo o crónico del corazón o del riñón puede causar disfunción del otro órgano. En el

tipo I o síndrome cardiorrenal agudo, un fallo agudo de la función cardíaca desencadena un fracaso renal agudo. En el tipo II o síndrome cardiorrenal crónico, la insuficiencia cardíaca crónica desencadenará un fallo progresivo y potencialmente permanente de la función renal. En el tipo III o síndrome renocardíaco agudo, un empeoramiento agudo de la función renal causa un fallo cardíaco agudo. El tipo IV o síndrome renocardíaco crónico se da cuando la insuficiencia renal crónica es la causa de la disfunción cardíaca. Por último el tipo V se denomina síndrome cardiorrenal secundario, se daría cuando una circunstancia sistémica como la diabetes o una sepsis causarían ambos fallos cardíaco y renal.

Tanto la arteriosclerosis como la insuficiencia cardíaca se presentan con una frecuencia similar en los pacientes con ERC<sup>124</sup>. La prevalencia de la insuficiencia cardíaca en la población que inicia diálisis es de un 40% aproximadamente y las muertes de causa cardiovascular son entre 10 y 20 veces más frecuentes en los pacientes en diálisis que en el resto de la población<sup>34,125,126</sup>.

Los mecanismos fisiopatológicos en cada tipo son diferentes. Se analizarán los del tipo II y IV por ser los de mayor interés en el presente trabajo.

Un gasto cardíaco disminuido de forma crónica, puede desencadenar hipotensión e hipoperfusión renal. Estas situaciones estimularán una respuesta neurohumoral compensatoria que incluye la activación del sistema renina-angiotensina y del sistema nervioso simpático y un aumento en la expresión de moléculas como vasopresina, endotelina y péptido natriurético atrial<sup>127</sup>. El aumento de la producción renal de angiotensina II y aldosterona promoverán la retención de agua y sodio y causará enfermedad macro y microvascular<sup>128</sup>. La angiotensina II es también capaz de elevar los niveles renales de endotelina I, que es capaz a su vez de activar el factor de crecimiento  $\beta$  y el factor nuclear  $\kappa$ B, iniciando y favoreciendo la progresión de inflamación y fibrosis renal<sup>129</sup>. Junto con la angiotensina II, altos niveles de aldosterona estimularán la producción de fibronectina conduciendo a la fibrosis renal y la glomerulosclerosis. La hipoxemia renal aumentará el estrés oxidativo, empeorará el óxido nítrico y la

función endotelial y promoverá un estado inflamatorio crónico. Los niveles elevados de factor de necrosis tumoral, interleukina 1 e interleukina 6 asociados a la inflamación crónica pueden causar daño tóxico de forma progresiva y apoptosis de las células renales, que conllevará daño renal permanente y pérdida de la función renal<sup>130</sup>. Este mecanismo inflamatorio puede ser la ruta principal del deterioro de la función renal en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica y función del ventrículo izquierdo conservada.

Tanto la albuminuria como la disminución del filtrado glomerular son factores de riesgo independientes para eventos cardiovasculares<sup>131</sup>. Los desordenes cardiovasculares presentes en los enfermos renales son múltiples y a menudo se presentan en el mismo paciente. La aterosclerosis está presente, como se ha comentado previamente, frecuentemente en los pacientes con ERC debido a la alta prevalencia de diabetes, dislipemia, hipertensión, aparte de todos los factores de riesgo no tradicionales que se asocian a los estadios avanzados de insuficiencia renal y que se desarrollan en los diferentes apartados de esta introducción. La hipertrofia ventricular concéntrica, debido a la presencia de hipertensión, la arteriosclerosis y en ocasiones la estenosis de la válvula aórtica, también son fenómenos frecuentemente asociados a la ERC.

En conclusión, existe una compleja relación bidireccional entre riñón y corazón cuyo objetivo es mantener la homeostasis del volumen sanguíneo y de la presión arterial, y la insuficiencia de cualquiera de estos órganos será capaz de causar el fallo del otro.

### **1.2.2.3.- Estado inflamatorio**

La respuesta inflamatoria no es sólo una respuesta local, sino que puede ser un proceso sistémico reflejado en el aumento de marcadores bioquímicos como reactantes de fase aguda, citoquinas y moléculas de adhesión. Varios estudios han encontrado relación entre la insuficiencia renal y algunos de estos marcadores, como la Proteína C Reactiva (PCR), IL-6, TNF- $\alpha$  y fibrinógeno, incluso en pacientes con ligero deterioro de la función renal, sugiriendo que la

ERC es un proceso inflamatorio de bajo grado<sup>132</sup>, siendo los leucocitos polimorfonucleares y los linfocitos CD14+/CD16+ mediadores clave en este proceso<sup>133,134</sup>. De hecho, la inflamación persistente puede ser factor de riesgo de progresión de la ERC y los marcadores inflamatorios predictores del deterioro de la función renal. Este hecho podría ser consecuencia de que moléculas inflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-6 podrían comportarse como toxinas contribuyendo a las complicaciones de la uremia. Además la PCR, es capaz de reducir la producción de óxido nítrico, estimular la formación de endotelina-1 e inducir algunos pasos clave en la generación de la placa de arteriosclerosis (reclutamiento de monocitos y formación de las células espumosas)

Es obvio que en la ERC un considerable número de factores relacionados con la diálisis (bioincompatibilidad, calidad del agua de diálisis...) o no (infecciones...) contribuirán a un estado de inflamación crónica, pero lo que resulta realmente interesante es que pequeños grados de deterioro de la función renal *per se* pueden asociarse con una respuesta inflamatoria. De hecho, a medida que la función renal se deteriora se puede observar aumento progresivo de citoquinas proinflamatorias<sup>135,136</sup>.

La enzima mieloperoxidasa (MPO), presente en los neutrófilos, se considera uno de los vínculos más importantes entre la inflamación, el estrés oxidativo y la arteriosclerosis.

Se considera que las EROs están implicadas en el proceso inflamatorio cuando la función renal disminuye. La inflamación es sensible al equilibrio redox, de manera que en presencia de oxidantes se activarán factores de transcripción genética como el NF- $\kappa$ B, que regulará la transcripción de genes inflamatorios. De la misma manera un estado deplecionado de glutatión (proteína antioxidante) es también capaz de activar este factor.

#### **1.2.2.4.-Disfunción endotelial**

La disfunción endotelial es un fenómeno ampliamente documentado y de inicio precoz en la aterosclerosis, que precede a los cambios estructurales y a las manifestaciones clínicas<sup>137</sup>. El deterioro de la función endotelial se atribuye al descenso en la biodisponibilidad del óxido nítrico, factor vasodilatador derivado del endotelio y con propiedades anti-ateroscleróticas. Aunque es preciso ahondar en el estudio de la acción de las toxinas urémicas en esta disfunción endotelial, existe marcada evidencia de la implicación de la molécula dimetil-arginina asimétrica (ADMA) (un inhibidor endógeno de la enzima óxido nítrico sintasa) en este proceso<sup>138,139</sup>. Dado que la ADMA sufre aclaramiento renal, se encuentran niveles elevados en los pacientes con ERC. Además se ha demostrado que se comporta como un factor independiente de disfunción endotelial y de mal pronóstico en pacientes en HD<sup>140</sup>. Ravani et al, por otro lado, demostraron que la ADMA se comportaba como un marcador potente e independiente de riesgo cardiovascular.

Finalmente, varios autores han podido demostrar un vínculo entre disfunción endotelial y estrés oxidativo en el medio urémico<sup>141</sup>.

#### **1.2.2.5.- Albuminuria**

La albuminuria es un predictor de riesgo cardiovascular bien establecido<sup>142</sup>. Se ha demostrado que su implicación es independiente del riesgo asociado al deterioro de la función renal y que los mecanismos patogénicos deben de ser diferentes. De hecho, se piensa que la albuminuria sería un predictor de riesgo cardiovascular más potente que un deterioro ligero del filtrado glomerular<sup>143</sup>. Se ha demostrado que la albuminuria se asocia con otros factores de riesgo cardiovascular como anomalías en la fibrinólisis, la inflamación y la dislipemia. El aumento de la excreción urinaria de albúmina sería el reflejo glomerular de un aumento generalizado de la permeabilidad endotelial. Un estado inflamatorio de bajo grado jugaría también un papel importante en este escenario. De hecho, la inflamación se ha relacionado con ambas disfunción endotelial<sup>144</sup> y albuminuria<sup>145</sup>.

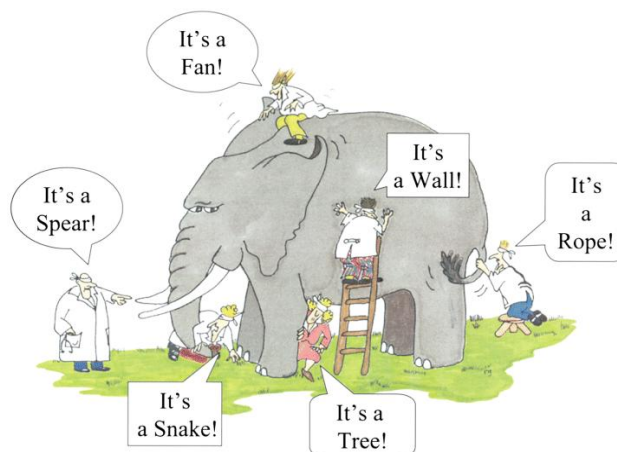
### **1.2.2.7.- Otros:**

Se han descrito otros factores que estarían implicados en mayor o menor medida en el desarrollo de enfermedad cardiovascular en el enfermo con ERC, como: sobrecarga de volumen, excesiva activación simpática, hipotiroidismo subclínico, factores genéticos o alteraciones en la coagulación.

### **1.2.2.8.-Estrés oxidativo**

Con el propósito de poder establecer un nexo común entre todos estos factores, Himmelfarb, Stenvinkel y cols, presentan en 2002 al **ESTRÉS OXIDATIVO** como el factor capaz de unificarlos. Utilizando un símil poético denominaron al estrés oxidativo como el “elefante en la uremia”, haciendo referencia al poema de John Godfrey Saxe (1816-1887): “The Blind Men and the Elephant”, donde varios hombres ciegos intentan describir un elefante tocando únicamente una parte de éste. Todos ellos tenían razón en algo, pero todos fallaban al intentar descifrar la verdad.





**Figura 5.- Estrés Oxidativo: El elefante en la uremia** De: Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 62: 1524-1538, 2002

El aumento de la carga oxidativa a la que se verían expuestos los pacientes con ERC, debido al aumento de la oxidación de proteínas, lípidos, carbohidratos y demás moléculas, resultará finalmente en un proceso de aterosclerosis acelerada junto con otras manifestaciones de la uremia como la amiloidosis. (Tabla 2). Los autores basan este planteamiento en las siguientes ideas:

- La elevación de la PCR, como reactante de fase aguda, es un marcador indirecto de activación leucocitaria y de aumento de estrés oxidativo probablemente vía enzimas como la MPO.
- La malnutrición, con la hipoalbuminemia como marcador, puede contribuir a la morbi-mortalidad cardiovascular por la reducción de la defensa antioxidante.
- Las técnicas de sustitución renal podrán aminorar o no el desequilibrio oxidativo en la medida en que añadan o no más factores oxidantes o inflamatorios.
- Cuando toxinas urémicas como  $\beta_2$ -microglobulina, cisteína u homocisteína, quedan retenidas en altas concentraciones en los tejidos orgánicos se convierten en substratos oxidativos aumentando su patogenicidad.

**Tabla 2.- El elefante en la uremia: Un paradigma conceptual.** De: *Himmelfarb et al. Oxidative stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. Kidney Int 62: 1524-1538, 2002*

Patogénesis urémica	Factores de riesgo adicionales	Mediadores potenciales	Substratos	Fisiopatología	Patología
<b>Aumento de citoquinas</b>	Reaccion de fase aguda	<b>HOCl</b>	Cisteína	Inflamación vascular	Aterogénesis acelerada
<b>Activación del complemento</b>	Malnutrición	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Homocisteína	Daño endothelial	Estenosis coronaria
<b>Retención de solutos</b>	Características de la TSR: Bioincompatibilidad Uso de cateter Exposición al Fe	<b>Anion superóxido</b> <b>Peroxinitrito</b> <b>Radical</b> <b>Hidroxilo</b>	$\beta_2$ microglobulina Derivados glucosa Proteínas: Carbonilos Tioles Tirosina Lípidos: Ac grasos poliinsaturados LDL	CMLV: proliferación y migración Disminución del efecto NO: Vasoconstricción Activación plaquetaria	Hiperplasia íntimal acelerada HVI $\beta_2$ amiloidosis
<b>Activación de neutrófilos</b>	Infección			Daño tisular	

---

**CMLV:** células músculo liso vasculat; **HVI:** Hipertrofia ventricular izquierda; **TSR:** Terapia sustitutiva renal

### 1.3.- ESTRÉS OXIDATIVO Y ATEROGÉNESIS

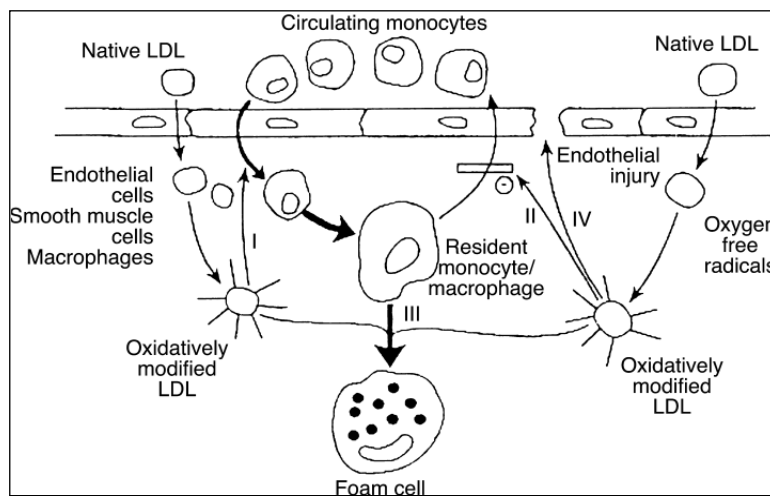
Hace ya veinte años que Steinberg y cols avanzaron la hipótesis de que la capacidad aterogénica de las moléculas de LDL-Colesterol se incrementaba en gran medida cuando estas moléculas sufrían una modificación oxidativa<sup>146</sup>. Durante la formación de la placa de ateroma las moléculas de LDL-ox (LDL-oxidada) capturadas por receptores (*scavengers*) de las células endoteliales conducirán a la transformación de monocitos tisulares en las llamadas *foam cells* (células espumosas), paso clave en la formación de la placa de arteriosclerosis. **(Figura 6)**

El análisis histológico de la placa aterosclerótica ha revelado la implicación de productos oxidativos en su formación.

La enzima MPO, es una de las proteínas más abundantes de las células leucocitarias ya que constituye aproximadamente hasta un 5% del total del contenido proteico de los neutrófilos y hasta un 1% del de los monocitos. Tiene por tanto, un importante papel en la defensa frente a microorganismos. En presencia de peróxido de hidrógeno cataliza la oxidación de grupos *haluro*, convirtiéndolos en moléculas con alto poder oxidante<sup>147</sup>. Se ha descrito actividad MPO localizada junto a las células espumosas, así como productos derivados de la oxidación de residuos proteicos como 3-clorotirosina y ditirosina, fruto de la oxidación, vía MPO, del aminoácido tirosina<sup>148</sup>. Estas reacciones producidas por los monocito-macrófagos ponen de relieve la asociación entre inflamación, estrés oxidativo y arteriosclerosis. De hecho se ha documentado en amplios estudios poblacionales la relación entre el alto recuento leucocitario y rápida progresión de enfermedad aterosclerótica y eventos coronarios<sup>149</sup>.

Resulta también interesante destacar que cuando se aíslan moléculas de HDL-Colesterol (High Density Lipoprotein) de pacientes con antecedentes de enfermedad cardiovascular, éstas contienen niveles mayores de clorotirosina que aquellas moléculas HDL de individuos aparentemente sanos<sup>150</sup>.

Cuando la apolipoproteína A-I (apoA-I), la más abundante en HDL, sufre cloración por la MPO pierde su capacidad de eliminar moléculas de colesterol de las células por la vía ABCA1 lo que normalmente representa una importante vía de manejo del colesterol por parte de los macrófagos. Todas estas observaciones sugieren que los macrófagos pueden generar formas disfuncionantes de HDL que contienen tanto lípidos como proteínas oxidadas. Así pues, la lesión aterosclerótica es una localización potencial donde la oxidación es biológica y clínicamente importante<sup>151</sup>



**Figura 6: Mecanismos potenciales del papel de la LDL-oxidada en la aterogénesis.** Células endoteliales, células del músculo liso vascular o macrófagos pueden catalizar la modificación oxidativa de las LDL circulantes mediante: (I) reclutamiento de monocitos circulantes, (II) atrapamiento de macrófagos en la íntima vascular, (III) consumo aumentado de LDL oxidadas por macrófagos residentes derivando en la formación de células espumosas; y (IV) destrucción de células endoteliales resultado de la toxicidad de las LDL oxidadas. De: *Himmelfarb et al. Oxidative stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. Kidney Int 62: 1524-1538, 2002*

#### **1.4.- ESTRÉS OXIDATIVO Y ERC. EVIDENCIAS ACTUALES.**

Existen varias líneas de evidencia que indican que la ERC es un estado pro-oxidante, las cuales se pueden simplificar de la siguiente manera:

1.- Se han encontrado niveles elevados de lípidos, proteínas y DNA oxidados en pacientes con ERC <sup>152,153,154,155,156</sup>.

2.- Parámetros oxidativos como lipoproteínas modificadas por ácido hipocloroso o productos avanzados de la glicosidación están presentes en las lesiones aterosclerosas de los pacientes con ERC <sup>157,158</sup>.

3.- Hay evidencias también de que existen defectos en el sistema defensivo antioxidante, que conduce a un descenso en la neutralización de las acciones de las EROs. Este defecto de poder antioxidante se puede considerar también como un marcador de estrés oxidativo <sup>152</sup>.

La patogenia del estrés oxidativo en la ERC es obviamente multifactorial e incluye diferentes causas. A medida que progresa el deterioro de la función renal se acumulan en el organismo una serie de moléculas que denominamos toxinas urémicas. Vanholder y cols <sup>159</sup> han descrito recientemente toda una serie de estas toxinas que contribuirían al daño vascular. Estas sustancias retenidas pueden comportarse como sustrato de posteriores modificaciones oxidativas en un medio urémico, motivo por el que alguna de ellas vería aumentada su toxicidad. Existen gran variedad de factores co-mórbidos que ya por sí solos son capaces de aumentar el estrés oxidativo y por otra parte, no menos despreciable, los pacientes que reciben tratamiento con Hemodiálisis o Diálisis Peritoneal están expuestos a otras circunstancias que pueden agravarlo. Sin embargo, el efecto que tienen las técnicas de sustitución renal sobre el balance oxidativo permanece sin aclarar.

Según unas primeras investigaciones del grupo estadounidense de Himmelfarb, parecía lógico pensar que si el estado urémico conllevaba un aumento del estrés oxidativo, un procedimiento capaz de aminorar este estado, como son las técnicas de depuración extrarrenal, también mejoraría el desequilibrio oxidativo. Sin embargo, no todas las observaciones de diferentes grupos de investigación siguen la misma línea de conclusiones, ya que las técnicas de diálisis podrían lejos de restablecer la homeostasis oxidativa, empeorarla aún más.

Los principales factores influyentes en el estrés oxidativo en las diferentes técnicas serían:

- En HD, la exposición reiterada a una membrana sintética para diálisis condiciona determinadas circunstancias que podrán influir en el estrés oxidativo. El proceso de **biocompatibilidad** resultará crucial ya que, este contacto será capaz de poner en marcha mecanismos inflamatorios y por ende oxidativos. Los factores implicados son varios: el tipo de membrana de HD (composición química, permeabilidad, adsorción de proteínas, geometría y proceso de fabricación o los procedimientos de esterilización), el líquido de diálisis y la posibilidad de que se produzca retrofiltración del mismo durante la diálisis y otros factores quizás de menos importancia, como materiales plásticos utilizados en la fabricación del material utilizado en la diálisis, tanto en el dializador o las líneas, los cambios en el flujo sanguíneo por la bomba de sangre o por las mismas agujas de diálisis. Los injertos artificiales de Goretex®, utilizados como acceso vascular, se ha demostrado que tienen una alta biocompatibilidad y que no son capaces en principio, *in vitro*, de activar a mononucleares ni linfocitos.
- En DP la membrana dialítica es una membrana fisiológica y de forma intuitiva lleva a pensar que se trata de una técnica más biocompatible. Sin embargo, la continua exposición del peritoneo a soluciones con altas concentraciones de glucosa, y diferentes pH, es también capaz de producir estrés oxidativo.

- Los pacientes con ERC avanzada reciben de forma rutinaria en su tratamiento altas cantidades de hierro intravenoso necesarias para suplir el déficit de hierro y optimizar la terapia con agentes estimuladores de eritropoyetina. Sin embargo, existen estudios que han demostrado una disfunción en células polimorfonucleares en pacientes con cifras de ferritina superiores a 650 µg/l, incluso con cifras del índice de saturación de transferrina inferior al 20%<sup>160</sup>. Algunos autores han encontrado niveles más elevados de parámetros de lipoperoxidación en pacientes en hemodiálisis tras la infusión de hierro intravenoso<sup>161</sup>.

## **1.5.- ESTRÉS OXIDATIVO: DEFINICIONES Y FUNDAMENTOS**

Se denomina estrés oxidativo a la pérdida del equilibrio entre factores oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, conduciendo potencialmente al daño tisular<sup>162</sup>.

El resultado del efecto del estrés oxidativo en el medio urémico será un desarrollo acelerado de la aterosclerosis y otras manifestaciones de la uremia.

### **1.5.1.- El inicio: la vida con oxígeno**<sup>163,164,165,166,167</sup>

El oxígeno es un gas tóxico y reactivo, capaz de oxidar los compuestos de carbono. Su aparición en la atmósfera hace unos 2500 millones de años impidió que proliferara un primitivo estilo de vida a base de reacciones de fermentación, que permitieron a las primeras células generar ATP de forma anaeróbica. La evolución del aparato fotosintético de las células primitivas permitió obtener el hidrógeno de las moléculas de agua, eliminando el oxígeno como producto residual. La acumulación del oxígeno supuso por un lado, la inmediata oxidación de los productos orgánicos formando dióxido de carbono y agua y por otro la formación de la capa de ozono, que redujo enormemente la cantidad de radiación ultravioleta que alcanzaba la superficie de la Tierra.

La consiguiente oxigenación de la biosfera impuso una severa presión evolutiva en muchos organismos que, hasta entonces, habían vivido y evolucionado en un mundo anaerobio. Muchos organismos, incapaces de tolerar este gas, tuvieron que refugiarse en nichos anaeróbicos, o extinguirse.

Por otro lado, forzó a otro grupo de células, a desarrollar mecanismos para su detoxificación intracelular, en los que se encuentran implicados enzimas tales como catalasas, peroxidasas y superóxidodismutasas, que reaccionan con los radicales tóxicos producidos por el oxígeno y los convierten en compuestos orgánicos inócuos y agua. La evolución de estos enzimas protectores permitió que las células toleraran la presencia del oxígeno.



Pronto, sin embargo, los microorganismos hallaron una solución a la problemática del oxígeno, desarrollando la capacidad de usar éste mediante la respiración. Esta solución no sólo los protegió, sino que además les aportó energía adicional, ya que la cantidad de ATP generado mediante la respiración es bastante mayor que la obtenida por fermentación. Por tanto, la respiración fue un requisito para el origen de las células eucariotas que se convertirían en el material de construcción de los organismos superiores.

Sin embargo, muchos de los productos que se originan durante la respiración celular son por naturaleza potentes oxidantes para otras moléculas. Por lo que las células aerobias tienen que pagar un precio inevitable, y es la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno de las que se han de defender.

### **1.5.2.- Concepto y características de radical libre**<sup>165,</sup>

168,169,170,171,172,173,174

Los electrones en los átomos ocupan regiones espaciales conocidas como orbitales. La estructura electrónica de un átomo o una molécula es termodinámicamente más estable si en cada orbital hay un máximo de dos electrones, que giran en direcciones opuestas, o sea, se hallan apareados. Un electrón no apareado es el que está solo en un orbital, con dos posibles direcciones de giro. La mayoría de las sustancias presentes en el organismo contienen sólo electrones apareados y suelen ser, por tanto, químicamente estables.

Los radicales libres son especies químicas (átomos o moléculas) que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, y pueden tener carga (positiva o negativa) o no.

Esta propiedad de tener electrones desapareados le puede conferir al radical una enorme reactividad química, que le conducirá a interactuar rápidamente con otros átomos o moléculas (radicales o no) con las que entre en contacto, tendiendo a ceder este electrón extra para estabilizar su orbital de valencia

(radical reductor), o a aceptar un electrón para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante), o a unirse a un no radical, en cuyo caso este último se convierte en un radical libre. Mediante estos mecanismos los radicales libres dan lugar a reacciones en cascada con formación de nuevos radicales libres. Sólo cuando coinciden dos radicales libres pueden combinar sus electrones desapareados y unirse mediante un enlace covalente, terminando así con dichas reacciones.

Las reacciones promovidas por los radicales libres se pueden dividir en reacciones de iniciación, de propagación y de terminación. Aunque son generalmente más reactivos que los no radicales, hay una gran variabilidad en dicha reactividad. El resultado de la reacción de un radical inorgánico con un compuesto orgánico, es la creación de un radical orgánico, el cual puede sufrir sucesivas reacciones hasta formar un compuesto más estable.

Los radicales libres son generados *in vivo* como productos del metabolismo normal. En el organismo pueden crearse intra y extracelularmente, mediante mecanismos en los que están implicados numerosos enzimas y tipos celulares. En condiciones normales, la inmensa mayoría de los radicales libres proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno.

El radical más abundante en los sistemas biológicos es el oxígeno molecular. Su capacidad oxidante y la reactividad de las especies químicas generadas en su reducción vienen determinadas por sus estructuras electrónicas moleculares. En 1924 se estableció que el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) es un diradical que posee dos electrones desapareados en su orbital más externo con giros paralelos. Esta disposición de los giros previene la adición directa de un par de electrones (para lo que debería haber un giro paralelo y uno antiparalelo) a la molécula, necesitando una inversión de giro antes de que se pueda producir la unión, de acuerdo con el principio de exclusión de Pauli<sup>a</sup> para evitar la colocación de dos giros electrónicos paralelos en el mismo orbital. Ya que el proceso de inversión

---

<sup>a</sup>**Principio de exclusión de Pauli.** En un mismo átomo o sistema orbital, no pueden existir dos electrones con valores iguales en sus cuatro números cuánticos; deben diferir en al menos uno. Eso significa que ningún orbital puede contener más de dos electrones y que éstos deben tener sus respectivos giros apareados, o sea, orientados en sentidos opuestos.

de giro es lento comparado con la vida media de los elementos en colisión, el resultado es que el oxígeno en su estado fundamental es un oxidante relativamente débil, permitiendo la coexistencia de materia orgánica y oxígeno libre.

Una consecuencia de esta restricción del giro, es que el estado fundamental del oxígeno favorecerá la vía de reducción univalente del mismo, siempre que sea posible energéticamente.

Frecuentemente se utiliza de manera equivocada el término “radicales libres del oxígeno”, asignándosele a todas las especies reactivas del oxígeno intermedias, incluyendo aquellas formas moleculares que no son radicales. Es más apropiado hablar de *especies reactivas del oxígeno* en lugar de radicales libres del oxígeno.

### **1.5.3.- Procedencia de las especies reactivas del oxígeno**

Las reacciones en las que están implicadas los radicales libres son fundamentales para el normal funcionamiento de un amplio espectro de procesos biológicos. Debido a la ubicuidad del oxígeno molecular en los organismos aeróbicos y por su capacidad de aceptar fácilmente electrones, las especies reactivas del oxígeno en gran medida median las reacciones en las que se implica un radical libre a nivel celular.

En el organismo, las especies reactivas del oxígeno derivan de fuentes endógenas y exógenas:

#### ***Fuentes endógenas de especies reactivas del oxígeno***

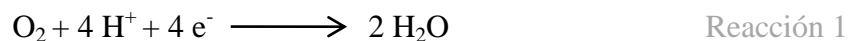
Son las generadas en los procesos biológicos intra y extracelulares normales y patológicos, en prácticamente todos los tejidos. Pueden producirse de forma exagerada e inadecuada, o en un medio en el que las defensas que normalmente protegen a los tejidos son insuficientes.

*Transporte electrónico a nivel de la mitocondria*

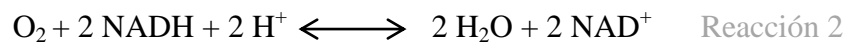
El ATP se forma y consume continuamente. La fosforilación oxidativa es el proceso por el que se forma el ATP. Cuando mediante una serie de transportadores (NADH-Q reductasa, citocromo reductasa y citocromo oxidasa) se transfieren electrones desde el NADH (nicotidamida adenindinucleótido reducido) o el FADH<sub>2</sub> (dinucleótido de flavina y adenina reducido) al oxígeno molecular, se libera una gran cantidad de energía. Ésta es la principal fuente de ATP en los organismos aeróbicos. La oxidación y la fosforilación son dos procesos asociados.

Por tanto, la cantidad de oxígeno reducido en la mitocondria depende de los requerimientos energéticos más que del oxígeno disponible. Está regulado por la relación ADP/ATP<sup>175</sup>.

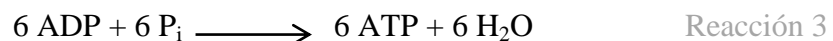
Aproximadamente el 95% de todo el oxígeno consumido por las células de los mamíferos se metaboliza en la mitocondria, donde es reducido por cuatro electrones, produciendo dos moléculas de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mediante la vía de la reducción tetravalente, la cual está catalizada en última instancia por la citocromo oxidasa<sup>176</sup>:



de manera simultánea el NADH es oxidado a NAD<sup>+</sup> (nicotidamida adeninucleótido),



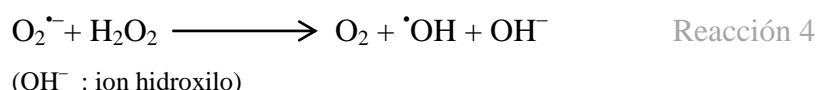
y se forman seis moléculas de ATP a partir del ADP (adenosindifosfato) y P<sub>i</sub> (ortofosfato)<sup>175</sup>



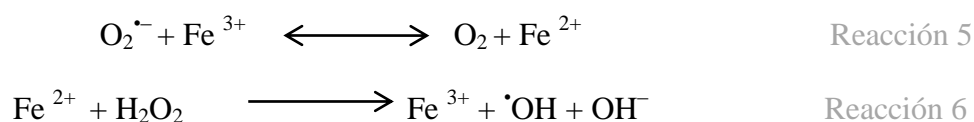
Sin embargo, entre un 0.5 y un 2% del oxígeno escapa de esta vía y sufre una reducción univalente<sup>177,178</sup>. Como se ilustra en la figura 7, el oxígeno también puede ser reducido sucesivamente por un único electrón durante el metabolismo aeróbico normal y producir metabolitos reactivos del oxígeno parcialmente reducidos y altamente tóxicos, el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ )<sup>178,179,180</sup>. El porcentaje en la formación de radical superóxido, es directamente proporcional a la cantidad de oxígeno utilizada por la mitocondria<sup>179</sup>.

En el caso de las células hipóxicas, el predominio en los procesos de reducción de la cadena respiratoria, y acumulación celular de cofactores reducidos, puede aumentar la producción de radical superóxido por parte de los componentes del transporte electrónico<sup>181,182</sup>.

Se puede producir radical hidroxilo por la interacción del radical superóxido con el peróxido de hidrógeno, es lo que se conoce como reacción de Haber-Weiss<sup>183</sup>.



Se asume que la reacción de Haber-Weiss en solución acuosa, se produce a una velocidad demasiado lenta a bajas concentraciones de radical superóxido y peróxido de hidrógeno para tener una significación fisiológica, aunque termodinámicamente es posible<sup>184</sup>. La reacción se acelera por la presencia de metales de transición, algo que ya sugirieron Haber y Weiss<sup>183</sup>, particularmente el hierro que actuaría como catalizador<sup>184,185</sup>. Así el radical superóxido reduce el hierro (Reacción 5), el cual a su vez reduce el peróxido de hidrógeno para formar radical hidroxilo, es la reacción que describió Fenton (Reacción 6)<sup>185,186,187</sup>.



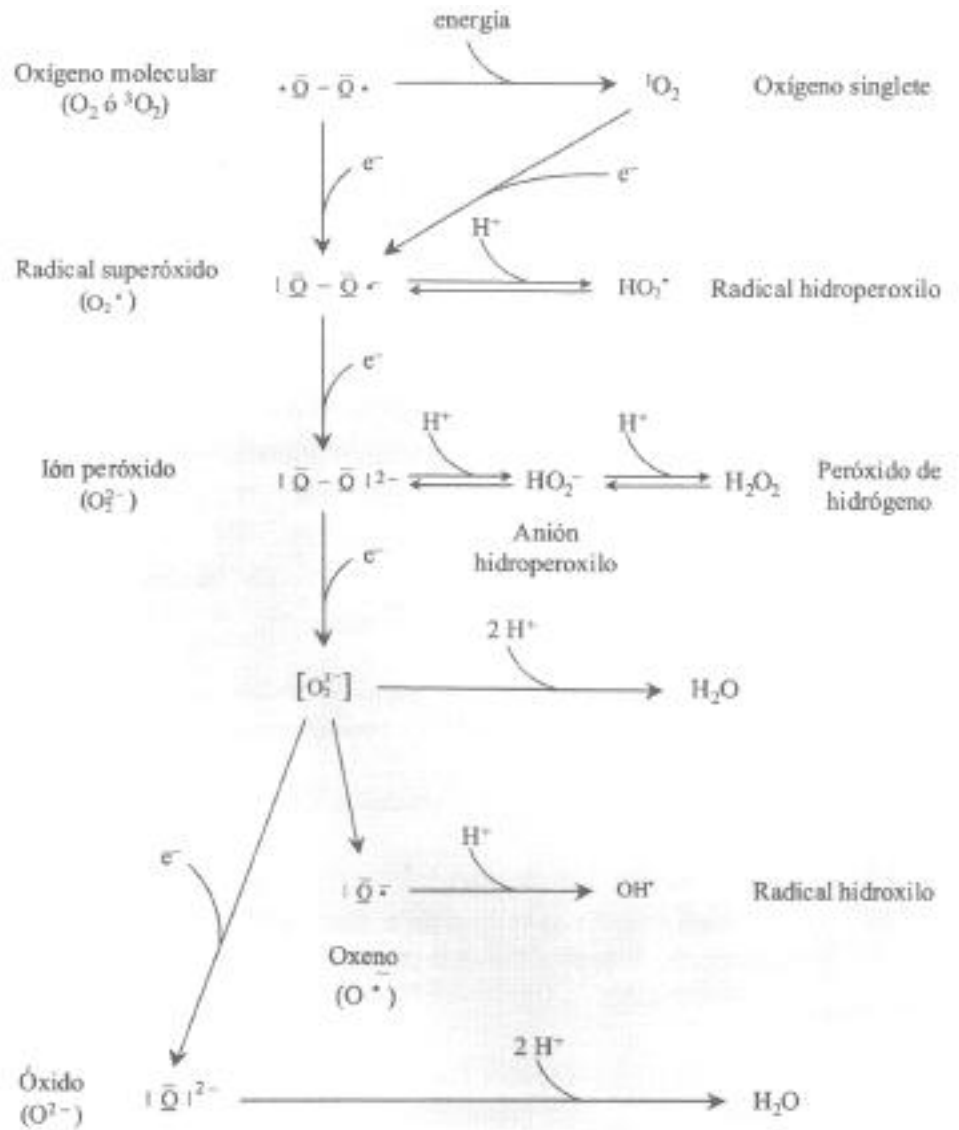
Ya que normalmente la concentración de oxígeno es mayor que la de radical superóxido, esto favorece la reacción de oxidación del hierro (reacción 5). Si la concentración intracelular de superóxido es mayor que la de oxígeno se reducirá el Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, favoreciéndose la reacción de Fenton<sup>188</sup>.

Esta explicación ha sido criticada al considerar que otros agentes reductores, como el glutatión o el ácido ascórbico, presentes *in vivo* a mayores concentraciones que el superóxido, harían más probable la reducción a Fe<sup>3+</sup> impidiendo la reacción de Fenton. Pero Rowley y Halliwell<sup>189</sup> muestran que los compuestos con radicales tiol, a concentraciones fisiológicas no previenen la formación de radical hidroxilo proveniente de radical superóxido, en presencia de sales de hierro, sin embargo, si previenen la superóxido dismutasa y la catalasa.

Koppenol<sup>190</sup> discute que la reacción de Haber-Weiss no se da en los medios biológicos en presencia de superóxido dismutasa, ya que ésta reacciona a una mayor velocidad de reacción específica con el radical superóxido, de cómo reduce éste último al Fe<sup>3+</sup> (reacción 5). Sin embargo, en situaciones patológicas, como en el caso de insuficiencia renal, en las que la formación de superóxido se incrementa, la de superóxido dismutasa se encuentra disminuida y funcionalmente desbordada, sí es factible que se produzca.

Por tanto, la reacción de Haber-Weiss catalizada por el sistema ferroso-férrico (o cuproso-cúprico), que pueden actuar como transportadores de electrones, es una manera factible de crear radical hidroxilo en los sistemas biológicos dada la cantidad de compuestos ricos en hierro<sup>184,185,187</sup>.

Figura 7.- Reducción univalente del oxígeno



*Sistema de transporte electrónico a nivel del retículo endoplasmático y la membrana nuclear*

Ambas membranas intracelulares contienen citocromos P450 y b5, los cuales por autooxidación pueden generar especies reactivas del oxígeno. La disociación de los complejos citocromo P450 puede formar peróxido de hidrógeno y otros productos intermedios peroxi. Por otro lado pueden oxidar ácidos grasos insaturados.

Es difícil evaluar la contribución de ambas membranas en la producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno en el conjunto de la producción celular.

*Peroxisomas*

A nivel celular, los peroxisomas son un lugar importante de producción de especies reactivas del oxígeno debido a su alta concentración en oxidasas<sup>191</sup>.

*Membrana plasmática*

La membrana plasmática es un lugar crítico respecto a las reacciones de los radicales libres. Los generados extracelularmente deben atravesarla antes de reaccionar con otros componentes celulares, pudiendo iniciar su toxicidad en ésta.

Mención aparte, merece la membrana plasmática de los fagocitos, la cual es una fuente importante de especies reactivas del oxígeno, debido a la presencia en la misma de la NADPH oxidasa (ver más adelante).

Otra fuente potencial de especies reactivas del oxígeno es el metabolismo del ácido araquidónico. En la formación de prostaglandinas y leucotrienos



se producen intermediarios peroxi, hidroperóxidos, radicales hidroxilo y radical superóxido<sup>192,193,194,195</sup>.

### *Otros*

Numerosas enzimas generan especies reactivas del oxígeno durante su ciclo catalítico. La xantina oxidasa, enzima responsable de la conversión de hipoxantina en ácido úrico, es una fuente importante de radical superóxido<sup>196,197</sup> y probablemente la más estudiada. Su amplia distribución le confiere un importante papel en situaciones patológicas.

La aldehído oxidasa, estructuralmente similar a la xantina oxidasa, también genera radical superóxido. Las enzimas dihidroorotato deshidrogenasa, flavoprotein deshidrogenasa y la triptófano dioxigenasa también utilizan el radical superóxido durante su ciclo catalítico<sup>164,181</sup>.

Se produce radical superóxido por “accidentes químicos” (autooxidaciones), en que muchas moléculas del organismo reaccionan directamente con el oxígeno, por ejemplo en el caso de las catecolaminas, hemoglobina, mioglobina, tetrahidrofolatos, tioles, hidroquinonas, diversas cadenas de transporte electrónico, etc<sup>164,181,198,199</sup>.

### *Las producidas por células inflamatorias*<sup>200,201</sup>

Sacando provecho de su agresividad química, las especies reactivas del oxígeno han sido incorporadas a ciertos mecanismos defensivos para la destrucción de bacterias o agentes extraños<sup>202</sup>. Producidas durante la actividad fagocítica, en los procesos inflamatorios agudos y crónicos, son esenciales para la defensa contra la invasión microbiana<sup>203,204</sup>. La estimulación de los receptores de la membrana de los fagocitos por el complemento, endotoxinas, leucotrieno B<sub>4</sub>, inmunocomplejos y factor activador de las plaquetas, activan la NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana leucocitaria, la cual reduce el oxígeno molecular

exclusivamente, generando grandes cantidades de radical superóxido<sup>205,206</sup>. Este enzima cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH (producto de la vía de las hexosas fosfato) al oxígeno molecular. Normalmente la NADPH oxidasa se encuentra en estado latente<sup>206</sup>.



Además. Los leucocitos activados producen especies reactivas del oxígeno a través del metabolismo del ácido araquidónico en la vía de la ciclooxigenasa<sup>194</sup>.

En el llamado “estallido respiratorio o explosión oxidativa” (*respiratory burst<sup>b</sup>*) se producen especies reactivas del oxígeno: radical superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radical hidroxilo<sup>201,204</sup>. Desgraciadamente, la formación de éstas durante el ataque de los microorganismos, puede también dañar los tejidos del huésped.

### ***Fuentes exógenas de especies reactivas de oxígeno***

Los secundarios a agentes antineoplásicos como los antibióticos antraciclina y otros antibióticos, que dependen, por ejemplo, de la unión con metales para su actividad. Muchos de los efectos quimioterápicos y efectos colaterales citotóxicos de estos fármacos se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a especies reactivas del oxígeno.

Los secundarios a influencias externas, como la irradiación de los organismos con radiaciones electromagnéticas (rayos X y  $\gamma$ ), particularmente la radiación ionizante, la cual daña los tejidos por causar fisión del enlace del agua produciendo átomos de hidrógeno, electrones hidratados y radicales hidroxilo. La luz a longitudes de onda determinadas

---

<sup>b</sup> Recibe este nombre porque se describió primero como un aumento súbito en el consumo de oxígeno pocos segundos después de la interacción de la célula con el agente estimulante.

puede causar fotólisis en los enlaces químicos y producir radicales libres. Los ultrasonidos pueden producir unos efectos semejantes<sup>207</sup>.

Además una amplia variedad de agentes ambientales incluyendo la hiperoxia, los polucionales del aire (ozono y óxidos del nitrógeno y del azufre), algunos herbicidas e insecticidas, humo del tabaco, aditivos alimentarios, disolventes y el amplio grupo de los hidrocarburos aromáticos, etc., también pueden causar daño celular mediado por radicales libres.

Estos xenobióticos o ya son un radical libre, o son convertidos por el metabolismo intracelular y procesos de detoxificación.

#### **1.5.4.- Tipos de especies reactivas del oxígeno**<sup>165,187,208,209,210,211</sup>

Como se ha comentado previamente, el término especies reactivas del oxígeno, se utiliza para designar de modo colectivo tanto los radicales del oxígeno (superóxido, hidróxilo) como las especies no radicales, que se comportan como oxidantes, particularmente el peróxido de hidrógeno, el oxígeno molecular “singlete” y el ácido hipocloroso.

##### ***Radicales libres del oxígeno***

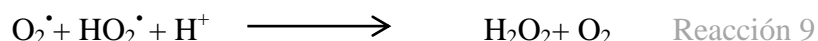
##### ***Radical superóxido o dióxido ( $1^-$ ) ( $O_2^{\bullet-}$ )***<sup>164,177,198</sup>

Aunque la denominación más correcta es la de dióxido ( $1^-$ ), utilizaremos a lo largo del texto, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación también permitida de superóxido.

El anión superóxido es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidroperóxido ( $HO_2^{\bullet}$ ), con el cual se equilibra. Ya que el  $pK_a$  para la reacción de disociación es 4.88, hay poco radical hidroperóxido a valores fisiológicos de  $pH$ <sup>184</sup>. Sin embargo a  $pH$  bajos la concentración de radical hidroperóxido puede aumentar extraordinariamente (ej: tejidos isquémicos, superficie de los macrófagos activados,...)<sup>187</sup>.



Ambos pueden reaccionar produciéndose la siguiente reacción de dismutación, originando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y oxígeno ( $k^c = 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>184</sup>.



Es el único radical a partir del cual se pueden formar la mayoría de las especies reactivas del oxígeno (reacciones 4, 8, 9 10 y figura 7. Se encuentra en estado reducido por la ganancia de un electrón, resultado de la reducción univalente del oxígeno molecular.

Puede dismutar espontáneamente produciendo peróxido de hidrógeno, aunque esta reacción es más lenta ( $k \approx 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) que la dismutación observada en la reacción 9, probablemente debida a la repulsión electrostática<sup>184</sup>.



Así la dismutación es más rápida a valores de pH ácido, necesarios para protonar el radical superóxido más rápidamente que a pH fisiológico. Según Fridovich<sup>164,198</sup> a pH 7.8 en un medio acuoso, la dismutación espontánea se produce a velocidad constante de  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Actúa fundamentalmente como un agente reductor donando su electrón extra. También lo puede hacer como agente oxidante, aunque de manera más pobre, en cuyo caso es reducido a peróxido de hidrógeno. Su reactividad química es alta en solventes orgánicos, aunque es poco reactivo en soluciones acuosas, lo que le permite difundir lejos de su lugar de formación, reaccionando con otras estructuras dentro de la célula,

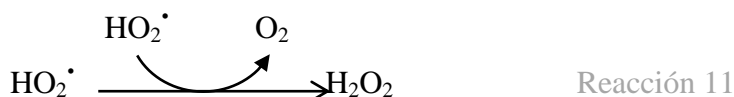
<sup>c</sup> Constante de velocidad o velocidad de reacción específica.

comprometiendo el funcionalismo de la misma. El producido extracelularmente es capaz de entrar en las células a través de los canales aniónicos transmembrana<sup>181</sup>. Ataca a moléculas como el ADN, fosfolípidos de membrana, polisacáridos, tioles y aminas. Aunque se piensa que la mayoría de sus efectos dañinos derivan de su capacidad para generar radicales altamente tóxicos como el radical hidroxilo, también se le ha implicado en el inicio y en la terminación de la peroxidación lipídica<sup>212</sup>.

*Radical hidroperóxilo o dióxido de hidrógeno (HO<sub>2</sub>•)<sup>164,198</sup>*

Aunque la denominación más correcta es la de dióxido de hidrógeno, utilizaré a lo largo del texto, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación también permitida de hidroperóxilo.

Es la forma protonada del radical superóxido, más liposoluble. Puede reaccionar espontáneamente con otro radical hidroperóxilo originando peróxido de hidrógeno ( $k = 8 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>184</sup>:



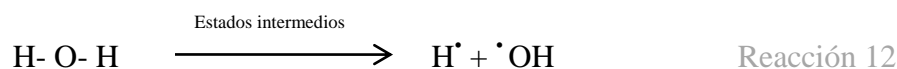
Es un oxidante mucho más potente que el radical superóxido y su vida media es mayor. Tiene un papel mucho más importante de lo que se pensaba en la lesión oxidativa y posee la capacidad de iniciar la peroxidación lipídica, así como la oxidación de una amplia cantidad de compuestos biológicos<sup>210,213</sup>. Sin embargo, también ha sido implicado en las reacciones de terminación de la peroxidación lipídica<sup>214</sup>.

### Radical hidroxilo o monóxido de hidrógeno ( $\cdot\text{HO}$ )

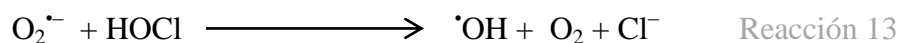
Aunque la denominación más correcta es la de monóxido de hidrógeno, utilizaremos a lo largo del texto, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación también permitida de hidroxilo.

El radical hidroxilo es el estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de tres electrones (figura 7). Se genera también en las reacciones de Haber-Weiss o en la de Fenton (reacciones 4 y 6).

La radiación ionizante puede producir radical hidroxilo por la rotura del enlace covalente entre el oxígeno y un hidrógeno de una molécula de agua, reacción en la que también se generan electrones hidratados ( $e_{\text{aq}}$ ) y otro oxidante, el radical hidrógeno ( $\text{H}\cdot$ )<sup>163</sup>.



Otro mecanismo por los que se puede formar radical hidroxilo *in vivo*, es la interacción entre el radical superóxido y el ácido hipocloroso (HOCl), producidos ambos por los neutrófilos activados en el proceso inflamatorio<sup>189,215</sup>.



En presencia de hierro ferroso el ácido hipocloroso también puede producir radical hidroxilo<sup>189</sup>.



Es el oxidante más potente de los sistemas biológicos, el radical libre del oxígeno más reactivo que se conoce. Debido a ello, su capacidad de difusión es mínima, reaccionando allí donde se produce<sup>165,187,210</sup>. Se combina rápidamente con moléculas de su alrededor, cede o capta electrones,

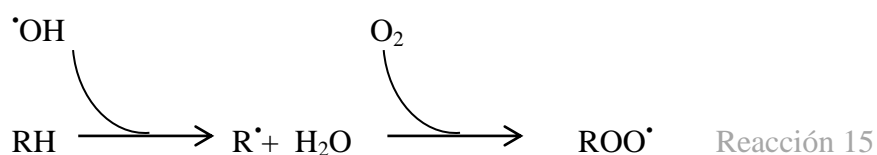
poniendo en marcha reacciones en cadena<sup>171</sup>. Su vida media es extremadamente corta (a 37°C,  $1 \times 10^{-9}$  segundos). El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son menos reactivos, pueden difundir ciertas distancias desde su lugar de formación, generando radical hidroxilo, cuando se encuentran con metales de transición. Reacciona con todas las moléculas biológicas conocidas, y muy relevante es el daño que produce en el ADN en el que induce mutaciones, en los enzimas a los que inactiva, y en las membranas en las que desencadena la peroxidación lipídica.

En el organismo no existen sistemas de defensa directos para neutralizar al radical hidroxilo.

### ***Radicales secundarios a la lesión tisular***

#### ***Radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>)***

Lo más característico es su formación en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (RH<sup>•</sup>). (R<sup>•</sup>: radical alquilo)<sup>210,216</sup>.



Tiene relativa baja capacidad oxidante y una menor reactividad en relación con el radical hidroxilo, su vida media es mayor (a 37°C,  $1 \times 10^{-2}$  segundos), lo que le confiere una mayor capacidad de difusión en los sistemas biológicos.

Puede captar un átomo de hidrógeno de un lípido produciendo una reacción en cadena (ROOH: hidroperóxido lipídico).



Los radicales peroxilo también iniciaran la oxidación de proteínas, carbohidratos, etc.

#### *Radical alcoxilo (RO<sup>•</sup>)*

El radical superóxido puede reaccionar con los hidroperóxidos lipídicos y formar radicales alcoxilo. Es por tanto, un radical orgánico. Su reactividad con los lípidos es intermedia entre el radical peroxilo y el hidroxilo (vida media a 37°C, 1 x 10<sup>-6</sup> segundos)..

#### *Especies reactivas del oxígeno no radicales libres*

##### *Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

El estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de dos electrones da ión peróxido (figura 7). Éste no es un radical libre ya que no posee electrones desapareados. Todo ión peróxido formado a pH fisiológico se protonará inmediatamente a peróxido de hidrógeno, ya que su pK<sub>a</sub> es muy alto. Muchos enzimas como la urato oxidasa o la glucosa oxidasa la producen por este mecanismo. La dismutación del radical superóxido, ya sea de manera espontánea (reacción 10), o catalizada por la superóxido dismutasa, es la fuente más importante de peróxido de hidrógeno. La reacción no catalizada entre dos radicales hidroperóxilo (reacción 11), y entre los radicales superóxido e hidroperóxilo (reacción 9), también lo producen.

El peróxido de hidrógeno es un oxidante y reductor muy débil, por ello es relativamente estable y poco reactivo en ausencia de iones metálicos. Por sí



mismo oxida lentamente la mayoría de las moléculas orgánicas en un medio acuoso, esencialmente los grupos sulfhidrilo. No obstante, puede ser muy tóxico para las células, ya que reacciona con el radical superóxido (reacción de Haber-Weiss, reacción 4), o no (reacción de Fenton, reacción 6), en presencia de iones de hierro o de cobre, que actúan como catalizadores, formando radicales altamente reactivos, como el radical hidroxilo<sup>186</sup>.

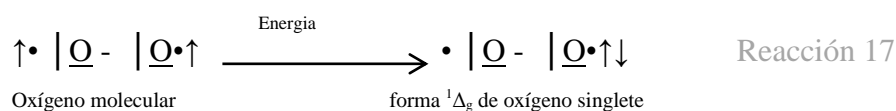
El peróxido de hidrógeno es además sustrato de la enzima mieloperoxidasa, que cataliza una reacción en la que se produce un producto altamente oxidante, como el ácido hipocloroso (reacción 21)

Se mezcla muy bien con el agua y es tratado por el organismo como a la misma, lo que le proporciona una gran capacidad de difusión, atravesando con relativa facilidad las membranas. La base de esto reside en su estado no ionizado y de poca carga<sup>181,209</sup>.

### *Oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)*

Como se ha comentado, el oxígeno molecular posee dos electrones desapareados. En su estado fundamental es un triplete con giros paralelos.

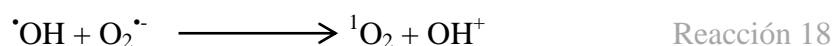
El oxígeno molecular puede absorber una determinada cantidad de energía (mínimo 23 kcal/mol), con lo que uno de sus electrones desapareados salta a un orbital de mayor energía e invierte su giro. Aunque esto no lo convierte en un radical, es una forma reactiva del oxígeno en la que se ha eliminado la restricción cinética que supone tener dos electrones desapareados con giros paralelos, incrementándose su capacidad oxidante. Es lo que se conoce como oxígeno singlete, del que existen dos formas. El más importante en biología es la forma *delta*, la cual tiene dos electrones apareados ocupando el mismo orbital, con el otro orbital vacío:



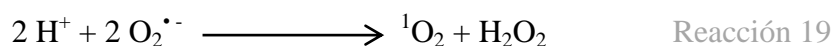
La energía necesaria para que se produzca la reacción anterior la puede aportar la misma luz visible.

Una fuente importante de oxígeno singlete son las reacciones de fotosensibilización tipo II. Además su génesis en los sistemas biológicos puede estar mediada por varias reacciones enzimáticas y durante la peroxidación lipídica<sup>217</sup>.

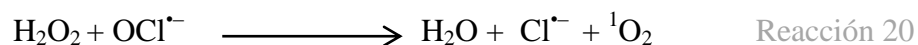
Khan y Kasha<sup>218</sup> además de presentarlo como producto resultante de la reacción de Haber-Weiss, proponen su formación en una reacción de transferencia electrónica entre los radicales hidroxilo y superóxido.



y en una reacción de dismutación del radical superóxido



La interacción entre el peróxido de hidrógeno y el hipoclorito (producidos ambos en grandes cantidades por los neutrófilos activados), también puede producir oxígeno singlete:



Aunque en condiciones fisiológicas esta reacción parece ser cuantitativamente poco importante<sup>200</sup>.

Es un poderoso agente oxidante, muy reactivo. Su vida media a 37°C es de  $1 \times 10^{-6}$  segundos. El DNA es uno de los principales lugares donde actúa<sup>217</sup>. También se ha implicado en la peroxidación lipídica<sup>219,220</sup>.

### Acido hipocloroso(HOCl)<sup>200,204</sup>.

Un mecanismo defensivo utilizado por los neutrófilos, pero no por los macrófagos es la producción de ácido hipocloroso. La activación de los neutrófilos libera de sus gránulos citoplasmáticos la enzima MPO al medio extracelular, donde cataliza fundamentalmente la oxidación de iones cloro por el peróxido de hidrógeno (formado por la dismutación del radical superóxido generado por la NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana de los neutrófilos<sup>206</sup>) a ácido hipocloroso (HOCl).



El ácido hipocloroso es un agente antibacteriano muy potente. Actúa a bajas concentraciones dañando las proteínas de membrana (al oxidar sus grupos sulfhidrilo) e impidiendo su función, mientras que a altas concentraciones las células sufren lisis por daño oxidativo generalizado (potenciales dianas son las aminas, aminoácidos, tioles, nucleótidos, hemoproteínas...). También puede producir una modificación oxidativa de la superóxido dismutasa, perdiendo ésta su actividad<sup>221</sup>.

Reacciona especialmente rápido con ciertas aminas primarias para producir N-cloraminas (RNHCl). Son potentes oxidantes, aunque menos tóxicas que el ácido hipocloroso, varía en función de su lipofilia.



El ácido hipocloroso actuando en los dobles enlaces de ácidos grasos formará clorohidrinadas<sup>222</sup>.

### 1.5.5.- Acciones de las especies reactivas del oxígeno<sup>213,223,224,225,226,227</sup>.

Hace cinco o seis décadas, se creía que los radicales libres eran tan reactivos y tan poco selectivos, que no podían estar implicados en los procesos

bioquímicos normales. En esos tiempos, las publicaciones sobre la biología del radical libre casi siempre se limitaron a situaciones patológicas en las que se producían altas concentraciones de radicales tras la exposición a agentes externos, tales como la radiación de alta energía o sustancias tóxicas.

Sin embargo, hoy sabemos que no todas las acciones de los oxidantes tienen consecuencias perniciosas, y no todas las acciones de los antioxidantes tienen consecuencias beneficiosas. Vivimos en un mundo basado en reacciones redox, donde la oxidación y la reducción forman la base de nuestra capacidad de alimentar las reacciones de las que depende nuestra vida. Debido a que nuestras células están repletas de sustancias reductoras y oxidantes, debemos minimizar reacciones no deseadas mediante barreras cinéticas o compartimentación física.

El oxígeno es “la fuente de la vida evolucionada” y, paradójicamente, también es un agente lesivo de gran importancia por ser la fuente más abundante de especies reactivas.

Por lo tanto, las especies reactivas del oxígeno tienen una doble acción en los organismos vivos:

- 1) Beneficiosa. Participando en la defensa frente a las infecciones<sup>202,203,204</sup>, fagocitosis e inflamación, generando potentes quimiotácticos y activadores de los neutrófilos, formando parte del metabolismo normal, particularmente en la respiración mitocondrial, detoxificación microsomal (inducción enzimática de muchos fármacos como los barbitúricos, etc.), regulación del tono del músculo liso, síntesis de eicosanoides, regulación de la permeabilidad y tono vascular, etc.

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas que se producen con gran rapidez, muy reactivas y tienen una vida media muy corta, con un radio de difusión muy pequeño (de angstroms a micras). Están bien preparadas para desempeñar el papel de segundos mensajeros en los sistemas de rápidos de señalización celular que no requieren la síntesis de proteínas. Se sabe que las especies reactivas del oxígeno actúan como moléculas transmisoras de

señales de varios tipos celulares, participando y modificando eventos fisiológicos relacionados con la unión ligando-receptor y activación transcripcional. Regulan o participan en el crecimiento, apoptosis, y en la respuesta adaptativa a la lesión o el estrés<sup>228</sup>

b) Dañina: producidos en exceso lesionan estructuras y ocasionan daño tisular.

Las especies reactivas del oxígeno se hallan a muy baja concentración en los seres vivos, y son tan inestables que apenas existen como tales durante poquísimos tiempo. Ya se ha comentado que su radio de acción es muy reducido, y a no ser que tengan una gran capacidad de difusión, acostumbran a agredir a las moléculas que tienen a su alrededor, al ser estas las primeras con las que entran en contacto. Por ello las lesiones que producen tienden a compartimentarse. Pero, aunque éstas inicialmente producen efectos locales, las especies reactivas secundarias a ellas y a la degradación de los productos producidos pueden tener efectos distantes al lugar donde se formaron.

Los mecanismos por los que producen lesión tisular son complejos. Por su avidez en captar electrones, pueden actuar sobre cualquier molécula: ácidos nucleicos, proteínas (incluidos todos los enzimas), fosfolípidos (sobre todo los poliinsaturados presentes en las membranas de las células) y los carbohidratos. La reacción inicial genera un segundo radical, el cual puede entonces reaccionar con otras moléculas provocando reacciones en cadena. Debido a que éstas son reacciones químicas espontáneas, las leyes de la termodinámica exigen que la ganancia energética al formarse un nuevo enlace molecular ha de ser mayor que la energía de disociación del antiguo enlace (el radical que se ha formado ha de ser más estable que el antiguo). Una consecuencia de la formación de radicales más y más estables es que la progresión de la reacción en cadena se orienta cada vez más a enlaces “susceptibles”, que requieran poca energía para ser disociados. Esto quiere decir que las especies reactivas del oxígeno tienen preferencia por producir alteraciones en unas determinadas moléculas.

La interacción de las especies reactivas de oxígeno con estas moléculas producirá una modificación estructural, que se traducirá en última instancia en una alteración funcional, como alteraciones en la defensa tisular, o en las interacciones entre las células, inactivación de factores metabólicos esenciales como las pirimidinas (NADPH, NADH), etc.

Lo malo no es que se generen especies reactivas en el organismo, fenómeno que ocurre constantemente en situaciones normales, sino que exista un desequilibrio entre su producción y su eliminación, que es lo que determina que aparezca o no enfermedad. A este efecto que producen las especies reactivas del oxígeno en los organismos vivos se denomina *estrés oxidativo* y no depende sólo de la agresividad química, sino también de la cantidad de éstos y del tiempo de exposición, así como del tipo de tejido que sufra el efecto, y de la defensa de las defensas antioxidantes disponibles, por ello para mantener la homeostasis se requiere una generación continua de la capacidad antioxidante.

Se pueden lesionar diversos tipos de estructuras diana, lo cual depende de la naturaleza del agente reactivo y de su lugar de generación. Como se apuntó previamente, una de las características de las especies reactivas del oxígeno es la tendencia a generar reacciones en cadena, o sea la lesión de unas moléculas puede originar la de otras, lo cual da como resultado una ampliación en el efecto lesivo final.

### *Acciones sobre los lípidos*<sup>165,187,211</sup>

Los lípidos de las membranas celulares contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, ricos en grupos alquilo y cicloalquilo, los cuales son susceptibles de sufrir lesión oxidativa, durante la cual se pueden distinguir tres fases: inicio, propagación y terminación. Las especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa pueden iniciar la peroxidación lipídica: el radical superóxido y peróxido de hidrógeno, y especies derivadas de los anteriores, oxígeno singlete, radicales

hidroperoxilo e hidroxilo<sup>219,220</sup>. Al radical superóxido e hidroperoxilo se les ha implicado tanto en el inicio como en la terminación<sup>212,214</sup>.

El proceso se inicia cuando una especie reactiva del oxígeno con suficiente reactividad, capta un átomo de hidrógeno de un grupo metileno, dejando un electrón desapareado en un carbono de las cadenas laterales de los fosfolípidos de las membranas, las cuales se fragmentan justamente por el carbono que se ha transformado en radical libre. Con ello las estructuras fosfolípicas de las membranas se desorganizan y destruyen, afectando además de a la pared celular, las membranas citosólicas (mitocondrias, núcleo...), con la consiguiente pérdida de su funcionamiento y eventual ruptura, liberándose el contenido de las organelas y de la misma célula. La liberación de enzimas lisosómicos puede además potenciar el daño celular inducido por las especies reactivas del oxígeno.

Durante la propagación, una serie de reacciones en cadena van produciendo sustancias tóxicas, que por sí mismas pueden capturar un átomo de hidrógeno de un ácido graso como el radical alcoxilo, radical peroxilo y productos  $\alpha$ ,  $\beta$  aldehídos insaturados, como el malondialdehído, y el citotóxico y mutagénico 4-hidroxinonal, principal producto de la peroxidación lipídica (provenientes de los hidroperóxidos lipídicos formados en la reducción de los radicales peroxilo, junto con los gases hidrocarburos etano y pentano), el cual a su vez puede lesionar por su tendencia a reaccionar con grupos sulfhidrilo las proteínas de membrana, inactivando receptores, transportadores y enzimas (ver más adelante)<sup>229,230</sup>. Un exceso de hidroperóxidos, por sí mismo ya interfiere en el funcionalismo de la membrana.

La presencia de metales de transición como el hierro o el cobre pueden catalizar la formación de compuestos iniciadores y acelerar la peroxidación lipídica. También se ha sugerido que durante la degradación de los compuestos derivados de la peroxidación lipídica se forma oxígeno singlete, el cual puede contribuir a la reacción en cadena.

Estas reacciones de propagación pueden continuar indefinidamente o pueden terminar por la intervención de un grupo de sustancias eliminadoras de radicales libres, algunas de las cuales son esenciales para la integridad celular, y pueden caer bajo la categoría general de defensas antioxidantes. Otro como el radical hidroperoxilo son radicales libres<sup>214</sup>.

### ***Acciones sobre las proteínas***<sup>230,231,232,233,234</sup>

La susceptibilidad de las proteínas a la acción de las especies reactivas del oxígeno depende de los aminoácidos que la componen, la importancia y localización de los aminoácidos susceptibles que median la conformación y actividad de la proteína, y si el daño puede ser reparado. La localización celular de la proteína y la naturaleza de la amenaza también influye en la magnitud del daño.

Los aminoácidos, péptidos y moléculas de proteína, son susceptibles de sufrir el ataque de las especies reactivas del oxígeno oxidando sus grupos sulhidrilo. Además de la alteración de las cadenas laterales de los aminoácidos, pueden producirse una serie de cambios físicos como la fragmentación de las cadenas polipéptidicas, agregación de las proteínas mediante enlaces cruzados (*cross linking*) covalente y no covalentemente a nivel tanto intra como intermolecular, y alteración de su conformación espacial que las hace muy susceptibles a la degradación proteolítica. Estos procesos oxidativos pueden estar catalizados por metales de transición. Además, la reacción de las especies reactivas del oxígeno con las proteínas también puede generar derivados que amplificarían el daño de la reacción inicial.

Los mecanismos de reparación directa son limitados. Como consecuencia de todo ello se produce una alteración en su funcionalismo.



### ***Acciones sobre los hidratos de carbono***

La producción de ATP está afectada en las dos rutas: glucolítica y oxidativa<sup>235</sup>. Además la autooxidación de la glucosa puede generar radicales libres. Paralelamente la glucosa se puede unir a las proteínas en el grupo amino terminal iniciando la glicación de las mismas dando productos altamente reactivos (productos de Amadori de Maillard,...)<sup>236</sup>.

Tanto la autooxidación como la glicación de proteínas son reacciones extremadamente lentas (requieren días o semanas) y son responsables en gran medida de las interacciones glucosa-proteína, interacciones muy importantes pues la formación y detoxificación de las especies reactivas del oxígeno están moduladas por enzimas (superóxido dismutasa, catalasa,...), disminuyendo la acción de éstas y exagerando los efectos de aquellas.

### ***Acciones sobre el ADN***<sup>217,235,237</sup>

Las especies reactivas del oxígeno, por adición o abstracción, pueden producir alteraciones estructurales en el ADN, como la rotura de una o de las dos hebras y la alteración de las bases que la componen, produciendo la muerte celular y mutaciones. El peróxido de hidrógeno por su gran capacidad de difusión accedería al ADN, dañándolo directa o indirectamente a través de la formación de radical hidroxilo vía reacción de Fenton. En particular, el radical hidroxilo es capaz de fijarse con extraordinaria avidez sobre todo a la timina y la citosina, alterando su estructura y rompiendo las hebras de ADN. De una manera más específica lo hace el oxígeno singlete fijándose sobre los residuos de guanina produciéndose el elemento mutagénico 8-oxo-deoxiguanina. Esto conlleva una replicación defectuosa.

Resumiendo, los radicales libres *per se* y los productos de lipoperoxidación lipídica, por medio de enlaces cruzados desnaturalizan lípidos, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos, causando pérdida de su función.

Todos los componentes celulares son capaces de reaccionar con las especies reactivas del oxígeno. La modificación química de estas moléculas produce alteraciones metabólicas y estructurales de las células, a las cuales en última instancia causan la muerte. La siguiente tabla muestra algunas de las consecuencias derivadas de la acción nociva de las especies reactivas del oxígeno.

**Tabla.3.-Consecuencias de la acción de las especies reactivas del oxígeno**

<b>Componente atacado</b>	<b>Consecuencia</b>
<b><i>“Pequeñas moléculas”</i></b>	
<b>Aminoácidos</b>	Desnaturalización de las proteínas y enlaces cruzados ( <i>cross linking</i> ), inhibición enzimática.
<b>Bases del ácido nucleico</b>	Cambios en el ciclo celular, mutaciones
<b>Carbohidratos</b>	Cambios en los receptores de la superficie celular
<b>Lípidos insaturados</b>	Oxidación del colesterol y ácidos grasos Enlaces cruzados Cambios en la permeabilidad de las membranas de las organelas y de la célula
<b>Cofactores</b>	Disminución en la disponibilidad de la nicotinamida y cofactores que contienen flavina
<b>Neurotransmisores</b>	Disminución en la disponibilidad y actividad de neurotransmisores como serotonina y epinefrina
<b>Antioxidantes</b>	Disminución en la disponibilidad, como el $\alpha$ -tocoferol y el $\beta$ -caroteno
<b><i>Macromoléculas</i></b>	
<b>Proteínas</b>	Escisión de las cadenas peptídicas, desnaturalización
<b>ADN</b>	Escisión de las hebras, modificación de las bases
<b>Acido hialurónico</b>	Cambios en la viscosidad del líquido sinovial

Freeman y Crapo<sup>181</sup>

Debido al potencial dañino de las especies reactivas del oxígeno, las células dependen de unos elaborados mecanismos defensivos, descritos a

continuación, que las metabolice rápidamente previniendo una lesión significativa.

### 1.5.6.- Sistema defensivo antioxidante

170,171,173,209,211,238,239,240,241,242

Una gran cantidad de especies vivas dependen del oxígeno molecular, sin embargo todos los tipos celulares son susceptibles a su toxicidad, la cual está relacionada con las especies reactivas del oxígeno. Por todo ello, es obvio que la primera y mejor defensa es evitar la generación de las mismas. Por ejemplo, la mayor parte del oxígeno que se consume en la respiración celular lo utiliza el sistema de la citocromo oxidasa, el cual lleva a cabo una reducción tetravalente del mismo hasta agua sin producir intermediarios reactivos<sup>243</sup>(reacción 1).

Sin embargo, las especies reactivas del oxígeno se producen continuamente como productos metabólicos en prácticamente todos los tejidos de los organismos aeróbicos en unas cantidades relativamente pequeñas, y presumiblemente en mayor cantidad en las situaciones patológicas, como la insuficiencia renal. Sin una adecuada protección, las células y los tejidos sufrirían continuamente un daño oxidativo significativo.

A menudo el término eliminador (*scavenger*) y antioxidante se utilizan como sinónimos de manera incorrecta, para describir sustancias que descompondrán o inactivarán radicales libres y oxidantes. De hecho el término antioxidante es una amplia descripción de numerosas sustancias de las cuales los eliminadores representan sólo una categoría.

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que donará un electrón a un radical libre inactivándolo, de esta interacción surgirá una especie radical del eliminador, la cual generalmente tiene poca reactividad y por lo tanto es poco dañina. Sin embargo, la interacción de algunos eliminadores con

radicales libres producirá especies radicales bastante reactivas que pueden inactivar enzimas y promover la lesión oxidativa.

Se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante, de prevención en la generación, intercepción una vez formados y reparación del daño oxidativo o eliminación de las moléculas dañadas: formado por eliminadores y neutralizadores no enzimáticos, así como sistemas enzimáticos. Las especies reactivas del oxígeno se pueden producir tanto en los medios acuosos como lipídicos, y para minimizar sus efectos dañinos existen antioxidantes intra y extracelulares, y el que estén tan distribuidos en los seres vivos refleja la enorme importancia de estar a salvo de la oxidación. La regulación de la producción de antioxidantes biológicos está en última instancia bajo control genético, aunque parece que los fenómenos adaptativos (a influencias ambientales) también pueden ser importantes.

Las especies reactivas del oxígeno pueden ser eliminadas mediante sistemas enzimáticos y un sistema no enzimático de pequeñas moléculas. Es lo que se ha denominado *defensas primarias contra el daño oxidativo*. Como regla general la mayor concentración de antioxidantes enzimáticos es intracelular, mientras que la mayor concentración de los antioxidantes no enzimáticos se encuentra en el líquido extracelular. A su vez, los niveles de tanto un tipo de antioxidantes como del otro, varían extraordinariamente de un tejido a otro. Ya que las defensas antioxidantes no pueden ser completamente efectivas en todo momento, se ha desarrollado un sistema de enzimas reparadores que se encarga de eliminar las moléculas dañadas por las especies reactivas del oxígeno. Es lo que se ha denominado *defensas secundarias contra el daño oxidativo*. De manera que todo ello en su conjunto constituye un sistema perfectamente integrado que contrarresta el estrés oxidativo.

## **DEFENSAS PRIMARIAS**

### ***Antioxidantes enzimáticos***

A grandes rasgos se caracterizan por utilizar iones metálicos (hierro, cobre, zinc, manganeso y selenio) como elementos catalíticos esenciales.

#### ***Superóxido dismutasa (SOD)***

El conocimiento de la producción biológica de radical superóxido, y por ende la existencia de la superóxido dismutasa, data de más de tres décadas<sup>196,244</sup>.

La ubicuidad de este enzima en los organismos aeróbicos sugiere que constituye una importante defensa frente a la toxicidad del oxígeno. Sin embargo, aunque uno esperaría encontrar superóxido dismutasa en todos los organismos que toleran el oxígeno, se han encontrado algunas excepciones (*Lactobacillus plantarum*, *Micoplasma pneumoniae*, y una difundida cepa de *Neisseria*) a las que les falta este enzima<sup>198</sup>.

Existen diferentes isoformas de esta metaloenzima, diferenciándose en su estructura y según contenga uno u otro ión metálico en su centro activo, separándose en dos fases filogenéticas dependiendo de la similitud en la secuencia de aminoácidos, pero todas ellas catalizan la misma reacción química (reacción 24) con eficacia comparable<sup>198,245</sup>. Incluye enzimas localizadas en organelas, compartimentos subcelulares, y en pequeñas cantidades en líquidos extracelulares.

Excluyendo algunas excepciones<sup>164,198</sup>, las diferentes superóxido dismutasas se distribuyen en las células eucariotas. La Cu,Zn-SOD de origen eucariota, aunque generalmente se describe como un enzima citoplasmático, también se ha localizado en el espacio intermembrana en la mitocondria<sup>246</sup>, en el núcleo, lisosomas y en los peroxisomas<sup>191</sup>; y la Mn-SOD de origen procariota, si bien se localiza esencialmente en la matriz mitocondrial

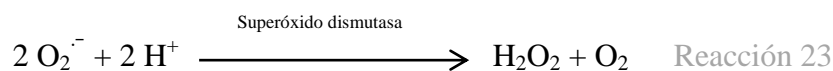
también se encuentra en el citosol, donde según Weisiger y Fridovich<sup>246</sup> tiene lugar su biosíntesis, siendo entonces transportada de alguna manera al interior de la mitocondria. La Cu,Zn-SOD se distribuye principalmente en los tejidos con gran actividad metabólica (hígado, riñón...), y la Mn-SOD en aquellos que el proceso respiratorio es alto (hígado, riñón y miocardio). Existe otro tipo de superóxido dismutasa, estrechamente relacionada con la Mn-SOD que contiene Fe (Fe-SOD), de origen procariota, pero que sólo se encuentra en algunas especies de bacterias y plantas, junto o no, con la Mn-SOD<sup>164,245,198</sup>. Otra es la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD), que también posee cobre y zinc, pero es muy diferente a la forma intracelular<sup>247</sup>. Se secreta al plasma y líquido intersticial, donde es de lejos el isoenzima predominante. A diferencia de la Cu,Zn-SOD y la Mn-SOD, ésta muestra un patrón de distribución diferente, el cual no está relacionado con la actividad metabólica de los tejidos<sup>248</sup>. En los mamíferos el 90-99% de la EC-SOD se localiza en los tejidos, unida probablemente en su mayor parte a los proteoglicanos heparán sulfato en la superficie celular (principalmente del endotelio), en la membrana basal y en la matriz del tejido conectivo, lo cual determina la distribución y retención del enzima *in vivo*. Sin embargo, en algunos casos, puede almacenarse intracelularmente en vesículas secretoras, sin tenerse la certeza que contribuya en la protección contra el radical superóxido<sup>247,249</sup>.

Por tanto, el ámbito de actuación de la superóxido dismutasa es muy amplio, puede hacerlo a nivel extracelular, pero fundamentalmente lo hace en el intracelular en la mitocondria y compartimentos citosólicos.

La regulación de la producción es sensible tanto a la cantidad de oxígeno tisular, como a la producción de radical superóxido intracelular. Se ha demostrado en ratas una mayor síntesis bajo tensiones altas de oxígeno<sup>180,245,198,209,250</sup>.

Su función fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969<sup>244</sup>. Cataliza una reacción de dismutación que consiste en la oxidación de un

radical superóxido a oxígeno molecular y la reducción de otro radical superóxido a peróxido de hidrógeno:



Puede producirse espontáneamente a pH 7,4 y a una  $k^d \approx 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (reacción 10), en cuyo caso se trata de una reacción de segundo orden dependiente de la concentración de radical superóxido, o ser acelerada aproximadamente 10.000 veces ( $k \approx 2,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) por la acción de la superóxido dismutasa<sup>164,251</sup>, siendo esta última una reacción de primer orden, por lo que la vida media del radical superóxido es independiente de su concentración<sup>164,198</sup>.

La dismutación espontánea entre dos aniones superóxido probablemente es tan lenta, porque la repulsión electrostática previene el acercamiento que permitiría la transferencia electrónica. Por lo tanto, el sencillo mecanismo por catálisis de la reacción 24 implicaría alternar la reducción y oxidación del catalizador (SOD) durante los sucesivos encuentros con el radical superóxido. El catalizador de este modo lograría transferir un electrón de un radical superóxido a otro sin la necesidad del acercamiento de ambos aniones. En el caso de la Cu,Zn-SOD, el cobre es el que participa en el ciclo catalítico, y fluctúa entre el estado cúprico y cuproso, mientras el zinc parece tener sólo una función estructural. Los estados trivalente y divalente de los metales son los implicados en el ciclo catalítico de la Mn-SOD y la Fe-SOD<sup>164</sup>.

Por consiguiente actúa protegiendo contra la toxicidad del radical superóxido, disminuyéndola o eliminándola, ya sea ésta directa o derivada de la interacción con otras especies reactivas del oxígeno<sup>245,198</sup>. Se ha descrito además una actividad peroxidasa de la Cu,Zn-SOD<sup>252</sup> que puede

---

<sup>d</sup>Constante de velocidad o velocidad de reacción específica

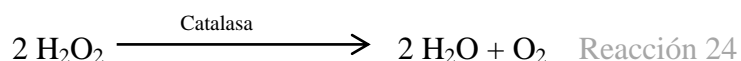
tener efectos perniciosos para las células por catalizar la formación de radicales libres usando eliminadores aniónicos y peróxido de hidrógeno como sustratos<sup>253</sup>.

Debido a la rápida eliminación de radical superóxido, la superóxido dismutasa previene la producción de radical hidroxilo. Sin embargo Yim y cols<sup>254</sup> demuestran que a diferencia de la Mn-SOD, la Cu-Zn-SOD puede generar radical hidroxilo desde peróxido de hidrógeno.

La producción excesiva de superóxido dismutasa puede en ocasiones ser perjudicial<sup>212,214,254,255</sup>.

### *Catalasa*

La producción biológica de peróxido de hidrógeno y la existencia de catalasas y peroxidasas se conoce desde hace más de 120 años. La catalasa es un enzima que contiene hierro (grupo prostético hemo). Cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular:



Actúan sobre todo cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno son altas<sup>256</sup>. Se distribuye ampliamente por los tejidos, localizándose fundamentalmente en los peroxisomas, aunque también se ha descrito su presencia en la mitocondria del corazón, pero no en la de otros tejidos incluido el músculo esquelético<sup>180</sup>. Su actividad varía no tan sólo según el órgano estudiado, sino en la misma célula.

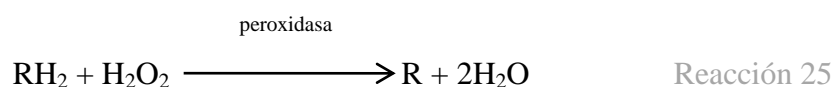
Algunas células estimulan la producción de catalasa ante incrementos en la producción de peróxido de hidrógeno.



Como en el caso de la superóxido dismutasa la vida media de la catalasa también es corta, y al igual que la anterior debe producirse continuamente. Su actividad en el medio extracelular es insignificante.

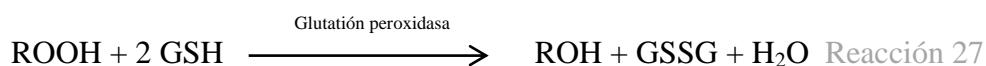
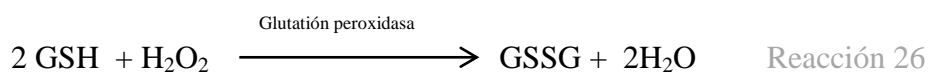
### *Peroxidasa*

Al igual que la catalasa también puede contener hierro. Reduce el peróxido de hidrógeno a agua, y utilizan una gran variedad de donadores de electrones para tal propósito.



### *Ciclo redox del glutatión*

Las glutatión peroxidasas son más importantes que la catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno en el ser humano, ya que actúan ante niveles bajos de éste. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos lipídicos a agua en el primer caso, y alcoholes estables y agua en el segundo, mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG)

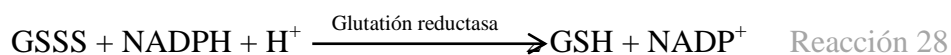


Hay dos tipos de glutatión peroxidasa, una que contiene selenio y otra que no lo posee, catalizan ambas reacciones aunque con diferente selectividad. La que contiene selenio reduce tanto el peróxido de hidrógeno como los

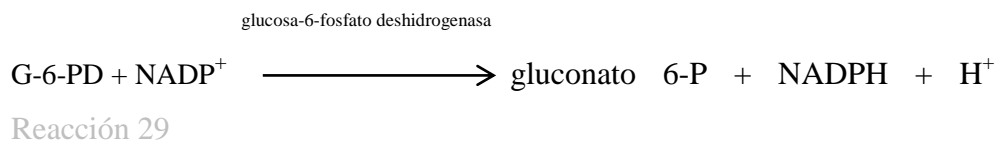
hidroperóxidos orgánicos. La glutatión peroxidasa que no contiene selenio utiliza sobre todo los hidroperóxidos como sustrato.

Las poseen la mayoría de las especies aerobias. A nivel intracelular se localizan en el citosol y en la matriz mitocondrial.

La reacción de reducción del GSH, catalizada por la glutatión reductasa (GSR) se encarga de regenerar el GSH consumido, y es la clave en la defensa antioxidante.



La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) cataliza la regeneración del  $\text{NADP}^+$ , en la vía de las pentosas fosfato.



Las glutatión S-transferasas constituyen un grupo de enzimas que participan en la neutralización de radicales libres y utilizan como cofactor a GSH.

Estos tres sistemas enzimáticos (superóxidos dismutasas, catalasa y peroxidasas) se protegen entre sí cuando se produce radical superóxido y/o peróxido de hidrógeno. Tienen por ello una acción sinérgica.

El radical superóxido inactiva la catalasa, a la que transforma accediendo al hierro, al estado poco activo ferroxí, y por convertir el compuesto intermedio preferril al estado inactivo ferril. A su vez, las peroxidasas que poseen hierro, también son inhibidas por conversión del mismo a la forma ferroxí. Por lo tanto, la superóxido dismutasa protege a la catalasa y a la peroxidasa contra su inactivación<sup>255</sup>.

Al mismo tiempo, el peróxido de hidrógeno puede inactivar a la superóxido dismutasa, acción prevenida por las catalasas y peroxidasas.

Como se ha apuntado anteriormente la Cu,Zn-SOD puede generar radical hidroxilo desde peróxido de hidrógeno<sup>254</sup>, lo cual se favorecerá por un incremento en los niveles de superóxido dismutasa o una disminución en la de catalasa y peroxidasas. Por tanto es esencial que las células posean unos niveles equilibrados entre los tres enzimas, constituyendo un equipo defensivo al respaldarse mutuamente<sup>181,198,252,255</sup>.

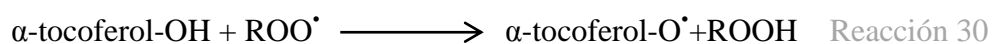
### *Antioxidantes no enzimáticos*

Se pueden subclasificar en antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, lo cual permite proteger a todos los compartimentos del organismo. Hay interrelaciones importantes entre estos dos sistemas.

#### *$\alpha$ - tocoferol<sup>257</sup>*

El  $\alpha$ -tocoferol es el antioxidante liposoluble más efectivo e importante. Su concentración en los tejidos es más bien baja<sup>258</sup>. Se encuentra en las diversas membranas celulares, lipoproteínas plasmáticas y fluidos extracelulares como el alveolar. Actúa interrumpiendo las reacciones en cadena de autooxidación, al transformarse en un radical estable (no reactivo), neutralizando los radicales peroxilo y alcoxilo.

El átomo de hidrógeno del grupo hidroxílico fenólico del  $\alpha$ -tocoferol es fácilmente eliminable. De este modo, los radicales peroxilo y alcoxilo formados durante la peroxidación lipídica, se combinan con el  $\alpha$ -tocoferol en lugar de con otro ácido graso generando un hidroperóxido orgánico y el radical tocoferol ( $\alpha$ -tocoferol $\cdot$ ), el cual es bastante estable y muy poco reactivo, por lo que se corta la reacción en cadena.



Sin embargo el  $\alpha$ -tocoferol debe su potencial antioxidante no sólo a sus propiedades químicas, sino también a su movilidad y accesibilidad dentro de la membrana.

Aunque el  $\alpha$ -tocoferol es un antioxidante liposoluble, el grupo hidroxilo de su núcleo está expuesto a la fase acuosa. Por lo tanto, es posible la interacción entre las especies reactivas del oxígeno y el  $\alpha$ -tocoferol.

El radical tocoferol puede emigrar a la superficie de la membrana y reconvertirse en  $\alpha$ -tocoferol reaccionando con el ácido ascórbico<sup>259</sup>. Tanto el ácido ascórbico como el  $\alpha$ -tocoferol parecen reducir al mínimo los efectos de la peroxidación lipídica en las lipoproteínas y en las membranas, si el proceso ha comenzado. Los tioles como el glutatión reducido (GSH), también pueden reaccionar con los radicales tocoferol y regenerarlos a tocoferol, y de forma inversa, los tocoferoles también pueden reparar los radicales tiol. Otro modo de regeneración se describe más adelante (reacción 34) al comentar las ubiquinonas.

En contraposición, una alta concentración de vitamina E puede generar radicales libres actuando como prooxidante:



#### *Ácido ascórbico (Vitamina C)*

Vitamina hidrosoluble que se encuentra ampliamente distribuida en los fluidos intra y extracelulares. Entre sus muchas acciones antioxidantes descritas, destaca que actúa como un agente reductor u oxidante, reacciona directamente con los radicales superóxido, hidroperóxido, hidroxilo, diversos hidroperóxidos lipídicos, oxígeno singlete y ácido hipocloroso. Interactúa con el radical tocoferol para reconvertirlo en  $\alpha$ -tocoferol<sup>259</sup>.

El radical dehidroascorbato (vitamina C<sup>•</sup>) es poco reactivo y en consecuencia en él suelen acabar las reacciones en cadena. Por disprotonación se produce vitamina C y deshidroascorbato (DHA)



Además, bajo ciertas condiciones el radical deshidroascorbato puede ser reducido enzimáticamente por el sistema dependiente de NADPH (NADH reductasa)<sup>259</sup>.

Paradójicamente la vitamina C también posee propiedades prooxidantes. Durante la oxidación de ésta se forma peróxido de hidrógeno:



Cantidades excesivas de vitamina C también pueden actuar como prooxidante en presencia de metales de transición (hierro, cobre...), induciendo a la peroxidación lipídica por su capacidad de reducir el Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, el cual es un potente inductor de la formación de radicales libres.

Las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico predominarán en condiciones normales debido al efecto secuestro (ej. almacenamiento por parte de la ferritina) de los iones metálicos de transición, cosa que puede no ocurrir en caso de enfermedad, situación en la que estarían más disponibles.

#### *Glutación reducido (GSH)*

El glutación reducido, es un tripéptido (glutamato, cisteína y glicina) ampliamente distribuido a nivel celular. Es el elemento central de muchos sistemas detoxificadores, ya que es sustrato de glutación peroxidasas, transferasas y otros enzimas diversos. Además tiene un importante papel

como neutralizador de radicales libres, en el metabolismo de diversos fármacos, etc.

Muchas de estas funciones fisiológicas derivan de sus propiedades químicas especiales. Contiene un grupo tiol (SH) y un enlace  $\gamma$ -glutamilo que es resistente a la degradación por las peptidasas normales, las cuales sólo actúan sobre los enlaces  $\alpha$ -amino-acilo. El enlace entre el glutamato y la cisteína sólo es hidrolizable por la enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, presente en la membrana plasmática.

Los grupo tiol son muy importantes en la protección contra los efectos perniciosos de las especies reactivas del oxígeno, ya que reaccionan fácilmente con ellas. Esta propiedad es consecuencia de la baja energía del enlace SH, inferior a la de casi todos los enlaces C–H y O–H. La reacción de los tioles con los radicales es tan rápida que se le considera de control por difusión. Es decir, la etapa lenta de la reacción viene dada por la velocidad a la cual el radical y la sustancia con del grupo tiol son capaces de difundir para encontrarse en el medio. Una vez se han encontrado casi siempre reaccionan.

Por ello es un cofactor esencial en diversos mecanismos enzimáticos (ver “ciclo redox del glutatión”). El glutatión reducido interactúa de manera directa y con facilidad con los radicales libres, especialmente con los hidroxilos y radicales orgánicos, donando un átomo de hidrógeno. Cuando el GSH se oxida, se forma GSSG, formado por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las dos cisteínas.

Los grupos SH tienen importancia funcional en muchas proteínas y para protegerlos es necesario el GSH. Además tiene una actividad importante en el metabolismo xenobiótico y en la síntesis de leucotrienos. Puede también ayudar en el reciclaje del radical tocoferol.

Al igual que las vitaminas E y C, puede tener tanto acciones antioxidantes como oxidantes. El glutatión puede donar el átomo de hidrógeno de los

grupos SH, produciéndose radicales GS<sup>•</sup> en vez de GSH. Estos átomos pueden reaccionar con el oxígeno y pueden producir radicales oxisulfuro, potencialmente dañinos como el RSO<sup>•</sup> y RSO<sup>•</sup>.

Además el GSH puede inhibir la actividad de la catalasa de manera dosis dependiente<sup>260</sup>.

### *Carotenos*

Los carotenos, sustancias relacionadas con la vitamina A, representan otro de los sistemas antioxidantes utilizado por nuestro organismo. Se encuentran en las membranas a una concentración más baja que la de los tocoferoles. Debido a su gran liposolubilidad, actúan prioritariamente en los compartimentos más hidrófobos, en los que penetran con gran facilidad. El  $\beta$ -caroteno es su representante más destacado, especialmente eficaz para neutralizar el oxígeno singlete, disipa su energía sin producir lesión celular. El  $\beta$ -caroteno también puede actuar tanto como antioxidante como prooxidante. A pequeñas presiones parciales de oxígeno (< 150 Torr), muestra una excelente actividad, sin embargo a altas presiones parciales de oxígeno, muestra un efecto prooxidante, autocatalítico con la consiguiente pérdida de su actividad antioxidante.

### *Otros antioxidantes no enzimáticos*

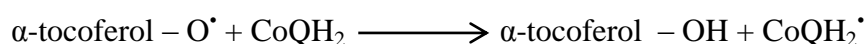
*Ácido úrico:* aunque la capacidad de éste para sufrir oxidaciones es un hecho conocido por los químicos orgánicos desde hace más de 150 años, tradicionalmente se la ha considerado un producto final del metabolismo de las purinas, metabólicamente inactivo y sin valor fisiológico. Sin embargo, esta ubicua molécula presente en cantidades significativas en los tejidos y fluidos corporales, a concentraciones fisiológicas es otro elemento con capacidad antioxidante. Protege por unirse a los metales de transición, y además neutraliza al radical hidroxilo, superóxido, oxígeno singlete, ácido

hipocloroso y radicales peroxilo y alcoxilo, aunque tras ello queda oxidado pudiendo producir daño oxidativo. La forma radical libre del ácido úrico puede ser reducida por el ácido ascórbico<sup>238,261</sup>.

*Coenzima Q<sup>262</sup>(ubiquinonas)*: es una molécula extremadamente versátil, implicada en una gran número de procesos celulares, aunque relacionados entre sí. En las mitocondrias participa en la respiración, en el sistema de transferencia de electrones que conduce en última instancia a la producción de ATP.

Experimentos a diversos niveles (sistemas subcelulares, animales intactos, humanos), apoyan el hecho de que la coenzima Q, principalmente en su estado reducido (ubiquinol), puede actuar como un antioxidante de las membranas celulares. Asienta el concepto que durante la evolución de las especies aeróbicas, se la seleccionó para proteger los diversos tipos de membranas en las que se halla, del daño producido por los radicales libres.

También se ha discutido que pueden actuar como antioxidantes proporcionando átomos de hidrógeno para reducir los radicales peroxilo y/o alcoxilo, así como a través de un mecanismo de oxidorreducción, entre la forma reducida de la coenzima Q (CoQH<sub>2</sub>) y el radical  $\alpha$ -tocoferol, regenerándose a  $\alpha$ -tocoferol, en la mitocondria.



Reacción 34

Como consecuencia se genera otro radical, el CoQH<sub>2</sub><sup>•</sup>, el cual puede ser reciclado por la cadena de transporte electrónico mitocondrial protección contra la mencionada lesión<sup>263</sup>.

*Glucosa*: además de su función principal como sustrato para la producción de energía en las células de los mamíferos, también tiene un papel como antioxidante. A concentraciones fisiológicas se comporta como un eliminador de radical hidroxilo<sup>264</sup>. Otros carbohidratos como la fructosa,



galactosa, el extensamente utilizado manitol, etc., también son capaces de actuar como eliminadores de radical hidroxilo. Aunque antioxidantes débiles, su aportación cobra mayor relevancia si se presentan a altas concentraciones. No obstante, a la hiperglucemia se la ha implicado en la producción de radicales libres<sup>265</sup>.

*Bilirrubina:* es un pigmento biliar producido por el catabolismo del grupo hemo. La *albúmina* la transporta en el plasma, y en condiciones fisiológicas ambas pueden actuar como antioxidante. La bilirrubina unida a la albúmina, a concentraciones equimolares, compite con el ácido úrico por los radicales peróxido, pero es menos eficiente que la vitamina C en eliminarlos. Protege a los ácidos grasos transportadores por la albúmina<sup>266</sup>.

#### *Otras defensas antioxidantes (secuestradores de iones metálicos)*

Además de los eliminadores de especies reactivas del oxígeno, el grupo de los antioxidantes incluye ciertos quelantes del hierro y el cobre como la transferrina, lactoferrina, ferritina, ceruloplasmina y albúmina, así como proteínas que se unen con grupos hemo.

Aunque estos compuestos no actúan directamente sobre las especies reactivas del oxígeno, son por definición antioxidantes ya que se unen con metales con actividad redox, por lo tanto previniendo o limitando la toxicidad derivada de los primeros<sup>188</sup>. Son la principal defensa antioxidante en el plasma<sup>238</sup>. Así, si no hay iones metálicos disponibles, entonces el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden tener limitada, su capacidad para producir efectos dañinos.

Los metales de transición promueven reacciones en las que se producen especies reactivas del oxígeno<sup>187,188</sup>. Los organismos tienen mucho cuidado con el manejo del hierro. Para minimizar la cantidad de hierro libre en el líquido extracelular y dentro de las células, utilizan proteínas tanto para su transporte (ferritina, hemosiderina). Las 2/3 partes de los 4 gramos de hierro de una persona adulta se encuentran almacenados en la hemoglobina, un

10% en la mioglobina, y el resto en una porción de enzimas que poseen hierro y en la transferrina. De modo similar, el cobre plasmático se une a la ceruloplasmina o a la albúmina, y por tanto es más difícil que estimule las reacciones de radicales libres.

La glicoproteína *transferrina* es el mayor transportador plasmático de hierro del organismo, ya que éste es prácticamente insoluble (dos moles  $\text{Fe}^{3+}$  por mol de proteína). En condiciones normales ésta sólo se encuentra saturada en un 30% por lo tanto la concentración plasmática de hierro libre es casi nula, por lo que no estarán disponibles para catalizar las reacciones de radicales libres en el plasma normal. Un pH ácido favorece la liberación de hierro de la transferrina, circunstancias que se puede observar en los tejidos hipóxicos.

La proteína *lactoferrina*, al igual que la anterior puede unirse a dos moles  $\text{Fe}^{3+}$  por mol de proteína, con la particularidad de que lo hace a valores de pH tan bajos como 4,0. Presente en las secreciones, en la leche y liberada por los neutrófilos, también puede actuar como antioxidante.

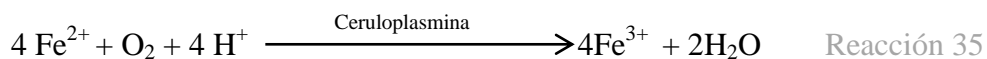
En la célula la *ferritina* almacena el hierro no metabolizado, aunque ésta también se encuentra en el compartimento extracelular. Aunque normalmente sólo se encuentra saturada en un 20% tiene una gran capacidad (hasta 4500 iones  $\text{Fe}^{3+}$  por molécula de apoferritina) lo que representa la principal provisión de hierro fácilmente disponible. Incluso cataliza la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  para su almacenamiento, mediante una actividad ferroxidasa. Esta unión previene la participación del hierro en la reacción de Fenton. El hierro que se libera desde la ferritina requiere la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , lo que puede ser llevado a cabo por el óxido nítrico<sup>267,268</sup> o el radical superóxido<sup>268,269</sup>. También se ha implicado al peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y al radical hidroxilo<sup>188</sup>. Las catecolaminas como la adrenalina o noradrenalina también son capaces de liberar, sobre todo en condiciones anaeróbicas, el hierro de la ferritina<sup>270</sup>. La xantina deshidrogenasa, que no tiene capacidad ferroxidasa, está implicada en la movilización del hierro desde las reservas de ferritina. Igualmente, ya sea en condiciones aeróbicas

o anaeróbicas, la xantina oxidasa mediante un mecanismo independiente a la producción de radical superóxido (aunque en condiciones aeróbicas éste representaría el 70%) puede liberar hierro posiblemente mediante una transferencia electrónica directa desde la xantina oxidasa a la ferritina<sup>269</sup>. A un pH de 6 el hierro se disocia de la ferritina.

La *glicil-L-histidil-L-lisina* es un tripéptido plasmático unido a cobre (GHK:Cu(II)), aunque no está considerado un secuestrador de iones metálicos, su efecto beneficioso viene dado por la capacidad de inhibir la liberación de hierro de la ferritina mediante un bloqueo físico de los canales por los que éste se libera<sup>267</sup>.

Las *haptoglobinas* son proteínas plasmáticas que se unen a la hemoglobina liberada al medio extracelular, y las *hemopexinas* lo hacen con los grupos hemo, con el consiguiente efecto protector. Los complejos hemoglobina-haptoglobina y hemo-hemopexina son complejos poco activos en estimular reacciones de radicales libres, además rápidamente son eliminados de la circulación.

La glicoproteína plasmática *ceruloplasmina* tiene una función esencial en el metabolismo del hierro como un enzima ferroxidasa. Cataliza la oxidación de hierro ferroso a ferrico (susceptible de unirse a la transferrina) previniendo la reacción de Fenton, mientras reduce el oxígeno a agua<sup>184</sup>.



Así, a diferencia de la oxidación enzimática, la oxidación del hierro ferroso catalizado por la ceruloplasmina no produce especies reactivas del oxígeno, lo cual puede considerarse la principal de las acciones antioxidantes de este enzima. Aunque de menor importancia, la ceruloplasmina también tiene capacidad de reaccionar con el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido, aunque en este último caso a menor velocidad que la superóxido dismutasa ( $k = 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

También se ha observado que la ceruloplasmina es capaz de incorporar hierro a la apoferritina<sup>268</sup>.

El cobre, además del hierro, también está implicado en la formación de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno<sup>186,187</sup>. La mayor parte del cobre plasmático (95%) se halla unido fuertemente a la ceruloplasmina (6 ó 7 moles de cobre por mol de proteína), y el que no lo está lo hace a la *albúmina* casi en su totalidad. Esta unión puede dañar a la albúmina, pero no tiene importancia si se tiene en cuenta las altas concentraciones de ésta y su rápido recambio. Evita que los iones de cobre puedan unirse a lugares más comprometedores como por ejemplo, los grupos sulfhidrilo de las proteínas de membrana celular y producir lesión oxidativa al interactuar por ejemplo con el peróxido de hidrógeno<sup>186</sup>.

Además, la mayoría de compuestos con grupos tiol, tienen el potencial de eliminar radicales libres. La albúmina proporciona una rica fuente de grupos tiol en los líquidos extracelulares, aunque la albúmina por sí sola reacciona casualmente con el radical hidroxilo, teniendo un efecto menor<sup>189</sup>. Cuando al cobre se une la albúmina, el radical hidroxilo formado alrededor reacciona inmediatamente con ésta. Esta proteína también elimina el ácido hipocloroso en el plasma. La albúmina oxidada es rápidamente eliminada de la circulación y degradada.

Así pues, retener los iones metálicos es una defensa antioxidante importante, ya que estos no pueden estimular la formación de radicales hidroxilo, y por consiguiente el estrés oxidativo. Además, este secuento permite utilizar el radical superóxido y al peróxido de hidrógeno para propósitos metabólicos, sin que logre hacer demasiado daño a los tejidos, siempre y cuando la cantidad de especies reactivas del oxígeno no llegue a ser suficiente para producir una lesión directa y/o movilizar los iones metálicos de sus lugares de almacenamiento.

### *Antioxidantes exógenos*

Además de estas defensas naturales contra el estrés oxidativo, se han desarrollado una amplia variedad de antioxidantes sintéticos<sup>268,271</sup>.

Antes de que una sustancia pueda considerarse útil como antioxidante y/o eliminador de radicales libres, es necesario que cumpla tres prerequisites. Primero, el compuesto debe tener la facultad de interactuar con oxidantes y radicales libres biológicamente relevantes. Segundo, dado que estas interacciones pueden producir modificaciones químicas en el eliminador, el producto resultante debe ser menos dañino que el producto eliminado. Y finalmente, la sustancia propuesta debe presentarse a una concentración suficientemente alta, al menos en algunos compartimentos celulares para asegurar una reacción relevante desde el punto de vista cuantitativo.

### **DEFENSAS SECUNDARIAS**

Ya que las defensas antioxidantes no son completamente efectivas en todo momento, se ha desarrollado un sistema de enzimas reparadores que se encarga de rehabilitar las proteínas dañadas por las especies reactivas del oxígeno, extraer los ácidos grasos oxidados de los fosfolípidos y reparar el ADN oxidado. Las moléculas excesivamente dañadas no se reparan para minimizar la introducción de mutaciones.

Las *defensas secundarias* incluyen:

- Enzimas lipofílicas (fosfolipasas), que serían las responsables de la reconstrucción de los constituyentes de la membrana dañados o alterados. La predilección de la fosfolipasa A<sub>2</sub> por los lípidos oxidados puede proporcionar a las células un mecanismo protector adicional contra la peroxidación lipídica.

- Las células poseen un sistema de enzimas con capacidad para reparar directamente los polipéptidos moderadamente dañados reconstituyendo su estructura. Uno de estos sistemas, muy abundante, es la reducción de los puentes disulfuro oxidados. Si las proteínas han sido dañadas de manera más grave, las enzimas proteolíticas (proteasas, peptidasas) las degradan e su mayoría, previniendo de esta manera su acumulación en la célula.
- Enzimas reparadoras del ADN. La mayoría de las células poseen diversos tipos de endonucleasas que específicamente reconocen diferentes modificaciones, provocadas por las especies reactivas del oxígeno (radical hidroxilo, oxígeno singlete) u otros agentes como la radiación ultravioleta. Otras enzimas reparadoras del ADN son la exonucleasa, la ligasa, y la ADN glicosilasa.



## ***2.-Hipótesis de trabajo***





La principal causa de morbi-mortalidad en la población con enfermedad renal crónica es la enfermedad cardiovascular. Los factores clásicos predictivos están ampliamente presentes en esta población, pero no tienen potencia suficiente para justificar la alta incidencia de esta patología.

El estrés oxidativo, fruto del desequilibrio entre el ataque oxidante y la defensa antioxidante emerge como concepto unificador de los múltiples factores causales descritos en esta población.

Las técnicas de sustitución renal, hemodiálisis y diálisis peritoneal, han permitido desde hace más de cuatro décadas la supervivencia de los enfermos con fracaso renal crónico, pero no han conseguido aminorar la incidencia de eventos cardiovasculares.

La *hipótesis de trabajo* se basará, por tanto, en la confirmación de que en la enfermedad renal crónica existe un desequilibrio entre factores oxidantes y antioxidantes generando un estado de estrés oxidativo y de que, si existen diferencias significativas entre las distintas situaciones de ERC (Prediálisis (Pre-D), HD y DP), se podrán cuantificar e intentar establecer la influencia de las técnicas de diálisis en el control del balance oxidativo.



### ***3.-Objetivos***



### **3.1.- Principal**

Valorar mediante el análisis de parámetros pro-oxidantes y antioxidantes la cuantía del desequilibrio oxidativo en tres poblaciones diferentes de insuficiencia renal crónica, y el efecto que sobre él tienen las técnicas de sustitución renal.

### **3.2.- Secundarios**

Valorar:

- El impacto de la diabetes, antecedentes de cardiopatía isquémica o enfermedad cerebrovascular como factores clásicos de riesgo cardiovascular sobre el estrés oxidativo.
- La posible relación del estrés oxidativo con el filtrado glomerular en el grupo Pre-D.
- La influencia del tiempo de permanencia en la técnica de diálisis o la función renal residual en el grupo DP sobre el estrés oxidativo.
- La influencia de la edad en el desarrollo del estrés oxidativo.



## ***4.-Pacientes***





#### 4.1.- Reclutamiento de pacientes

Estudiamos tres grupos de pacientes, todos ellos pertenecientes al Servicio de Nefrología del Hospital Clínico Universitario de Valencia entre los años 2007-2009:

- **Grupo Prediálisis (Pre-D)**: 32 pacientes con Enfermedad Renal Crónica en estadio 4 y 5.
- **Grupo Hemodiálisis (HD)**: 30 pacientes en programa de Hemodiálisis periódica.
- **Grupo Diálisis Peritoneal (DP)**: 31 pacientes en Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria.

Además contamos con un grupo **control** compuesto por 67 sujetos, estables clínicamente, sin diagnóstico previo de HTA, diabetes mellitus, dislipemia, insuficiencia renal u otra patología crónica conocida.

Todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de formar parte del estudio.

#### 4.2.- Criterios de inclusión

En los tres grupos de estudio los pacientes debían tener los siguientes requisitos:

- estabilidad clínica en los últimos tres meses previos y
- no haber recibido tratamiento con hierro intravenoso en el último mes.

En los grupos que recibían terapia sustitutiva renal:

- tiempo mínimo de permanencia en la técnica de seis meses previos al estudio.
- Los pacientes del grupo HD debían seguir una pauta convencional de tres sesiones semanales de al menos cuatro horas de duración cada una de ellas, dializarse a través de fistulas arteriovenosas nativas, con

membranas de alta permeabilidad (poliacrilonitrilo o polietersulfona entre 1.65 y 1.8 m<sup>2</sup> de superficie),

- Los pacientes en DP seguir una pauta convencional de cuatro recambios diarios.
- Para asegurar que todos los pacientes recibían una dosis de diálisis adecuada, los pacientes del grupo HD debían tener un  $Kt/V \geq 1.3$  y los de DP un  $Kt/V$  semanal  $\geq 1.8$ , en los controles habituales realizados en estos seis meses previos del estudio.

#### **4.3.- Criterios de exclusión**

Fueron excluidos del estudio aquellos con signos de inestabilidad clínica: enfermedad neoplásica, sangrado activo, enfermedad inflamatoria o infecciosa activa.

No se incluyeron en el estudio pacientes que recibían HD a través de catéter ni aquellos portadores de fístula protésica.

No se incluyeron pacientes que hubieran recibido una transfusión los 15 días previos a la toma de las muestras.

## ***5.-Metodología***



Se trata de un estudio observacional sobre un corte transversal en población con ERC. La metodología del estudio fue la siguiente:

### **5.1.- Revisión de Historias Clínicas**

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes, registrando sus datos demográficos, etiología de la enfermedad renal, antecedentes de hipertensión arterial, dislipemia, diabetes mellitus, cardiopatía isquémica (definida por tener antecedentes de infarto de miocardio, angina o prueba de imagen positiva para isquemia miocárdica), o accidente cerebrovascular.

Se consideraron dislipémicos o hipertensos los pacientes que presentaban este diagnóstico en la historia clínica, independientemente de las cifras de lípidos o de tensión arterial que presentaran en el momento de la toma de las muestras sanguíneas.

En los pacientes en diálisis, se registró fecha de entrada en la técnica y la media de los últimos seis meses de los registros de Kt/V sesión en el grupo HD y Kt/V semanal en el grupo DP.

### **5.2.- Toma de las muestras**

Las muestras de sangre se extrajeron tras 12 horas de ayuno, siempre antes de la segunda sesión semanal en el grupo HD. Se tomaron muestras para hemograma y *screening* bioquímico que incluía: urea, creatinina, colesterol total y fracciones, triglicéridos, proteínas totales, albumina, homocisteína, fibrinógeno y PCR as (Proteína C Reactiva de alta sensibilidad).

Para las determinaciones de parámetros de estrés oxidativo se extrajeron mediante vacutainer 14 ml de sangre en tubo con EDTA como anticoagulante. Estas muestras fueron inmediatamente centrifugadas, separando suero y plasma.

### 5.3.- Cálculo de la Función Renal

En los pacientes en Prediálisis se midió la función renal mediante la estimación del Filtrado Glomerular por la fórmula MDRD-4 abreviada según la siguiente expresión:

$$186,3 \times \text{Cr(s)}^{-1,154} \times \text{edad}^{-0,203} \times (0,742 \text{ si mujer})$$

En los pacientes en Diálisis Peritoneal se calculó la función renal residual (FRR), mediante la media del aclaramiento de urea y creatinina según aconsejan las guías de práctica clínica.

Sólo un 15% de los pacientes en el grupo HD presentaba diuresis superior a 200 ml/día por lo que el estudio de la FRR en este grupo se desestimó.

### 5.4.- Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras para analítica estándar se realizó en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Todas las determinaciones analíticas de parámetros de estrés oxidativo se realizaron en la Unidad de Toxicología Metabólica que dirige el Dr. Guillermo Sáez Tormo, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Valencia.

En el Anexo 1 se indica el material de laboratorio utilizado para el análisis del estrés oxidativo.

### 5.5.- Metodología de trabajo para la medición del estrés oxidativo

Se aislaron las células mononucleares por centrifugación de Ficoll-Hypaque<sup>272</sup> (Sigma) seguido de tres lavados con solución salina. Parte de las células mononucleares aisladas se usaron para el análisis inmediato y del resto se obtuvo un pellet que se conservó a -80°C hasta el posterior aislamiento del DNA.

El DNA nuclear se aisló siguiendo el método de Gupta con la modificación descrita por Muñiz et al<sup>273</sup> en la cual se usa el alcohol cloroformo isoamil (24:1) en lugar del fenol para la eliminación de proteínas.

La cuantificación de ADN obtenidos de las extracciones se realizó mediante espectrofotometría, diluyendo la muestra 1/100 en tampón TE (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA) y midiendo la absorbancia de la dilución a dos longitudes de onda distintas:

- 260 nm: longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos.
- 280 nm: longitud de onda a la que se obtiene el pico de máxima absorbancia para las proteínas.

La relación entre las lecturas a 260nm y a 280nm nos sirve para determinar la pureza de la extracción. Si este cociente es superior a 1,8, la pureza de ADN se considera aceptable, si no es así la muestra es descartada.

Para determinar la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \epsilon \times \text{factor de dilución.}$$

El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del ADN es 50.



### 5.5.1.- Productos derivados de la oxidación molecular

#### 5.5.1.1.- *Determinación de GSH (Glutation reducido), GSSG (glutation oxidado) y MDA (malonildialdehído).*

Los niveles de GSH, GSSG y MDA fueron medidos, tras su extracción, utilizando columnas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en células mononucleares aisladas mediante centrifugación con Ficoll-Hypaque (Sigma).

El contenido de GSH de las células fue determinado con el método de Ursini<sup>274</sup> : en las células mononucleares de nuestros pacientes se partió de 50 µl de muestra a la cual se le añadieron 50 µl de tampón PCA (ácido perclórico) GSH 12 % y la mezcla se centrifugó durante 5 min a 10.000 rpm. Transcurrido este tiempo, al sobrenadante obtenido se le añadieron 20 µl de metacresol 10 mM (colorante).

Seguidamente, se ajustó el pH con KOH (hidróxido de potasio) 3M hasta obtener un pH 10 en el que la muestra vira a color violeta. Para medir el pH se utilizaron tiras de pH (Riedel-de Häen).

Una vez ajustado el pH, a la muestra se añadieron 300 µl de fluoronitrobenzeno 1 % (FDNB) y se incubó en oscuridad durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, la muestra se conservó a 4 °C hasta su procesamiento mediante HPLC.

Antes de realizar la determinación mediante HPLC la muestra se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm y el sobrenadante se pasó a viales para HPLC.

Para la construcción de la recta patrón, se procesaron patrones de GSH de concentraciones conocidas (de 6.25 nmoles a 100 nmoles de GSH) y se analizaron por HPLC previamente a las muestras. Para el análisis mediante HPLC se empleó una columna Waters ODS S5 NH<sub>2</sub> (0.052, 25 cm) y un flujo de 1 ml/min, y se siguió el método descrito por Espinosa y cols<sup>275</sup>.

Para el análisis del glutatión oxidado (GSSG), las muestras fueron tratadas con N-etilmaleimida y disulfonato de batofenantrolina, derivatizado y analizado por HPLC como describieron Navarro y cols<sup>276</sup>. Se partió de un volumen de 50 µl de la misma a la cual se le añadieron 50 µl del tampón PCA GSSG 6 %.La

suspensión celular obtenida se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se trasvasó a un nuevo eppendorf y se le añadieron 50 µl del colorante metacresol 10 mM. Para una determinación adecuada, se ajustó el pH a 10 con la ayuda de KOH 3M. Para medir el pH se utilizaron tiras de pH (Riedel-de Häen). Llegados a este punto, se añadieron 300 µl de FDNB 1 % (fluorodinitrobenzeno) a las muestras y se incubaron durante 4 h en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se dejaron desecar durante toda la noche en estufa seca a 50°C (Theroven selecta). Al día siguiente, se resuspendieron con 300-400 µl de metanol al 80 % y se centrifugaron durante 5 min a 10.000 rpm. El sobrenadante se colocó en viales para HPLC para su determinación.

Para la construcción de la recta patrón, se procesaron patrones de GSSG de concentraciones conocidas (de 3.125 nmoles a 50 nmoles de GSSG y se analizaron por HPLC previamente a las muestras.

Para el análisis mediante HPLC se utilizó una columna Waters ODS S5 NH<sub>2</sub> (0.052, 25 cm) y un flujo de 1 ml/min y se siguió el método descrito en Espinosa y cols<sup>275</sup>.

Los niveles de MDA fueron analizados por HPLC<sup>184</sup> y la concentración de proteína fue cuantificada por el método Lowry<sup>277</sup>.

#### *5.5.1.2.-Determinación de 8-oxo-deoxiguanosina en ADN nuclear y mitocondrial*

El ADN aislado se lavó 2 veces con etanol al 70%, almacenado a -20°C, se secó y resuspendió en 200 µL de Tris 10 mM, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl (pH 7.0) para su digestión enzimática. La primera digestión consiste en añadirle, a 200 µg totales de ADN, 100 U de DNasa I en 40 µL Tris 10 mM y 10 µL de MgCl<sub>2</sub> 0.5 M (concentración final de 20 mM) y se incubó 1 h a 37°C. En el siguiente paso, el pH de la mezcla de reacción se baja a 5.1 mediante la adición de 15 µL de acetato sódico 0.5 M pH 5.1.

Posteriormente, se añaden 10  $\mu\text{L}$  de nucleasa P1 (5 U) y 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{ZnSO}_4$  10 mM (concentración final de 1mM), y la mezcla fue incubada durante 1 h a 37°C. Después de neutralizar el pH de la mezcla de reacción con 100  $\mu\text{L}$  de Tris 0.4 M pH 7.8, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de fosfatasa alcalina (3 U) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas se precipitan con acetona (5 volúmenes), se desechan mediante centrifugación y el sobrenadante se seca por evaporación.

El ADN mitocondrial se aisló según el método descrito por Latorre et al<sup>278</sup> usando 200  $\mu\text{L}$  de suspensión de células mononucleares tratadas con 200  $\mu\text{L}$  de acetato potásico 3M pH 4.8 y incubado a  $-20^\circ\text{C}$  durante 20 minutos, para precipitar las moléculas de ADN de alto peso molecular y las proteínas. El ADN mitocondrial se extrae con un volumen equivalente de isopropanol y centrifugado durante 10 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se le añade un volumen equivalente de isopropanol; se conserva 5 minutos a temperatura ambiente y después de centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm, el sedimento obtenido, que contiene el ADN mitocondrial, se lava con etanol frío al 70% y se almacena a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización, resuspendido en 150  $\mu\text{L}$  de tampón Tris/EDTA a pH 8.

El ensayo de la 8-oxo-deoxiguanosina se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y siguiendo las condiciones descritas por (Frenkel, Zhong et al. 1991). El ADN hidrolizado se disuelve en agua grado HPLC y filtrada con una jeringa de 0.2-40  $\mu\text{m}$  antes de aplicar a la columna Waters ODS HPLC (2.5x0.46 ID; 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula). La cantidad de 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-dG) y la deoxiguanosina (dG) en el ADN digerido fue medido por detección de absorbancia UV y electroquímica. También hemos analizado patrones de dG y 8-oxo-dG para comprobar la correcta separación y poder identificar aquellas bases derivadas del ADN celular.

La concentración de dicha base se expresa como 8-oxo-dG/ $10^6$  dG.

### 5.5.1.3.- *Determinación de proteínas carboniladas:*

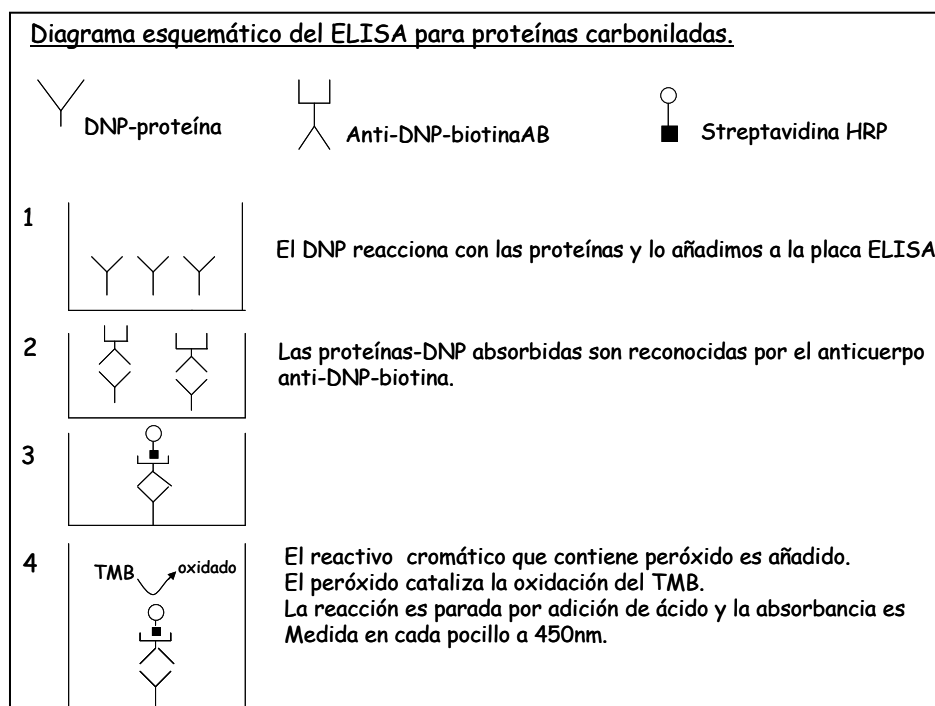
Las proteínas carboniladas se forman por variados mecanismos oxidativos y son sensibles índices de daño oxidativo. La cuantificación de proteínas carboniladas en muestras biológicas puede ser determinada por derivatización con DNP (dinitrofenilhidrazina) y midiendo colorimétrica o inmunológicamente. El método ELISA permite la medida cuantitativa de carbonilación desde  $\mu\text{g}$  de proteínas (Buss, Chan et al. 1997).

PRINCIPIOS DEL ENSAYO: el esquema del ELISA para las proteínas carboniladas se muestra en la Figura 8. Las muestras que contienen proteínas reaccionan con el DNP; entonces las proteínas se absorben inespecíficamente a la placa ELISA. El DNP no conjugado y los constituyentes no proteicos son lavados a continuación. Las proteínas adsorbidas son tratadas con un anticuerpo anti-DNP-biotina y completa el complejo la estreptavidina unida a peroxidasa de rábano (HRP).

Se añade el reactivo cromóforo que contiene peróxido y el peróxido cataliza la oxidación de TMB. La reacción es parada por adición de ácido y la absorbancia en cada pocillo se mide a 450nm.

Las absorbancias son relacionadas con una curva estándar de suero de albúmina con incremento en la proporción de ácido hipocloroso (que oxida proteínas) y que ha sido calibrado colorimétricamente. El resultado se expresa en nmol/ml.

Figura 8.- Diagrama esquemático del ELISA para proteínas carboniladas



#### 5.5.1.4.-Determinación de F2-isoprostanos

Los isoprostanos son una familia de eicosanoides de origen no enzimático producidos por la oxidación de los tejidos lipídicos por radicales oxigénicos. Dentro de la familia de los isoprostanos destacar el F2-isoprostano (8-iso-PGF<sub>2α</sub>), propuesto como un marcador de la ineficacia de los sistemas antioxidantes y de estrés oxidativo.

Los niveles de F2-isoprostanos presentes en las muestras de sangre de nuestros pacientes se determinaron mediante un inmunoensayo empleando el kit comercial de Cayman Chemical (Nº 516351).

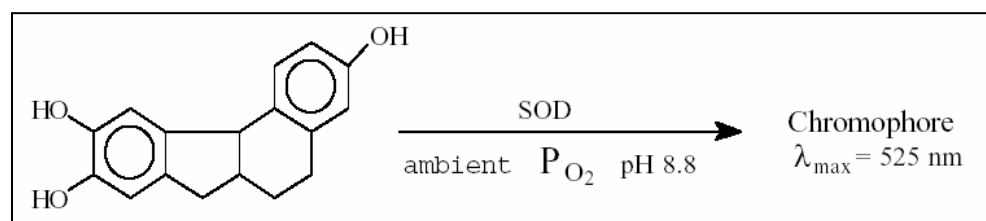
Para la determinación se emplearon placas de 96 pocillos. Inicialmente, tanto a las muestras como a los estándares se les añadió un conjugado de 8-isoprostanos con acetilcolinesterasa, el cual competirá con los 8-isoprostanos presentes en las muestras. A continuación, se añadió un antisuero específico de 8-isoprostanos el cual se une de forma simultánea a los anticuerpos monoclonales unidos a la placa y tanto a los 8-isoprostanos de las muestras como a los conjugados con acetilcolinesterasa. Las placas se incubaron durante 18 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital. Transcurrido este tiempo, la placa se lavó 5 veces con el tampón de lavado y se le añadió el reactivo de Ellman (contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa). La placa se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante un periodo de 90-120 min en un agitador orbital. Finalmente, la placa se leyó en el lector de placas a 405 nm (Multiskan EX, Thermo Labsystems).

#### 5.5.2.-Determinación de actividades enzimáticas.

##### 5.5.2.1.- *Determinación de la actividad Superóxido Dismutasa (SOD)*

Dicha actividad es calculada mediante un ensayo espectrofotométrico (BIOXYTECH SOD-525, N° CATALOGO 21010) cuyo método<sup>279</sup> se basa en el incremento del rango de autooxidación mediado por la SOD del R1= 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo(c)fluoreno en solución acuosa alcalina para producir un cromóforo con un máximo de absorbancia de 525nm. El cromóforo no ha sido aislado o caracterizado.

**Figura 9.-- Diagrama esquemático del cálculo de la actividad SOD**



Las interferencias debidas a los grupos mercapto (RSH) como el glutatión reducido, es controlado por un pretratamiento de las muestras con R2=1-metil-2-vinylpiridinium, el cuál rápidamente elimina los grupos mercapto por medio de una rápida reacción de alquilación.

La medida cinética del cambio de absorbancia a 525nm se realiza después de la adición de R1. La actividad SOD es determinada desde el ratio de la velocidad de autoxidación en presencia (Vs) y en ausencia (Vc) de SOD. El ratio Vs/Vc como función de la actividad SOD es independiente del tipo de SOD (Cu-Zn SOD, Mn-SOD) que esté siendo medida<sup>279</sup>. Una unidad de actividad de la SOD-525 se define como la actividad que dobla la velocidad de autoxidación del blanco control (Vs/Vc=2).

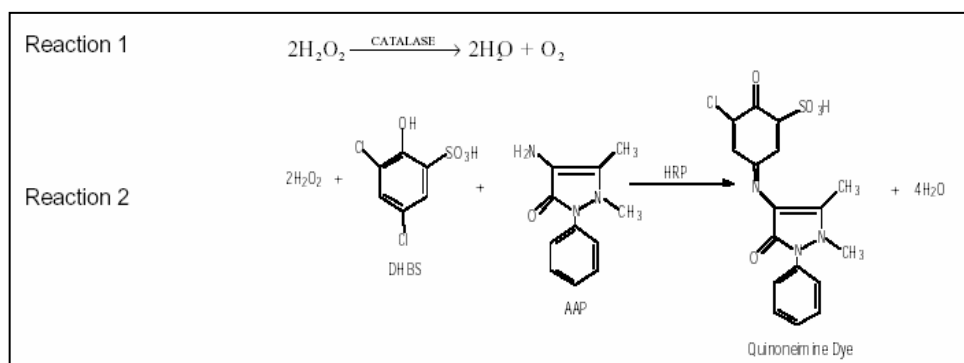
Para la inactivación de la Mn-SOD y que la medida sea específica para Cu-Zn SOD realizamos una extracción con etanol-cloroformo 62.5/37.5 (v/v). La actividad SOD se expresa en U/mg prot.

#### 5.5.2.2.- *Determinación de la actividad Catalasa (CAT)*

La determinación de la actividad Catalasa lleva a cabo mediante un ensayo espectrofotométrico (BIOXYTECH, Catalasa-520, n° Catálogo 21042). La medida espectrofotométrica directa de ésta actividad requiere mediciones en la región ultravioleta (Aebi 1984) donde puede interferir la absorción de proteínas y otros componentes de las muestras biológicas; el ensayo del OXIS Catalasa-520 utiliza la luz visible (520nm) reduciendo significativamente las interferencias de la muestra.

El principio de la reacción tiene dos pasos, y se resume en la Figura 10.

**Figura 10.- Principio de la reacción para determinación de catalasa.**



La velocidad de dismutación del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a agua y oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) es proporcional a la concentración de catalasa (figura 10, reacción 1). Por lo tanto, las muestras que contienen catalasa son incubadas en presencia de una concentración conocida de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Después de incubarse exactamente un minuto, la reacción es parada con ácido sódico. La cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobrante de la reacción es entonces determinada por la reacción oxidativa de acoplamiento del 4-aminofenazona (4-aminoantipireno, AAP) y el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxisulfónico (DHBS) con la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP) como muestra la reacción 2<sup>280</sup>. La quinonemina coloreada resultante es medida a 520 nm (N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinoneminoimina).

La actividad Catalasa se expresa en U/g prot.

### 5.5.2.3.- Determinación de la actividad Glutatión Peroxidasa (GPx)

La Glutatión Peroxidasa celular es un miembro de la familia de las enzimas GPx cuya función es detoxificar peróxidos en la célula<sup>274</sup>. Las enzimas GPx catalizan la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta agua y los peróxidos orgánicos (ROOH) hasta su correspondiente alcohol estable (ROH) usando glutatión (GSH) como fuente de equivalentes de reducción.

(Reacciones 27 y 28)



La determinación de la actividad GPx se lleva a cabo por medio de un ensayo colorimétrico (BIOXYTECH GPx-340, n<sup>o</sup> de catálogo 21017), el cual, es una medida indirecta de la actividad c-GPx<sup>281</sup>. El glutatión oxidado (GSSG) produce la reducción de un peróxido orgánico gracias a la acción de la c-GPx y es reciclado al reducir su estado por la enzima glutatión reductasa (GSR).(Reacción 29)

La oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> se acompaña de una disminución en la absorbancia a 340nm, para lo cual necesitamos un espectrofotómetro para que monitorice la actividad de la enzima GPx. El coeficiente de extinción molar del NADPH es 6220 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a 340nm. Para el ensayo de la c-GPx, el homogenado celular es añadido a una solución que contiene glutatión, glutatión reductasa y NADPH. La reacción enzimática se inicia por la adición del sustrato, tert-butil hidroperóxido y la absorbancia a 340nm es registrada. La velocidad de disminución en la A<sub>340</sub> es directamente proporcional a la actividad GPx en la muestra.

La actividad GPx se ha determinado en células mononucleares y los resultados se expresan en U/g proteínas.

#### 5.5.2.4.- Determinación de la actividad Glutation Reductasa (GSR):

La Glutation Reductasa es una enzima distribuída ubicuamente y que cataliza la reducción de GSSG a su forma reducida y activa (GSH). (Reacción 29)

El glutatión oxidado es reducido por una reacción de múltiples pasos en donde la GSR es inicialmente reducida por NADPH formando una semiquinona de FAD, un radical sulfuro y un grupo tiol. La GSR reducida (GSR red) reacciona con una molécula de GSSG, resultando un intercambio disulfuro que produce una molécula de GSH y el complejo GSR red-SG. Un electrón del complejo GSR red-SG cambia de sitio en un segundo

intercambio disulfuro, de manera que se recupera la segunda molécula de GSH y se restaura la forma oxidada de la GSR<sup>282</sup>.

La determinación de la actividad GSR se realiza mediante un ensayo espectrofotométrico (BIOXYTECH GR-340, n° de catálogo 21018D) y cuyo principio del ensayo se basa en la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> catalizada por una concentración limitante de GSR. Una unidad de actividad GSR es definida como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de un  $\mu\text{mol}$  de GSSG por minuto a pH 7.6 y 25°C. Como podemos observar en la reacción, una molécula de NADPH es consumida por cada molécula de GSSG reducida. De esta manera, la reducción de GSSG es determinada indirectamente por la medida del consumo de NADPH, como demuestra la disminución de la absorbancia a 340nm ( $A_{340}$ ) en función del tiempo.

El resultado se expresa en U/mg prot.

### **5.6.- Metodología estadística y soporte informático**

Para efectuar el análisis de datos y el cálculo de resultados estadísticos se utilizaron los programas informáticos Access XP y SPSS para Windows versión 12.0.

En los contrastes de hipótesis que se efectuaron, el nivel de significación que consideramos para la aceptación de la hipótesis nula fue de 0,05, valor más comúnmente aceptado por la comunidad científica.

La distribución normal de las variables se estudió mediante la prueba de Kolgomorov-Smirnov. Se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar las de distribución normal y como mediana y rango intercuartil las variables cuya distribución no era normal. Además de los estadísticos descriptivos habituales (media aritmética, mediana, desviación típica, varianza, intervalo de confianza etc.) y del análisis de regresión lineal, se utilizaron las siguientes pruebas y contrastes de hipótesis:

- Para estudiar la asociación entre caracteres cualitativos se empleó la prueba de Chi-cuadrado, utilizándose la prueba exacta de Fisher cuando las condiciones de la muestra lo requirieron.
  
- Análisis de correlaciones bivariadas:
  - Correlaciones paramétricas: coeficiente de correlación de Pearson.
  - Correlaciones no paramétricas:  $\rho$  de Spearman.
  
- Contrastes paramétricos sobre igualdad de medias:
  - Para el caso de comparación de medias de dos grupos: prueba T de Student para muestras independientes.
  - Para más de dos grupos: ANOVA de un factor, con el contraste post hoc de la Diferencia Honestamente Significativa de Turkey.

Se calcularon los percentiles de los parámetros de estrés oxidativo. Consideramos nivel alto de la normalidad el percentil 90 de las variables oxidadas y nivel bajo de la normalidad el percentil 10 de las variables antioxidantes.

## ***6.-Resultados***



## 6.1.- Características generales de la población estudiada

El estudio fue llevado a cabo en un total de 93 pacientes con diagnóstico de ERC en diferentes situaciones, 32 con ERC con filtrado glomerular  $\leq$  30 ml/min, en situación de Pre-D, 30 pacientes en HD y 31 pacientes en DP.

### 6.1.1.- Características demográficas

Las características demográficas de estos grupos, su función renal residual y el tiempo de permanencia en la técnica en el caso de HD y DP quedan reflejadas en la siguiente tabla.

**Tabla 4.- Características de los grupos estudiados**

	<b>Grupo control</b> (n=67)	<b>Grupo Pre-D</b> (n=32)	<b>Grupo HD</b> (n= 30 )	<b>Grupo DP</b> (n= 31 )
<b>Edad</b> (años)	48.08 $\pm$ 19.11	65.29 $\pm$ 15.6	68.37 $\pm$ 12.74	56.84 $\pm$ 16.04
<b>Sexo</b> (H/M)	29/38	26/6	16/14	19/12
<b>MDRD-4</b> (ml/min)	82.25 $\pm$ 15.6	22.1 $\pm$ 1.08	_____	_____
<b>Tiempo de permanencia en TSR*</b> (meses)	_____	_____	73.21 $\pm$ 58.97	45.09 $\pm$ 26.53
<b>Función Renal Residual (FRR)</b>	_____	_____	_____	4.97 $\pm$ 4.22

TSR\*: Terapia sustitutiva renal

Existían diferencias significativas en la edad de los grupos Control con Pre-D y HD ( $p < 0.05$  para ambos) y entre los grupos Pre-D y HD con DP ( $p < 0.05$  para ambos).

También había diferencia significativa entre los tiempos de permanencia en la técnica entre HD y DP.

#### 6.1.2.- Nefropatía causal

La nefropatía causal de la ERC por diferentes grupos era:

Grupo Prediálisis: en 21 casos (65.7%) era vascular, en ocho casos (25%) era diabética, dos casos (6,2%) nefritis tubulo-intersticial y un caso (3.1%) poliquistosis renal.

Grupo Hemodiálisis: en 10 casos (33.4%) eran glomerulopatías, 10 casos (33.4%) vascular, en cuatro casos (13.3%) la causa era desconocida, tres casos (10%) diabetes, nefritis-tubulointersticial en un caso (3.3%), poliquistosis del adulto un caso (3.3%) y displasia renal congénita un caso (3.3%).

Grupo Diálisis Peritoneal: 10 casos (32.26%) secundaria a glomerulopatía, ocho casos (25.8%) era diabética, en cuatro casos (12.9%) era desconocida, siete casos (22.58%) era vascular, un caso (3.2%) era obstructiva y un caso (3.2%) secundaria a poliquistosis renal.

#### 6.1.3.- Prevalencia de factores tradicionales de riesgo cardiovascular

La prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular (Diabetes, HTA, Dislipemia, Cardiopatía Isquémica y Accidente Cerebrovascular) de los grupos estudiados se refleja en la tabla 5.

**Tabla 5. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular por grupos**

	Prediálisis	Hemodiálisis	Diálisis Peritoneal	p <sup>α</sup>
Diabetes mellitus (%)	40.6	26.7	32.3	0.143
HTA(%)	100	97	77.4	0.001
Dislipemia(%)	65.6	46.7	54.8	0.002
Cardiopatía Isquémica(%)	28	33.3	12.9	0.002
Accidente cerebrovascular(%)	3.2	3.3	3.2	1

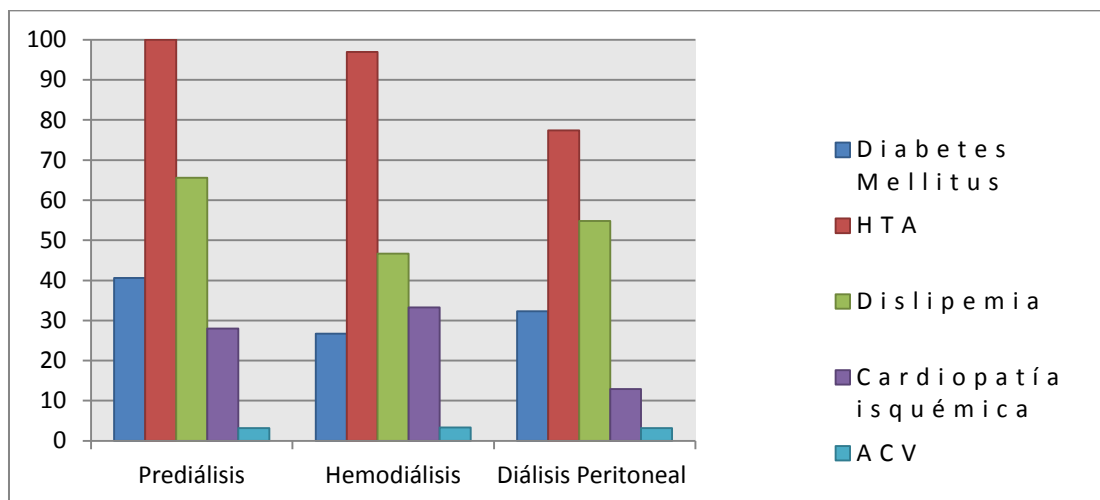
α: Test Chi-cuadrado

Destaca la alta prevalencia de factores tradicionales de riesgo cardiovascular en el grupo de pacientes en Pre-D, con más de un 40% de pacientes con Diabetes Mellitus, todos con algún tratamiento antihipertensivo y más del 65% con Dislipemia. El grupo DP tiene menor prevalencia de hipertensión, cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular que los otros dos grupos, sin embargo, presenta mayor presencia de diabetes mellitus y dislipemia que el grupo HD.

Comparadas las tres poblaciones mediante en test de Chi-cuadrado existían diferencias en la prevalencia de HTA, diagnóstico de dislipemia y antecedente de cardiopatía isquémica.



**Figura 11.- Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular por grupos**



## 6.2.- Resultados del análisis bioquímico general

Los resultados obtenidos del análisis bioquímico general se reflejan en la tabla.

**Tabla 6.-Bioquímica general. Media y desviación estándar**

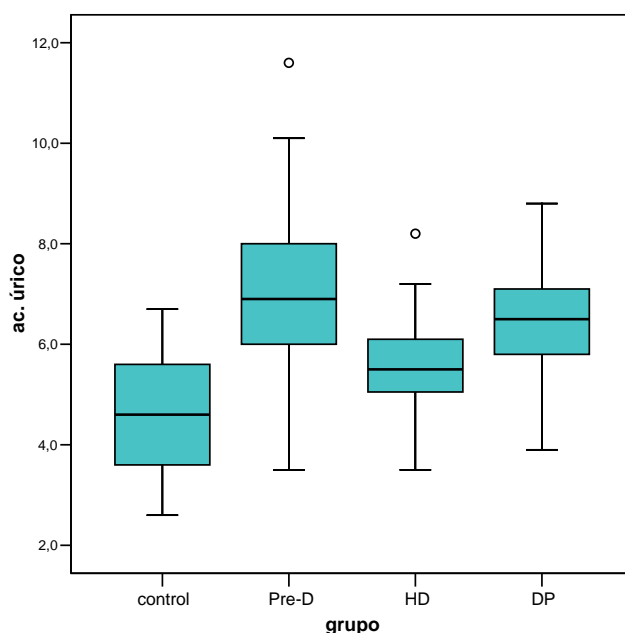
	Grupo Control	Prediálisis	Hemodiálisis	Diálisis Peritoneal
Glucosa (mg/dl)	90.88±11.54	123 ± 7.82	85 (13)*	97 (20)*
Urea (mg/dl)	38.5±7.54	107,97(40)*	133.38±32.96	110.32±15.62
Creatinina (mg/dl)	0.95±0.09	3,04 ± 0.21	8.31±2.1	8.07±2.61
Ácido Úrico (mg/dl)	4.61±1.43	7,12 ± 0,33	5.69±0.82	6.36±0.99
Colesterol total (mg/dl)	183±22.94	166,97 ± 7,83	163.13±32.32	180.79±31.56
LDL-Col (mg/dl)	112±19.45	94,87 ± 6,57	84.75±22.52	102.89±26.46
HDL-Col (mg/dl)	51.13±9.43	47,74 ± 3,92	47(14)*	43.21±12.65
Triglicéridos (mg/dl)	93.63±48	128,77 ± 9,78	104.25±44.78	199.95±128.25
Albúmina (g/dl)	4.3(0.38)*	3,87 ± 0,58	3.88±0.34	3.4±0.2
Proteínas totales (g/dl)	6.9±0.22	7,01 ± 0,12	6.36±0.51	6.28±0.32
Homocisteína (mg/dl)	13.43±4.21	37.97±17.62	38.66±17.3	25.2±10.56

\*Mediana (rango intercuartil)

Los niveles de glucosa basal fueron más elevados en el grupo Pre-D ( $123 \pm 7.82$  mg/dl) que en los otros (HD: 85 mg/dl y DP: 97 mg/dl), en concordancia con la mayor tasa de prevalencia de diabéticos aunque no existían diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Como es de esperar los niveles de urea y creatinina fueron más elevados en los grupos de HD y DP, siendo la media muy similar entre ellos.

El ácido úrico (figura 12) presentó también el valor más alto en el grupo de PRE-D ( $7.12 \pm 0.33$  mg/dl), respecto a HD ( $5.69 \pm 0.82$  mg/dl) y DP ( $6.36 \pm 0.99$  mg/dl), estas diferencias alcanzaron nivel significativo entre los grupos PRE-D y HD ( $p < 0.001$ ) y PRE-D y controles ( $p < 0.05$ ) (Anexo 2, tabla 12).

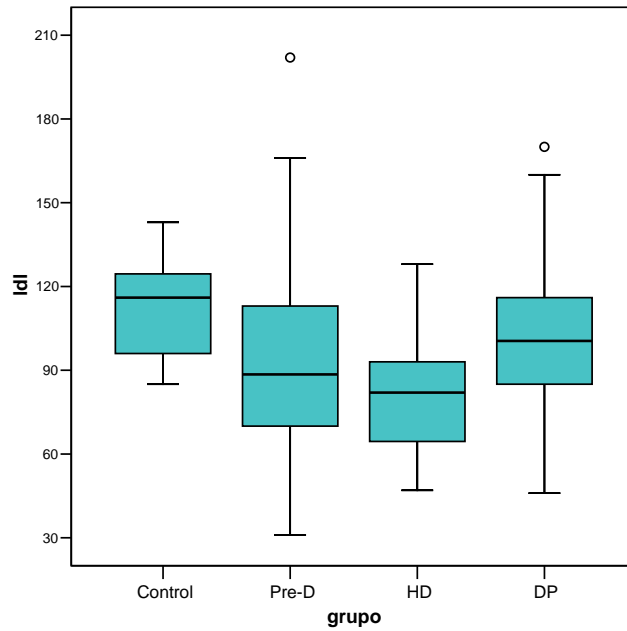
**Figura 12.- Valores de ácido úrico por grupos**



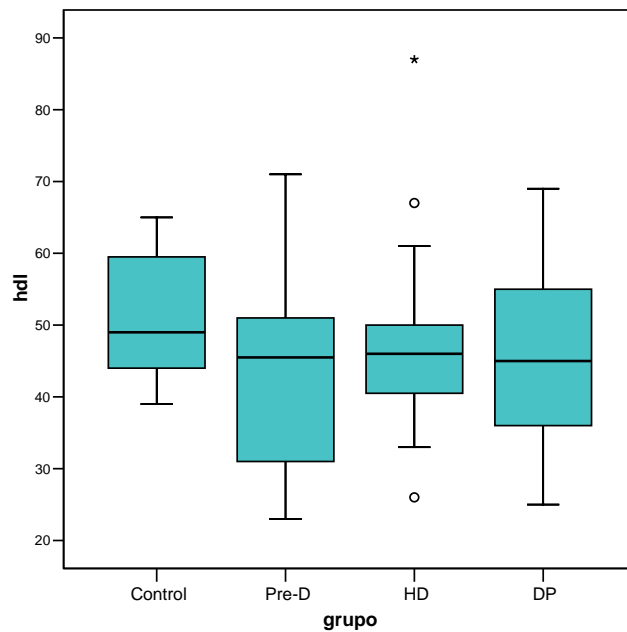
Los valores más elevados de colesterol y su fracción LDL los presentó el grupo DP (Colesterol total:  $180.79 \pm 31.56$  mg/dl, LDL-colesterol:  $102.89 \pm 26.46$  mg/dl), alcanzando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) el valor de LDL-colesterol entre los grupos DP y HD. El grupo DP tuvo los valores más bajos de HDL-colesterol (HDL-Colesterol:  $43.21 \pm 12.65$  mg/dl), aunque no

hubo diferencias significativas entre los grupos estudiados. (Anexo 2, tablas 14 y 15).

**Figura 13.- Valores de LDL-Col por grupos**

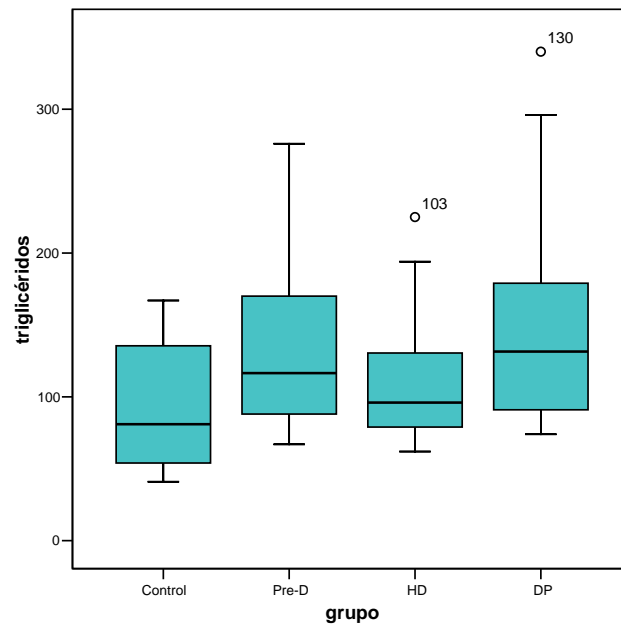


**Figura 14.- Valores de HDL-Col por grupos**



En cuanto a los valores de triglicéridos, sólo existieron diferencias significativas entre el grupo control y DP, que presentaba la media más elevada de todos los grupos ( $199.95 \pm 128.25$  mg/dl) (Anexo 2, tabla16).

**Figura 15.- Valores de triglicéridos por grupos**



### 6.3.- Parámetros inflamatorios

Como parámetros inflamatorios se midieron PCRas y fibrinógeno. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 7.

**Tabla 7.- Media y desviación estandar de parámetros inflamatorios**

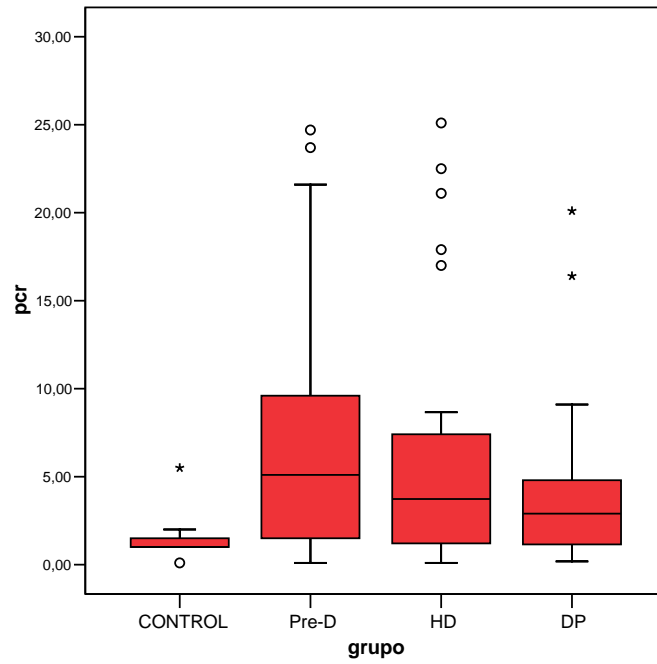
	Grupo Control	Prediálisis	Hemodiálisis	Diálisis Peritoneal
PCR as(mg/dl)	1.57 ± 1.67	9.76 ± 2.54	6.64 ± 7.43*	4.85 ± 5.4
Fibrinógeno (mg/dl)	3.55 ± 0.63	4.84 ± 0.29	4.63 ± 0.64	4.79 ± 0.67

\*mediana (rango intercuartil): 3.73 (6.57)

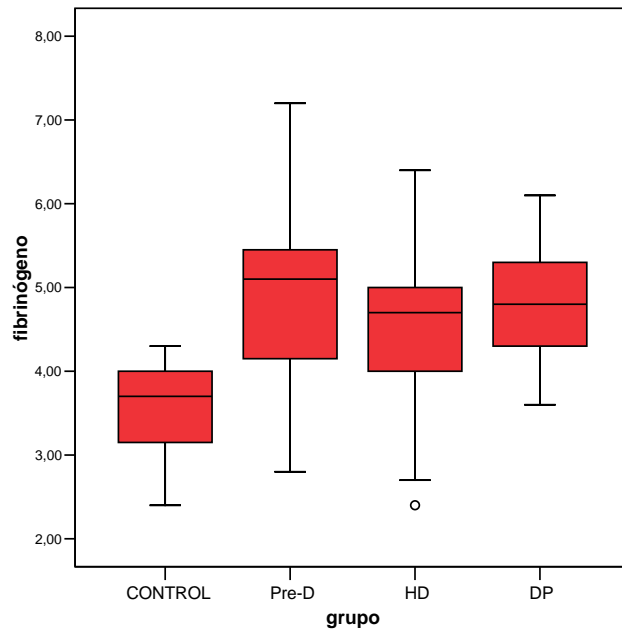
El grupo con peor perfil inflamatorio fue el grupo HD, que presentó los niveles más elevados de PCR as y fibrinógeno. El análisis comparativo entre los grupos se muestra en el anexo 2 (tabla 17). No existían diferencias significativas entre los grupos de estudio, pero sí de los grupos Pre-D y HD con el grupo control. Sin embargo, el grupo DP no presentó diferencias significativas con el grupo control, presentando la media de PCR más baja de los tres grupos.

En cuanto a los valores de fibrinógeno, se encontraban elevados en todos los grupos respecto a los controles con valores similares entre ellos y sin diferencias significativas (Anexo 2, tabla 18).

**Figura 17.- Valores de PCR as por grupos**



**Figura 18.- Valores de fibrinógeno por grupos**



#### 6.4.- Estudio del estrés oxidativo.

El estudio del estrés oxidativo se dividió entre parámetros oxidantes y antioxidantes.

##### 6.4.1.- Resultados de parámetros oxidantes

##### *Peroxidación lipídica*

Los resultados de peroxidación lipídica en los distintos grupos estudiados se muestran en la siguiente tabla y gráficos.

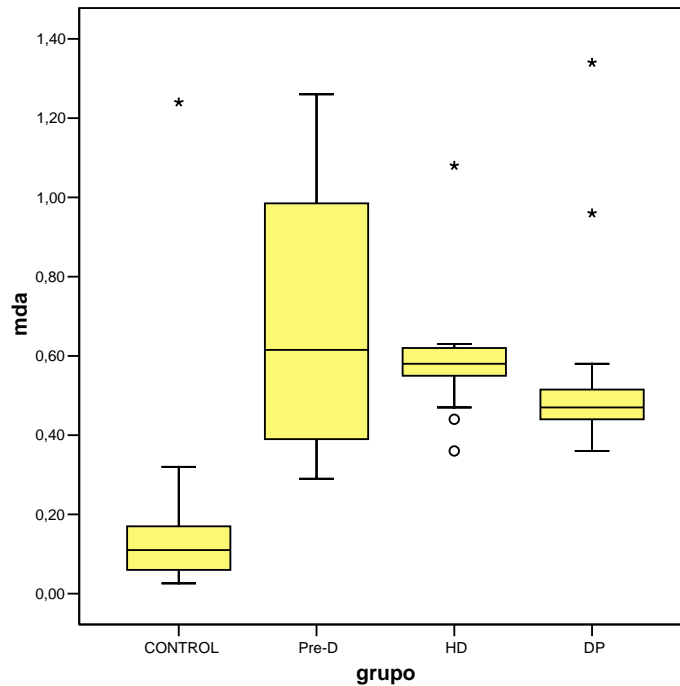
**Tabla 8. Media y desviación estándar de parámetros de peroxidación lipídica**

	Grupo Control	Prediálisis	Hemodiálisis	Diálisis Peritoneal
MDA (nmol/mg prot)	0.11(0.11)*	0.7±0.31	0.58 (0.07)*	0.47 (0.07)*
Isoprostanos (ng/ml)	270(95.66)*	821.89±300.47	1321.93±393.98	928.09± 93.81

\*Mediana (rango intercuartil)



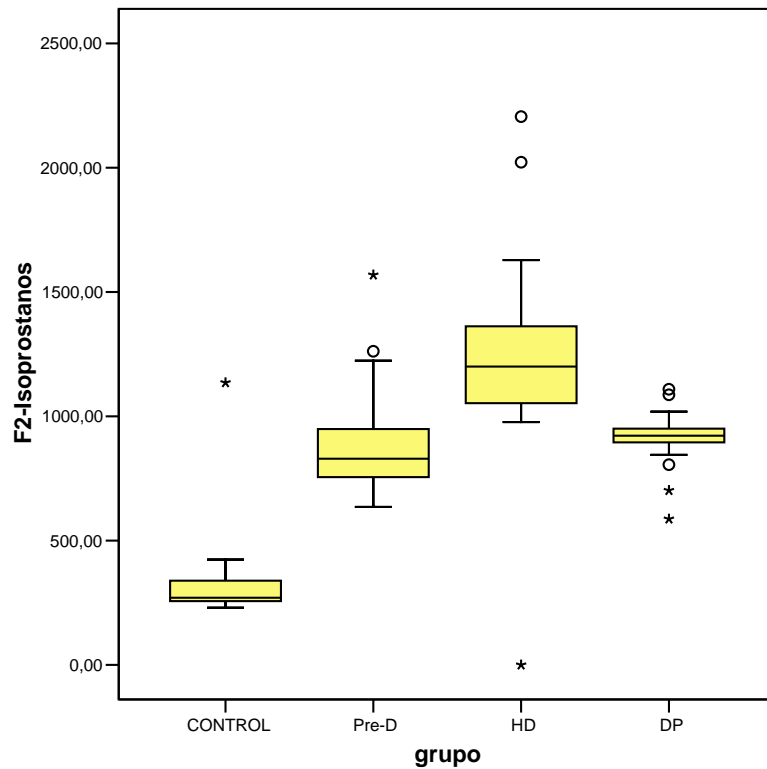
**Figura 19.- Valores de MDA por grupos**



La media más elevada de MDA la tuvo el grupo Pre-D, seguido de HD y DP respectivamente. Existían diferencias significativas entre el grupo control y el resto de los grupos ( $p=0.000$ ) y entre los valores de Pre-D y DP ( $p=0.014$ ) (Anexo 2, tabla 19).

El percentil 90 del grupo control fue 0,23 nmol/mg prot. El 100% de pacientes en los tres grupos presentaban niveles de MDA por encima de este valor.

**Figura 20.- Valores de F<sub>2</sub>-Isoprostanos por grupos**



Los valores de F<sub>2</sub>-Isoprostanos se comportaron de modo diferente a los del MDA. Aunque también estaban elevados en todos los grupos respecto al control, con diferencias significativas, la media más elevada la tenía el grupo HD, que presentaba diferencias significativas con grupo Pre-D y DP. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos Pre-D y DP, que presentaban valores aproximados. (Anexo 2, tabla 20)

El percentil 90 del grupo control correspondía al valor 380.37 ng/ml y de nuevo el 100 % de los valores de los tres grupos se encontraban por encima de este valor.

### *Oxidación proteica*

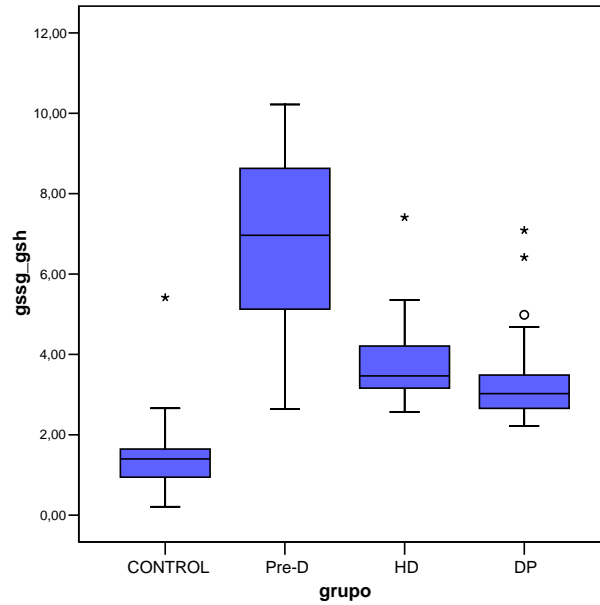
Los resultados de los productos derivados de la oxidación proteica en los distintos grupos estudiados se muestran en la siguiente tabla y en las figuras 21 y 22.

**Tabla 9.-Media y desviación estándar de productos de oxidación proteica**

	Grupo Control	Prediálisis	Hemodiálisis	Díálisis Peritoneal
GSSG (U/mg proteína)	0.35±0.18	1.02±0.2	0.63±0.017	0.60±0.12
GSSG/GSH (U/mg proteína)	1.39±0.75	6.89±1.91	3.73±0.97	3.10±0.67
Proteínas Carboniladas (nmol/ml)	3.63 (1.12)*	7.41±0.84	6.64±0.32	5.99±0.48

\*mediana (rango intercuartil)

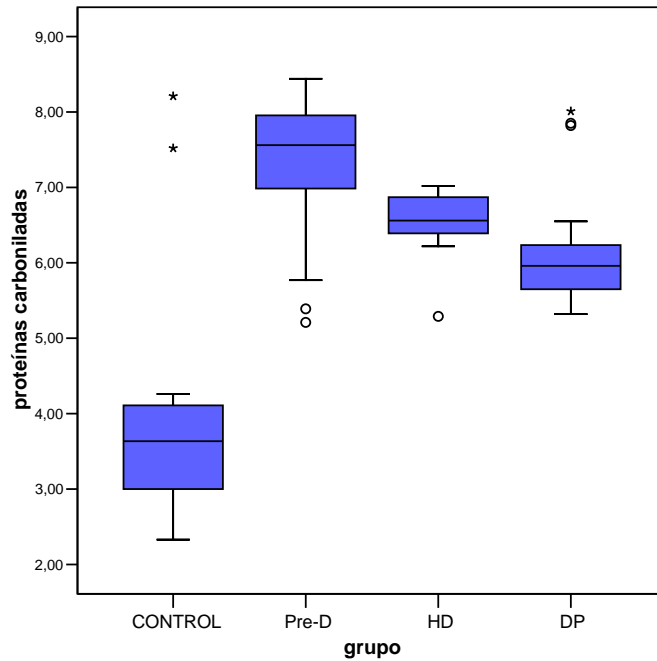
**Figura 21.- Valores de GSSG/GSH por grupos**



El análisis del cociente GSSG/GSH dio como resultado elevación de los valores en todos los grupos estudiados respecto al grupo control, fundamentalmente en grupo Pre-D, que mantenía diferencias significativas con el resto de grupos. No encontramos diferencias significativas entre el grupo HD y DP. (Anexo 2, tabla 23 )

El percentil 90 del grupo control se situó en el valor 2.162U/mg proteína. El 100% de las determinaciones en todos los grupos de estudio se encontraron por encima de este valor.

**Figura 22.- Valores de proteínas carboniladas por grupos**



El comportamiento de las proteínas carboniladas fue similar al del cociente GSSG/GSH. El valor más elevado correspondía también al grupo Pre-D, y existían amplias diferencias significativas entre todos los grupos estudiados ( $p < 0.000$ ) (Anexo 2, tabla 24). Llama la atención la magnitud de la elevación de este parámetro, ya que incluso el valor inferior del conjunto de pacientes con enfermedad renal es muy superior al mayor valor encontrado en el grupo control.

El percentil 90 del grupo control correspondía al valor: 4.25 nmol/mg proteína. El 100% de los pacientes presentaban valores por encima de esta cifra.

*Daño oxidativo del material genético*

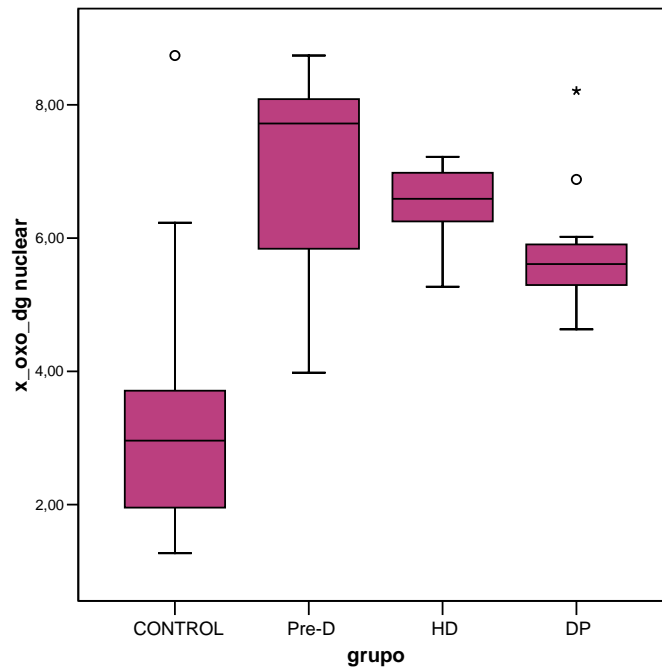
Los resultados de las moléculas derivadas del daño oxidativo del material genético se reflejan en la siguiente tabla.

**Tabla 10.-Media y desviación estándar de los productos del daño oxidativo del material genético**

	Grupo Control	Prediálisis	Hemodiálisis	Diálisis Peritoneal
8-oxo-dG (DNA nuclear) (U/10 <sup>6</sup> dG)	2.92 (1.15)*	7.01(1.39)*	6.59±0.12	5.61±0.46
8-oxo-dG (DNA mitocondrial) (U/10 <sup>6</sup> dG)	13.85±1.44	15.73±2.28	15.49±0.96	14.92±1.27

\*mediana (rango intercuartil)

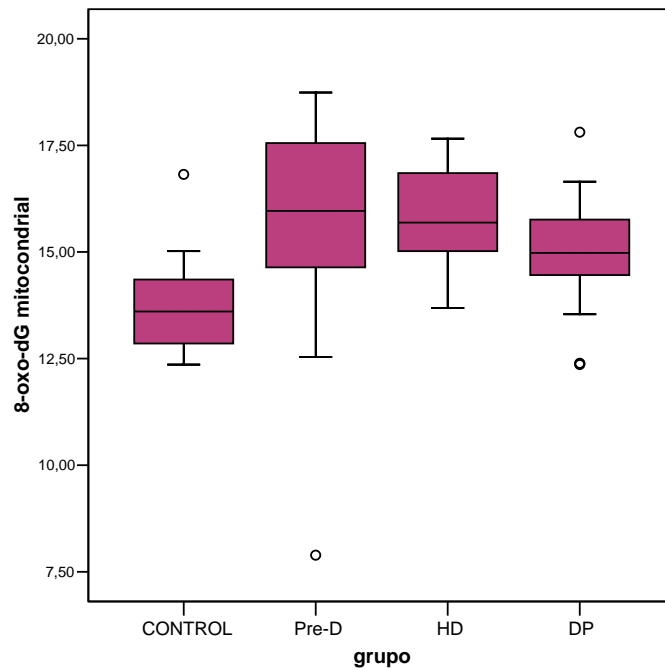
Figura 23.- Valores de 8-oxo-dG nuclear por grupos



Todos los grupos presentaron valores elevados respecto al control, con diferencias significativas ( $p < 0.000$ ). Entre los grupos de estudio sólo entre el grupo Pre-D y HD no se encontraron diferencias ( $p = 0.376$ ). El grupo con la media más elevada fue de nuevo el grupo Pre-D. (Anexo 2, tabla 21)

El percentil 90 del grupo control estaba en el valor  $4.47 \text{ U}/10^6 \text{dG}$ . Un 96.87% de los pacientes del grupo Pre-D estaba por encima, mientras que los grupos HD y DP era del 100%

**Figura 24.- Valores de 8-oxo-dG mitocondrial por grupos**



Los valores obtenidos para la molécula 8-oxo-dG mitocondrial entre los grupos con insuficiencia renal fueron los más homogéneos de todos los estudiados. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y Pre-D y HD, pero no con DP. Tampoco existían diferencias significativas entre Pre-D y HD o DP. Sí las había entre HD y DP. (Anexo 2, tabla 22). Una vez más la tendencia fue a encontrar los valores más elevados en el grupo Pre-D seguido de HD y por último DP.

El percentil 90 en grupo control fue de 14.69 U/10<sup>6</sup>dG, En el grupo Pre-D un 75% de pacientestenía valores superiores, mientras que en el grupo HD este porcentaje era de un 83.3% y sólo de un 64.5% del grupo DP.



### 6.4.2.- Resultados parámetros antioxidantes

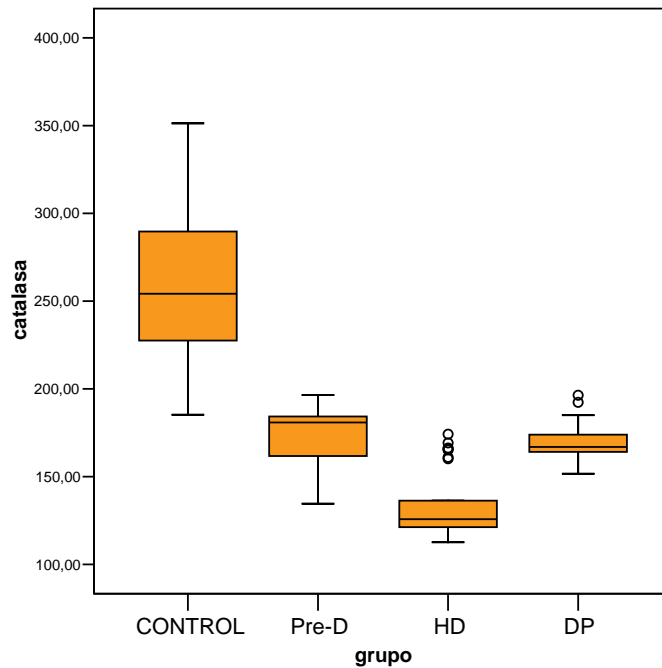
En la siguiente tabla se reflejan los valores obtenidos tanto para las enzimas antioxidantes como para el GSH en los diferentes grupos.

**Tabla 11.-Media y desviación estándar de parámetros antioxidantes**

	Control	Prediálisis	Hemodiálisis	Diálisis Peritoneal
Catalasa(U/gr prot)	260.13±39.33	181.34 (22.77)*	134.26±18.26	168.68±8.35
GSR(mU/mgr prot)	13.35±6.26	4.28±1.12	5.30±1.1	4.96±0.8
GPX (U/mgr prot)	60.58±6.35	45.37±7.56	47.23±4.25	47.66±3.75
SOD (U/mgr prot)	7.48±1.16	4.93 ±0.86	4.06±0.61	4.81±0.73
GSH (nmol/mg prot)	23.83 (5.39)*	14.6 (2.69)*	17.28±1.04	19.55±1.12

\*mediana (rango intercuartil)

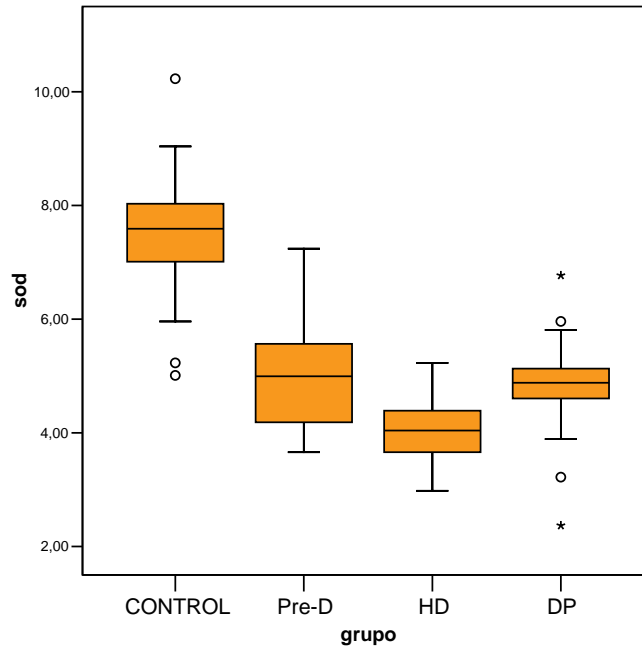
**Figura 25.- Valores de catalasa por grupos**



Todos los grupos con insuficiencia renal presentaban valores inferiores al grupo control con amplias diferencias significativas ( $p < 0.000$ ). El grupo con niveles más bajos de catalasa fue el de HD, con diferencias significativas con Pre-D y DP ( $p < 0.000$ , para ambos). Estas diferencias no se encontraron al comparar Pre-D y DP ( $p = 0.996$ ) ya que presentaban valores muy similares. (Anexo 2, tabla 25)

En cuanto a la actividad de la enzima catalasa el percentil 10 correspondía al valor 220.86U/gr proteína. El 100% de los pacientes de los tres grupos se encontraban por debajo de este valor.

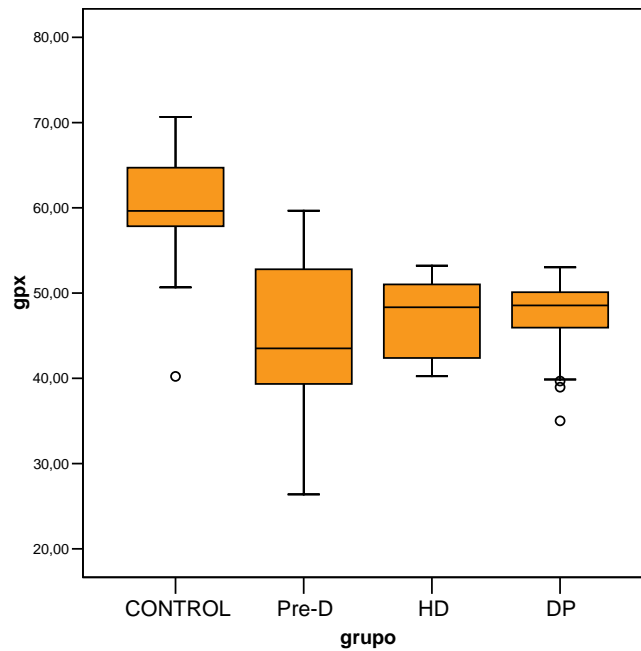
Figura 26.- Valores de SOD por grupos



El comportamiento de la enzima SOD fue superponible al de la catalasa. Todos los grupos presentaban niveles disminuidos de SOD respecto al grupo control ( $p < 0.000$ ). El grupo con niveles más bajos fue el de HD, con diferencias significativas con PRE-D y DP, sin existir estas entre PRE-D y DP. (Anexo 2, 29)

El percentil 10 del grupo control se situó en el valor 5.67 mU/mgr de proteínas, con lo que un 81.3% del grupo Pre-D tenía valores inferiores, en el grupo HD este valor era del 100% y en el DP del 90.3%.

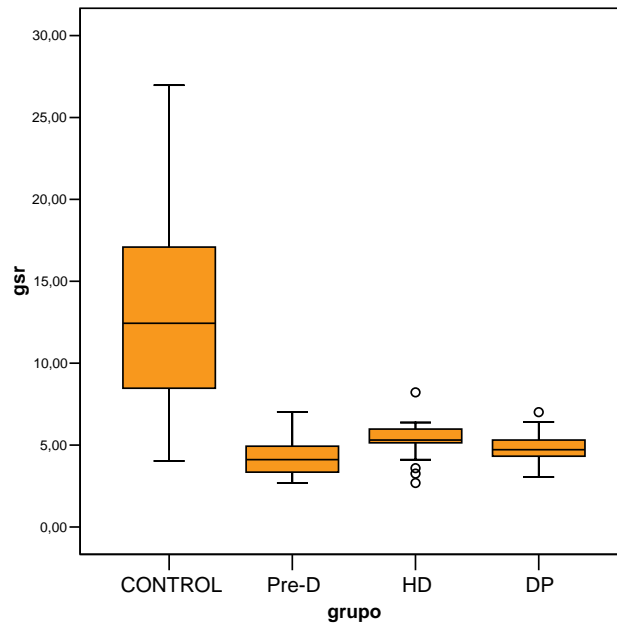
**Figura 27.- Valores de GPx por grupos**



Todos los valores obtenidos para GPx de los grupos con insuficiencia renal estaban significativamente disminuidos respecto al control ( $p < 0.000$ ), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ellos. (Anexo 2, tabla 26)

El percentil 10 del grupo control se encontraba en el valor 53.47 mU/mgr de proteínas. Un 81.3% de los pacientes del grupo Pre-D tenía valores inferiores, mientras que ningún paciente alcanzó este valor en los grupos HD ni DP.

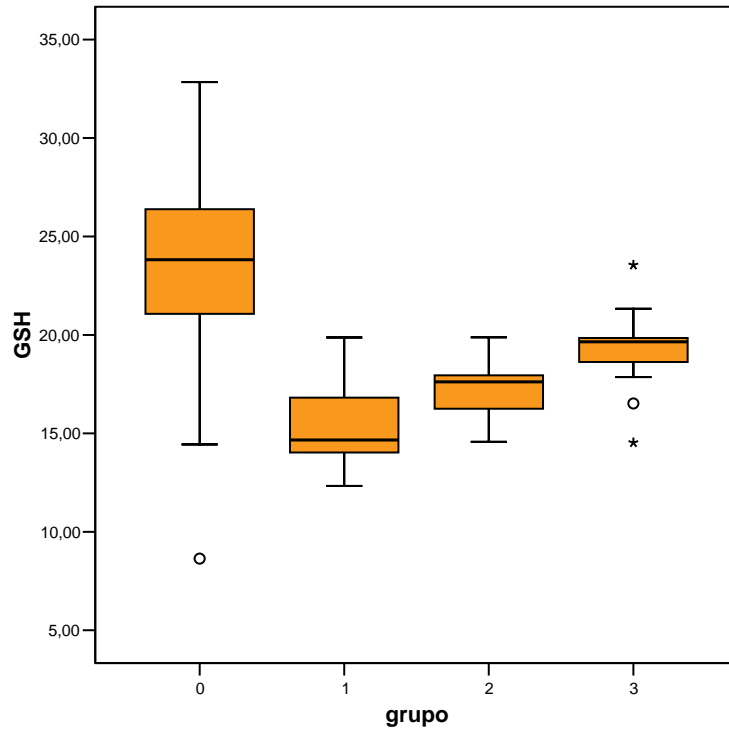
**Figura 28.- Valores de GSR por grupos**



Existían diferencias significativas de todos los grupos con insuficiencia renal y el grupo control, también entre grupo PRE-D y HD, aunque junto con el grupo DP mostraron valores todos muy por debajo de los del grupo control (Anexo 2, tabla 27).

El percentil 10 del grupo control se encontraba en el valor 5.99 mU/ mgr de proteína. El 87.5% de los pacientes del grupo Pre-D tenían valores inferiores a esta cifra, mientras que en los grupos HD y DP este porcentaje era del 76.7 y 80.6% respectivamente.

**Figura 29.-Valores de GSH por grupos**



Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y Pre-D y HD, pero no con el grupo DP, que mostraba los niveles más cercanos a los del grupo control. Entre los grupos con insuficiencia renal no existían diferencias significativas (Anexo 2, tabla 28).

El percentil 10 del grupo control se situó en el valor 17.97nmol/mgr proteína, con lo que un 87.5% se situó por debajo de este valor en el grupo Pre-D, un 80% de los pacientes en el grupo HD y sólo un 12.9% en el grupo DP.

## **6.5.- Factores de riesgo cardiovascular y estrés oxidativo.**

En el tabla 5 se muestran las prevalencias de los factores de riesgo en los grupos estudiados.

Para valorar el impacto de los factores de riesgo, agrupamos a los pacientes en función de los antecedentes cardiovasculares que presentaran. Escogimos los siguientes factores: diabetes mellitus, evento isquémico cardíaco o accidente cerebrovascular. No tuvimos en cuenta la dislipemia ni la HTA, ya que se trataba de pacientes tratados.

Se analizaron los resultados de los tres grupos en conjunto.

Comparamos los diferentes parámetros entre los grupos que presentaban más de uno de estos antecedentes. Un total de 46 enfermos tenía al menos entre sus antecedentes ser diabéticos o haber padecido un evento isquémico cardíaco o accidente cardiovascular. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos. Los resultados se muestran en la tabla 30 (Anexo 3)

### **6.5.1.- Diabetes y estrés oxidativo**

Había un total de 31 pacientes diabéticos, frente a 62 pacientes que no lo eran, considerando los tres grupos de estudio. Ninguno de los parámetros mostró diferencias significativas entre los dos grupos, aunque la tendencia fue encontrar los valores de parámetros oxidados más elevados y las enzimas antioxidantes más descendidas en el grupo de diabéticos. (Anexo 3, tabla 31)

Dado que el grupo Pre-D era el grupo con mayor porcentaje de diabéticos, se analizó este de forma independiente. En este caso, tanto la 8-oxo-dG como los F2-Isoprostanos entre moléculas oxidadas presentaron diferencias significativas. En el grupo de enzimas antioxidantes la catalasa también mostró diferencia significativa entre los dos grupos. (Anexo 3, tabla 32)

#### 6.5.2.- Cardiopatía isquémica y estrés oxidativo

Un total de 23 pacientes tenía antecedentes de evento isquémico cardíaco. Tampoco ninguno de los parámetros mostró diferencias entre los dos grupos, aunque sí una ligera tendencia a presentar valores oxidados más elevados en el grupo con antecedente isquémico así como menor actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, SOD, GPX). (Anexo 3, tabla 33)

#### 6.5.3.- Accidente cerebrovascular y estrés oxidativo

Nueve pacientes tenían antecedente de accidente cerebrovascular. De igual modo, tampoco ninguno de los parámetros mostró diferencias significativas entre los grupos con o sin evento cerebrovascular. (Anexo 3, tabla 34).

### **6.6.- Insuficiencia renal, edad y estrés oxidativo.**

Considerando los tres grupos de estudio, dividimos a los pacientes en dos grupos según fueran mayores o menores de 70 años y comparamos los valores para cada parámetro oxidante y antioxidante. El grupo menor de 70 años estaba formado por 42 pacientes, mientras que el de mayores de 70 años lo formaban 51. Obtuvimos diferencias significativas para los valores de 8-oxo-dG nuclear, MDA, GSSG/GSH y Proteínas Carboniladas, GSR y GSH.

(Anexo 3, tabla 35)

### **6.7.- Tiempo de permanencia en la técnica de diálisis y estrés oxidativo.**

Calculamos la correlación entre el tiempo de permanencia en tratamiento sustitutivo y los diferentes parámetros de estrés oxidativo. Valoramos los dos grupos, HD y DP en conjunto. Únicamente mostraron una correlación



significativa el ratio GSSG/GSH entre los parámetros oxidativos y las enzimas GPX y SOD, aunque la correlación con GPX fue positiva y no negativa, como habría sido de esperar.

(Anexo 4, tabla 36)

### **6.8.- Función renal y estrés oxidativo**

Ninguno de los parámetros medidos de estrés oxidativo ni las enzimas antioxidantes presentó correlación significativa con el valor del MDRD en el grupo Pre-D, (Anexo 4, tabla 37).

Se valoró también la posible relación con la FRR en el grupo DP. Ningún parámetro oxidativo mostró correlación significativa y entre las enzimas antioxidantes, de nuevo únicamente SOD y GPX mostraron correlación significativa, aunque sólo SOD la tenía en el sentido esperado de que a mayor tiempo de permanencia, menor actividad SOD.

(Anexo 4, tabla 38)

### **6.9.- Correlaciones de los parámetros oxidados**

Las moléculas estudiadas presentaron correlación positiva con el resto moléculas oxidadas, sin embargo, la molécula 8-oxo-dG nuclear era la que presentaba mayor número de correlaciones significativas. (Anexo 4, tabla 39)

## ***7.- Discusión***



El principal hallazgo del estudio es la presencia de un estado oxidado en toda la población con ERC, independientemente de su situación. Este estado oxidado viene determinado por una elevación de moléculas oxidadas y un descenso de los recursos enzimáticos antioxidantes. Además la oxidación presente en el estado urémico afecta uniformemente a todas las líneas moleculares estudiadas.

### **7.1.- Consideraciones iniciales sobre los grupos estudiados**

En general el estudio se ha realizado sobre una población añosa (sobre todo Pre-D y HD), con alta prevalencia de factores tradicionales de riesgo cardiovascular. En el grupo de DP destaca una mayor presencia de diabetes mellitus y dislipemia que en HD, probablemente consecuencia de las propias características de la técnica al utilizar soluciones de alta concentración de glucosa de una forma continuada. Este grupo (DP), es además más joven y con menor tiempo de permanencia respecto a HD, posiblemente porque al ser más jóvenes, existen más posibilidades de que sean candidatos a recibir un trasplante y por tanto el índice de rotación de pacientes en la técnica es mayor.

El grupo Pre-D lo formaban pacientes con ERC muy avanzada pero sin necesidad todavía de técnica sustitutiva. La finalidad no era realizar un estudio evolutivo del comportamiento del estrés oxidativo a lo largo de diferentes etapas de insuficiencia renal, sino enmarcar la situación metabólica y el estado oxidativo del paciente con ERC avanzada antes de iniciar la terapia sustitutiva.

## 7.2.- Análisis del estado metabólico

### Diabetes Mellitus

Existía una alta prevalencia de diabetes mellitus, más importante en el grupo Pre-D (40.6%), seguido por el grupo DP (32%). La nefropatía diabética, como causa de enfermedad renal terminal, era algo inferior en los tres grupos, 25% para grupo Pre-D, 10% grupo HD y 25 % grupo DP, similar a la prevalencia publicada por el registro nacional de enfermos renales<sup>283</sup>.

### Ácido úrico

Los valores de ácido úrico fueron más elevados en los grupos Pre-D y DP, siendo significativa la diferencia entre el grupo Pre-D y HD. Éste último grupo obtuvo el valor más bajo entre los grupos estudiados. El ácido úrico es una molécula de bajo peso molecular, derivado del metabolismo de las purinas. Sus niveles aumentan cuando declina la función renal y también bajo la influencia de diuréticos, sin embargo es fácilmente dializable<sup>284</sup>. Son precisamente los grupos Pre-D y DP, con los valores más altos, los que supuestamente toman más diuréticos, siendo menor la toma en los pacientes en HD, ya que la mayoría de estos pacientes no poseía función renal residual.

Estudios recientes han relacionado el aumento sérico de ácido úrico con la tasa de mortalidad por causas cardiovasculares<sup>285</sup>.

### Lípidos

En cuanto al perfil lipídico, el peor lo presentó el grupo de DP. Es preciso hacer una salvedad en este punto, ya que el grupo control presenta las cifras de colesterol total y LDL-colesterol más elevadas, con mejor comportamiento de triglicéridos y HDL-colesterol. Esta circunstancia se podría atribuir a que los grupos estudiados, son grupos de enfermos tratados. Además, el efecto de epidemiología inversa se ha descrito en este grupo de población, y por ello, cifras bajas de colesterol, a veces reflejan estados de malnutrición o inflamación crónica.

En los pacientes con ERC existen alteraciones de la distribución de lípidos y de apolipoproteínas dentro de cada tipo de lipoproteína. Estos cambios pueden ser cualitativos y cuantitativos y pueden aparecer desde fases precoces de la insuficiencia renal. El hallazgo más constante es la elevación de triglicéridos, que estarán elevados en todas sus fracciones tanto VLDL e IDL. La cantidad de colesterol presente en IDL y VLDL se eleva, mientras que disminuye en las HDL. El origen de la dislipemia en la insuficiencia renal puede deberse a varios mecanismos entre los que se parecen más importantes son un incremento en la producción hepática de VLDL y/o una disminución en la degradación de triglicéridos y VLDL por el descenso en la actividad de diversos enzimas como la lipoprotein lipasa o la lipasa pancreática.

El grupo de DP presentaba los valores más bajos de HDL y los más altos de Colesterol total, LDL-colesterol y Triglicéridos de los tres grupos estudiados. En algunos casos, el tratamiento con DP, lejos de mejorar las alteraciones lipídicas acontecidas en la uremia, puede llegar incluso a empeorarlas sobre todo durante los primeros meses del tratamiento. El ascenso de las cifras de triglicéridos puede ser multifactorial y clásicamente se ha atribuido a varios factores: en primer lugar por la absorción intraperitoneal de glucosa, en segundo lugar, por un aumento en la ingesta al corregir la situación de uremia y por último a un estado de hiperinsulinismo, que favorecería la síntesis de VLDL y otras lipoproteínas.

El aumento del colesterol en DP se atribuye clásicamente a la pérdida de proteínas por el líquido peritoneal como ocurre en el síndrome nefrótico

En conclusión, los pacientes en DP presentaban un peor perfil lipídico y por tanto más aterogénico que los pacientes en Pre-D o en HD.

### **7.3.- Análisis del estado inflamatorio**

Todos los grupos presentaban un ascenso de los marcadores inflamatorios PCR as y Fibrinógeno respecto al grupo control. Numerosos estudios han demostrado una asociación entre la insuficiencia renal y diferentes marcadores de estado inflamatorio, incluso en pacientes con moderado descenso de la función renal, sugiriendo que la ERC puede considerarse como un proceso inflamatorio de bajo grado. La PCR constituida a nivel local en los tejidos, reduce la producción del óxido nítrico, estimula la producción de factores vasoconstrictores como la endotelina-1 e induce algunos de los pasos involucrados en el proceso de aterosclerosis. Además, niveles elevados de PCR, IL-6 y fibrinógeno se han mostrado ser predictores de eventos cardiovasculares en pacientes con ERC<sup>286</sup>.

El estrés oxidativo es capaz de activar factores transcripcionales como NF- $\kappa$ B el cual regulará la expresión de genes de mediadores inflamatorios. El factor NF- $\kappa$ B es un dímero que se mantiene inactivado en el citoplasma gracias a la unión a proteínas inflamatorias. Cambios oxidativos de estas proteínas facilitarán la activación del factor NF- $\kappa$ B<sup>287</sup>.

Entre todos los grupos estudiados, es el grupo DP el que muestra niveles de moléculas inflamatorias inferiores al resto, sin diferencias significativas con la población control, mostrándose así como el grupo que mejor controla el estado inflamatorio común de la ERC.

En este estudio, intentamos minimizar el efecto inflamatorio que podrían añadir factores como el ser portador de catéter tunelizado para diálisis y aún así, el grupo HD tenía valores de PCR superiores al grupo DP. Este grupo, era sin duda el que mejor perfil inflamatorio presentaba, reflejo probablemente de una biocompatibilidad superior de la técnica.

### **7.4.- Análisis del estrés oxidativo por grupos**

A pesar de tratarse todos los pacientes del estudio de enfermos renales crónicos, no son pocas las diferencias que presentan los tres grupos. Existen

circunstancias peculiares en cada grupo que definen su estado metabólico y creemos que determinan su estado oxidativo, por lo que se hace necesario un primer análisis de los grupos por separado.

#### 7.4.1.- Análisis del grupo PREDIÁLISIS

Generalmente el estudio del estrés oxidativo en población con Enfermedad Renal Crónica se ha centrado en la población en diálisis, con la intención fundamental de demostrar el beneficio o no de la técnica en este aspecto. Sin embargo, la población en Pre-D se caracteriza por la confluencia de múltiples factores de riesgo cardiovascular capaces por sí solos de provocar este estrés (nuestro grupo en concreto presentaba una altísima prevalencia de diabetes mellitus)

En las últimas dos décadas ha aumentado el interés en descubrir las causas de la elevada morbi-mortalidad cardiovascular de la población con ERC, por ello el estrés oxidativo ha sido objeto de múltiples estudios, en virtud de las pruebas que lo posicionan en el centro de la fisiopatología de la placa de ateroma. Sin embargo, en la población en Pre-D, la mayor parte de los trabajos de los que disponemos se centran en escasos biomarcadores oxidativos.

En nuestro caso se trata de una población donde existe una prevalencia de hipertensión del 100% de los pacientes en mayor o menor grado y de diabetes superior a un 40%. En cuanto a la dislipemia, aunque el 65% de los enfermos tenían este diagnóstico, un porcentaje del 59.4% recibía tratamiento hipolipemiente con estatinas, por lo que la media de todos los parámetros lipídicos estaba dentro de un rango normal.

Dado que existía un alto porcentaje de pacientes diabéticos en este grupo, analizamos que influencia podía tener la presencia de diabetes en los valores



de estrés oxidativo y encontramos diferencias significativas tanto para parámetros de peroxidación lipídica (F2-Isoprostanos) como para daño material genético (8-oxo-dG nuclear), así como para la catalasa entre las enzimas antioxidantes. Además, aunque no se encontraran diferencias significativas entre el grupo de diabéticos y los que no lo eran, la tendencia fue encontrar los parámetros oxidados más altos en el grupo de diabéticos y los antioxidantes más bajos, así como también el glutati6n. Estos hallazgos sugieren que efectivamente existe una influencia de la diabetes sobre el estrés oxidativo en este grupo.

### *Peroxidaci6n lipídica en Prediálisis*

La peroxidaci6n lipídica se estudi6 mediante dos parámetros, MDA y F2-Isoprostanos plasmáticos.

El MDA ha sido desde el inicio uno de los parámetros más analizados como producto final de la peroxidaci6n lipídica<sup>288</sup> y varios autores han encontrado niveles elevados en pacientes con ERC<sup>289</sup>. En nuestro estudio también encontramos niveles significativamente elevados de MDA. Sin embargo, a pesar de ser un 6ptimo marcador de estrés oxidativo, presenta limitaciones a la hora de ser evaluado en la poblaci6n urémica. El MDA es una molécula de bajo peso molecular y puede eliminarse por vía renal o ser dializada. La gran mayoría de los resultados publicados sobre niveles de MDA hacen referencia a niveles plasmáticos, generalmente niveles de MDA total, sin embargo, recientemente De Vecchi y cols<sup>290</sup> han publicado diferentes patrones de comportamiento del MDA plasmático. En plasma, la molécula está presente tanto libre como unida a macromoléculas. Sin embargo la naturaleza y capacidad lesiva es diferente. Mientras que la fracci6n unida a macromoléculas será relativamente estable y la consideraríamos marcador de daño antiguo, la libre sería la potencialmente más perjudicial.

Los datos disponibles en la literatura pueden resultar confusos, si no hacen referencia a la fracci6n de MDA que se ha determinado y en la mayoría de

las ocasiones se trata de ambas fracciones juntas (MDA total). Según de Vecchi en la medida en que la fracción unida a macromoléculas se eliminaría en orina tras una transformación enzimática de las proteínas a las que va unida, podrá verse afectada por el deterioro de la función renal, por lo que nos encontraremos con niveles elevados. En nuestro estudio, se trata de una determinación de MDA en linfocitos y no en plasma, y por ello nos encontramos con niveles fiables, que como veremos a continuación se comportarán de forma similar a los niveles de otras moléculas oxidadas.

La medición de los F2-Isoprostanos plasmáticos ha adquirido especial interés en los últimos años en la evaluación in vivo del estrés oxidativo por diversos motivos. Se trata de moléculas más estables que otros lípidos oxidados (ej LDL-oxidadas) y que al ser medidas en plasma en su forma esterificada no sufren aclaramiento renal o depuración por diálisis<sup>291</sup>, superando así a la molécula de MDA total en la evaluación de los productos plasmáticos derivados de la peroxidación lipídica. Se han demostrado niveles elevados de F2-Isoprostanos tanto en fumadores<sup>292</sup> como en pacientes diabéticos<sup>293</sup>. Handelman et al encuentra niveles de F2-Isoprostanos elevados en pacientes en Hemodiálisis, y encuentra correlación con los niveles de PCR de sus pacientes<sup>291</sup>.

Recientemente Cottone et al<sup>294</sup> han medido F2-Isoprostanos en una extensa muestra de 626 pacientes hipertensos en diferentes estadios de ERC, encontrando correlación negativa con el grado de función renal. Otros autores como Donousi et al<sup>295</sup> también encuentran esta correlación en una muestra de 87 pacientes con ERC en estadios del 1 al 4. En el presente estudio, sin embargo, no se pudo demostrar esta relación, quizás porque se trate de una muestra de pacientes más pequeña o también porque todos se encuentren en un estadio muy avanzado de enfermedad renal. De hecho, llama la atención que en el trabajo de Donousi la media de los valores de F2-Isoprostanos en el estadio 3 es superior a la del estadio 4. Resulta muy interesante comprobar como otros autores han encontrado normalización de

los niveles de F2-Isoprostanos tras la recuperación de la función renal tras el trasplante renal<sup>296</sup>.

En concordancia a nuestros resultados se encuentra el trabajo de Oberg et al<sup>297</sup>, donde en una muestra de 60 pacientes, con un filtrado glomerular medio de 27.11 ml/min tampoco logra encontrar relación con los niveles de F2-Isoprostanos.

Se ha demostrado que los F2-Isoprostanos se comportan como potentes moléculas vasoconstrictoras, efecto mediado por el receptor del tromboxano, por lo que se sugiere la hipótesis de que además de un índice oxidativo pudiera jugar un papel en el fracaso renal. De hecho Morrow et al<sup>298</sup> propusieron que la vasoconstricción presente en el síndrome hepatorenal estaba mediada por F2-Isoprostanos entre otras moléculas vasoactivas.

Todos estos resultados sugieren de la peroxidación lipídica es un fenómeno universal en los pacientes con ERC que se inicia probablemente en fases tempranas y que se mantiene en niveles altos durante la progresión de la enfermedad. A la luz de los datos bibliográficos, los F2-Isoprostanos serían marcadores de peroxidación lipídica de más fiabilidad que el MDA libre en la población urémica, cuando valoramos niveles plasmáticos. En el presente estudio, el comportamiento fue diferente, probablemente debido a la determinación de valores linfocitarios que, en definitiva, son más estables.

### *Oxidación proteica en Prediálisis*

Witko-Sarsat et al<sup>299,300</sup> identificaron los productos finales de la oxidación proteica avanzada (AOPPs) en virtud de su analogía con los productos AGEs en pacientes con ERC y en diferentes situaciones: en Pre-D, HD y DP. En nuestro estudio la valoración de la oxidación proteica la realizamos con la medición de las proteínas carboniladas y con el estudio del ciclo redox del glutatión (GSSG/GSH).

Las proteínas carboniladas son un importante marcador de la oxidación proteica y reflejo de la formación de grupos aldehído. Heinecke y colaboradores<sup>301</sup> demostraron que mediante reacciones oxidativas mediadas por la enzima mieloperoxidasa se podían convertir aminoácidos comunes en aldehídos altamente reactivos, los cuales tienen un papel preponderante en la génesis de la placa ateromatosa<sup>302</sup>. Estos autores inciden en la importancia que tienen las reacciones mediadas por la enzima mieloperoxidasa en la contribución al desarrollo de la placa de arteriosclerosis. Productos derivados de la oxidación del aminoácido tirosina, mediada por la mieloperoxidasa, como la ditirosina o la 3-clorotirosina se han encontrado formando parte de moléculas de LDL-oxidadas y en muestras de arteriosclerosis en humanos<sup>303</sup>, de hecho, se han relacionado los niveles de mieloperoxidasa leucocitaria con riesgo elevado de sufrir enfermedad coronaria<sup>304</sup>. Nuestros enfermos presentaban unos valores de proteínas carboniladas significativamente más elevados que en grupo control, y al igual que con el resto de parámetros oxidativos tampoco hubo correlación con el MDRD, debido probablemente una vez más a motivos como una insuficiencia renal en estadios ya muy avanzados y en márgenes estrechos y a la confluencia de otros factores pro-oxidantes. Otros autores sí que han demostrado correlación de productos derivados de la oxidación proteica con el declive de la función renal considerando todos los estadios de insuficiencia renal<sup>305</sup>.

Una de las observaciones más interesantes del grupo de Himmelfarb y que pone de relieve la influencia de la función renal sobre el estado oxidativo fue comprobar en pacientes que recibieron un trasplante de vivo con evolución satisfactoria y recuperación completa de la función renal, como marcadores de inflamación (TNF- $\alpha$ ) y de estrés oxidativo (F2-Isoprostanos y proteínas carboniladas) medidos antes y tras el trasplante descendían de forma significativa sólo una semana después del mismo y que las proteínas carboniladas seguían descendiendo transcurridos dos meses<sup>296</sup>.

### *Daño oxidativo del DNA en Prediálisis*

El DNA es una estructura molecular especialmente vulnerable al ataque de las especies reactivas de oxígeno, tanto más si consideramos la molécula de DNA mitocondrial, debido a la alta tasa metabólica presente a nivel mitocondrial. Existen pocos estudios del daño oxidativo del material genético en pacientes con enfermedad renal y la mayoría lo hacen en pacientes en hemodiálisis<sup>306</sup>. Entre las modificaciones que puede experimentar el DNA inducidas por las EROs la molécula 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) es una de las más frecuentes. Se sabe que el radical hidroxilo reacciona rápidamente con la base nucleotídica guanosa para dar lugar a la molécula 8-oxo-dG y que ésta se ha propuesto como un buen marcador de la estimación de la producción de este radical libre. Probablemente otras EROs intervengan en este proceso, sobre todo en estos pacientes donde existe un marcado déficit de actividad de la enzima catalasa, dando lugar a un aumento en la disponibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El daño oxidativo del DNA es capaz de inducir un envejecimiento celular precoz así como un aumento en la incidencia de cáncer<sup>307</sup>. Tarng<sup>308,309,310</sup> ha demostrado que el contenido de 8-oxo-dG en DNA nuclear proporciona una medida fiable del daño oxidativo del material genético en leucocitos periféricos en pacientes con filtrado glomerular inferior a 20 ml/min y en hemodiálisis crónica. Curiosamente los pacientes con ERC tienen una incidencia mayor de cáncer que la población general, aunque es cierto que estos pacientes merecen una atención especial, ya que la propia técnica podría influir en el equilibrio oxidativo<sup>311</sup>. Watanabe et al midieron 8-oxo-dG en pacientes con Insuficiencia Renal Avanzada (FG promedio: 6.4 ml/min) y encontraron una correlación inversa entre los niveles de 8-oxo-dG y los niveles de histidina, un aminoácido que se comportaría como marcador del estado nutricional, sugiriendo un vínculo entre malnutrición y estrés oxidativo en esta población. En un grupo de hipertensos, Redón et al<sup>312</sup> encontraron niveles elevados de 8-oxo-dG tanto nuclear como mitocondrial en células mononucleares periféricas. Este grupo no pudo establecer correlación entre el grado de hipertensión y el aumento de

marcadores oxidativos. Los autores piensan que puede ser debido a que en el paciente hipertenso pueden confluír otros factores como el aumento de la actividad de la angiotensina II o un estado de hiperinsulinemia que podrían influir en el estrés.

En nuestra población encontramos un aumento generalizado tanto de 8-oxo-dG nuclear como mitocondrial, con amplias diferencias significativas respecto al grupo control. Del mismo modo que al estudiar la peroxidación lipídica tampoco encontramos correlación con el deterioro de la función renal. Pensamos que esto puede ser debido de nuevo, a la confluencia de múltiples factores comórbidos en estos pacientes, de hecho la totalidad eran hipertensos, aparte de que más de un 40% era diabéticos, y de que estudiamos pacientes en un estadio muy avanzado de la enfermedad renal.

#### *Enzimas antioxidantes en Prediálisis*

El estudio del estrés oxidativo se completó con el análisis de la actividad de las principales enzimas antioxidantes así como del glutatión.

En condiciones normales, la concentración de antioxidantes es bastante superior a la concentración de productos oxidantes, de manera que la generación continua de radicales libres, derivados del metabolismo celular queda regulada y neutralizada por ellas. Una protección antioxidante eficaz requiere la actuación sincronizada de las tres enzimas estudiadas: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Encontramos la actividad de las tres enzimas significativamente disminuida en el grupo Pre-D, reflejo del desequilibrio que existe entre los factores oxidantes y antioxidantes. Moradi et al<sup>313</sup> encuentran recientemente un descenso de hasta un 50% en los valores de GPx junto con otras enzimas y moléculas con capacidad antioxidante en una muestra de pacientes en HD, frente a un grupo control, además comprueban que una sesión de HD no logra normalizar sus niveles.

#### 7.4.2.- Análisis del grupo HEMODIÁLISIS

El grupo HD era el grupo más añoso de los tres estudiados y con más tiempo de permanencia en la técnica respecto al grupo DP, por tanto es lógico encontrar una mayor prevalencia de cardiopatía isquémica. Es sobre esta población donde existen más estudios de estrés oxidativo, bien para valorar el efecto de un sesión de HD, de la técnica a largo plazo, o bien evaluando diferentes circunstancias como distintas membranas o la acción de suplementos vitamínicos.

En la medida de lo posible y con los recursos disponibles, se intentó que la población en HD, fuera homogénea para limitar el número de factores influyentes y se expusiera mínimamente a factores estresantes, como infusión reciente de Hierro iv. que fue suspendido un mes antes de la toma de las muestras, o como el uso de filtros compuesto por membranas sintéticas de alta permeabilidad, consideradas de las más biocompatibles. En este sentido es preciso destacar que la planta de agua de la Unidad de Hemodiálisis del Hospital Clínico suministraba en el momento del estudio agua libre de endotoxinas y con una conductividad de 1 $\mu$ S.

De manera uniforme todos los parámetros oxidativos estuvieron elevados respecto al grupo control, así como disminuídas las actividades de las enzimas antioxidantes medidas. Estos resultados se comentan a continuación.

#### *Peroxidación lipídica en Hemodiálisis*

Respecto a la molécula MDA, nuestros resultados están en concordancia con la de varios autores que también encuentran niveles elevados en población en HD<sup>314,315</sup>. El MDA es un producto final de la peroxidación lipídica con las limitaciones que ya se comentaron en el apartado de Pre-D,

al ser una molécula que presenta diferentes patrones de comportamiento y pierde parte de su valor si sólo se determinan niveles totales y no su fracción libre, más reactiva. Dado que los valores que nosotros hemos determinado no son plasmáticos sino en linfocitos podemos tener cierta ventaja en la determinación de MDA como producto de lipoperoxidación, pues serán niveles más estables. Sin embargo, debido a su carácter hidrosoluble y a su pequeño tamaño, el MDA tiene un comportamiento similar a cualquier otra toxina urémica, por lo que una vez más su valor se encuentra en entredicho. Por otro lado, no debemos infravalorar el valor del MDA a la luz de los numerosos estudios que la relacionan con la prevalencia de enfermedad cardiovascular en pacientes en HD<sup>314</sup>. Palleschi et al<sup>315</sup> cuantifican niveles de MDA antes y después de sesiones tanto de HD como de HDF (hemodiafiltración). Nuestros resultados son acordes a los suyos antes de la sesión. Estos autores encuentran disminuidos los niveles después de la sesión de diálisis y por tanto encuentran un argumento sólido para concluir que la molécula de MDA es aclarada por difusión. Previamente otros autores ya habían encontrado resultados similares como Daschner et al en población pediátrica<sup>316</sup>. Estos autores midieron otros productos derivados de peroxidación como el grupo hexanal, que por su carácter lipofílico, consideraron mejor marcador de lipoperoxidación en pacientes pediátricos con ERC en HD o DP. El hexanal es un producto específico de oxidación derivado únicamente de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega 6$ , de carácter lipofílico. Los autores no consiguieron demostrar niveles significativamente elevados de hexanal en estos pacientes y sólo una cierta tendencia a su aumento al medirlos después de la sesión de diálisis.

En la misma línea de los resultados de Himmelfarb obtuvimos niveles uniformemente elevados de F2-Isoprostanos en la población en HD<sup>317</sup>. Ikizler et al midieron F2-Isoprostanos tanto libres como esterificados en plasma en esta población. Ambos resultaron estar elevados respecto a la población sana control, aunque más elevados los esterificados, probablemente porque no eran eliminados por diálisis. Midieron además niveles de F2-Isoprostanos libres en varios tiempos de sesiones de HD con diferentes membranas: biocompatibles (polisulfona) y bioincompatibles



(cuprofan), observando un comportamiento muy similar entre las dos membranas, con una tendencia significativa hacia el descenso de los niveles en los primeros 30 minutos de la sesión y un nuevo ascenso al final de las cuatro horas. A pesar de lo que cabría pensar en cuanto al potencial inflamatorio y oxidativo de una sesión de HD, incluso con una membrana bioincompatible, estos autores demostraron descenso progresivo de F2-Isoprostanos a lo largo de la sesión, aunque con un repunte final y concluyeron que la sesión de HD parecía tener menor influencia en el estado oxidativo que los efectos a largo plazo de la uremia *per se*. Aun así, los autores se mantenían cautos ante estos resultados que debían ser interpretados con precaución, ya que el efecto de una única sesión de HD, no podía ser equiparable a la exposición reiterada del plasma a productos bioincompatibles, aunque desde luego sí planteaban la cuestión del peso del estado urémico o de la HD sobre el estrés oxidativo.

#### *Oxidación proteica en Hemodiálisis*

En el grupo HD y al igual que los lípidos se encontraron elevadas las moléculas derivadas de la oxidación proteica, cociente GSSG/GSH y proteínas carboniladas.

Otros autores han encontrado resultados similares<sup>305,318</sup>. El grupo de Himmelfarb también midió productos derivados de la oxidación proteica en pacientes hemodializados. Sus resultados concuerdan con los nuestros en muchos aspectos pero además comprobó que los niveles de proteínas carboniladas no se veían aumentados a lo largo del primer año tras el inicio del tratamiento con hemodiálisis. Al inicio y luego, con una periodicidad de tres meses durante el primer año, midieron proteínas carboniladas y otros parámetros inflamatorios como PCR e IL-6 en 50 pacientes. Observaron que estos marcadores de inflamación y estrés oxidativo se encontraban elevados al inicio de la técnica respecto a un grupo sano control y que sus niveles se mantenían estables durante el primer año de HD (sin cambios

significativos). Otra observación interesante en este estudio fue la ausencia de relación con la función renal residual y con otros parámetros clínicos como el tipo de acceso vascular, la presencia de hipertensión o de enfermedades concomitantes, en los niveles de proteínas carboniladas. Sólo la presencia de diabetes, al analizarla de forma independiente, se asoció con un incremento significativo de estas proteínas. Con estos resultados los autores encuentran evidencia para concluir que el inicio de HD no afectó significativamente al estado inflamatorio ni al estrés oxidativo presentes antes de iniciar la técnica<sup>319</sup>. Unos años antes el mismo grupo de investigadores, midieron el efecto de diferentes membranas de diálisis sobre los niveles plasmáticos de proteínas oxidadas por grupos thiol. Aunque estos resultados no pueden ser concluyentes, dado que se trataba de un grupo de tan sólo 10 pacientes, resulta curioso descubrir que no observaron diferencias significativas en estos niveles en las distintas determinaciones realizadas en cada sesión de HD, entre diálisis con polisulfona (como membrana biocompatible) o con cuprofan (membrana bioincompatible).

Ward et al<sup>320</sup> midieron también el efecto de dos tipos de membrana (polisulfona y triacetato de celulosa) a lo largo de una sesión de diálisis, observando la variación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (medido por citometría de flujo) y de la formación de grupos tioles y carbonilo unidos a proteínas (oxidación proteica). Encuentran que basalmente todos los niveles están elevados respecto a un grupo control y que al final de la sesión la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se restablecía hasta niveles normales, así como la de grupos tioles libres, pero no la de grupos carbonilo. La oxidación proteica por grupos carbonilo supone una modificación irreversible de las proteínas afectadas, no así la oxidación mediada por grupos tiol, que por sus propiedades químicas se unen de forma reversible a las proteínas y una sesión de HD es capaz de restaurar sus niveles normales en estos pacientes. No se encontraron diferencias significativas entre las dos membranas que tuvieron un comportamiento paralelo en todos los parámetros medidos.

Nuestro grupo publicó la experiencia con 15 pacientes en HD. Se midieron parámetros oxidativos como el MDA, ratio GSSG/GSH y 8-oxo-dG nuclear

antes y después de una sesión. Todos los parámetros descendían después de la sesión de forma significativa, sugiriendo que probablemente, alguna sustancia pro-oxidante debía ser dializada y se restablecía de alguna manera el equilibrio al disminuir el estado urémico<sup>321</sup>.

Sólo encontramos correlación positiva con el tiempo de permanencia y los valores de GSSG/GSH. Ningún otro valor la mostró. A la vista de estos resultados una de las posibilidades que nos planteamos es que muchas moléculas oxidadas podrían comportarse como toxinas urémicas, no tanto por la particularidad de ser dializadas (son macromoléculas), sino por los ascensos y descensos en sus niveles que nosotros y otros autores han encontrado antes y después de la sesión. Roselaar y cols<sup>322</sup> lo atribuían a la depuración de moléculas pro-oxidantes, aunque también podría ser debido a que al disminuir el ambiente urémico la capacidad antioxidante del plasma aumentaría y por tanto los sistemas de defensa serían más eficaces.

La acción sobre la oxidación molecular, de la infusión de hierro intravenoso en los pacientes que reciben hemodiálisis ha merecido también la atención de varios investigadores. Mientras que un balance óptimo de hierro es necesario para una eritropoyesis eficaz y para disminuir la dosis necesaria de agentes estimuladores de la eritropoyesis en estos enfermos, sabemos que el hierro es un metal pesado que mediante la reacción de Fenton, cataliza la formación de radicales hidroxilo. Drüeke et al encontraron una correlación positiva entre los niveles de productos finales de la oxidación proteica, la dosis anual total de hierro intravenoso recibida y el espesor íntima-media carotídeo en un estudio de 79 pacientes en HD crónica<sup>323</sup>.

En vistas a estas observaciones nos pareció importante incluir en el protocolo de este estudio la supresión de hierro intravenoso días antes de la toma de las muestras y evitar así la influencia de éste sobre el estrés oxidativo.

### *Daño oxidativo del material genético en Hemodialisis*

Como el resto de parámetros existían niveles elevados de 8-oxo-dG tanto nuclear como mitocondrial en el grupo HD.

En la última década el grupo taiwanés de Tarng es el que más se ha centrado en el estudio del daño oxidativo del DNA en pacientes con ERC y especialmente aquellos en HD<sup>308</sup>. Este grupo ha comparado el efecto de los dos tipos de membrana compatibles y no biocompatibles (sintética y celulósica) sobre la generación de 8-oxo-dG. Encontraron diferencias significativas entre los niveles más altos del grupo con membrana de celulosa frente al grupo dializado con membranas sintéticas. Además analizaron los niveles tras hacer un cambio de membranas en cada grupo, corroborando los resultados, ya que el grupo que pasaba de membrana celulósica a sintética, tras varias semanas, disminuía los niveles de 8-oxo-dG. Sin embargo, la observación más peculiar de este estudio fue el conseguir los niveles más bajos de 8-oxo-dG cuando los pacientes pasaban a dializarse con membranas celulósicas tratadas con vitamina E. Medida además la producción de EROS mediante citometría de flujo, observaban como el metabolismo oxidativo de los granulocitos aumentaba debido a la activación de los mismos por la acción del contacto con la membrana de diálisis. Éste efecto era similar entre la membrana sintética (no activadora del complemento) y la celulósica tratada con vitamina E. Por otro lado, los niveles de ferritina y de  $\alpha$ -tocoferol fueron, junto con el tipo de membrana, los únicos predictores independientes de los niveles de 8-oxo-dG. Está demostrado que el hierro, facilita la formación de radicales hidroxilo y aumenta la oxidación del DNA<sup>324,325,326</sup>. Por tanto, la combinación de una sobreproducción intracelular de EROS al enfrentar la sangre a una membrana de diálisis bioincompatible junto con una sobrecarga férrica resultará en un potencial daño oxidativo del DNA leucocitario. El secuestro *in situ* de EROS por la vitamina E, era capaz de atenuar el daño del DNA producido por la membrana bioincompatible, lo que resultaría beneficioso tanto en la disminución de la incidencia de neoplasias como en la mejora del sistema inmune mediada por células leucocitarias.

### *Enzimas antioxidantes en Hemodiálisis*

Los niveles de todas las enzimas antioxidantes medidas se encontraban disminuídos en el grupo HD, siendo además el grupo que presentaba niveles más bajos en todas. Este efecto podría atribuirse a dos hechos todavía no bien aclarados. Por un lado la generación continua de EROS por el estado urémico y la HD y por otro lado la pérdida de estas enzimas por el propio proceso de difusión y convección.

Morena et al<sup>327</sup> midieron la influencia de estos dos mecanismos físicos sobre el aclaramiento de vitamina C, mediante la técnica de “*paired filtration dialysis*”, que consiste en una variante de la técnica de hemodiafiltración que separa físicamente el flujo convectivo y difusivo. Sus resultados demostraban, que los niveles basales de vitamina C se encontraban todos por debajo de la media de la población control, y que además durante la diálisis se producía una pérdida dramática de ésta, fundamentalmente por el mecanismo físico de difusión.

La baja disponibilidad de glutatión, atribuible bien a la pérdida por diálisis (molécula de bajo peso molecular) o bien a su consumo como potente antioxidante, justificaría en este caso el descenso en la actividad de las enzimas glutatión reductasa y peroxidasa que precisan de éste como sustrato. Sin embargo, encontramos también mermado el potencial antioxidante de otras enzimas como la catalasa y la SOD. La actividad de la SOD se ha encontrado tanto aumentada<sup>328</sup> como disminuída en pacientes en diálisis<sup>329</sup>, lo que demuestra que se trata todavía de un tema controvertido. Si bien nuestros resultados nos inclinan a pensar que existe un déficit antioxidante claro en estos enfermos, que afectaría a varios niveles enzimáticos, bien por pérdida de los antioxidantes por las membranas de diálisis o por agotamiento de los mismos.

#### 7.4.3.- Análisis del grupo DIÁLISIS PERITONEAL

Como se comentó previamente se trata de un grupo más joven y con menor tiempo de permanencia en la técnica, que como se describe en la introducción es, en principio, más biocompatible por el uso de una membrana “natural” para diálisis.

Un aspecto importante a tener en cuenta será la influencia de función renal residual, que en ocasiones resulta clave en la evolución de estos enfermos y que podría tener un papel importante en el mantenimiento del balance entre oxidantes y antioxidantes. El beneficio del mantenimiento de la función renal residual es un hecho demostrado.

Existen en general menos estudios de estrés oxidativo en pacientes que reciben DP que en pacientes en HD. Muchos de los que existen se afanan en determinar cuáles son los factores que más perjudican la membrana peritoneal, derivando en la pérdida de sus funciones y su estructura.

La esterilización por calor de las soluciones de intercambio peritoneal degrada la glucosa en distintos productos entre los que se encuentran compuestos reactivos carbonilo como el glioxal, metilglioxal o 3-deoxiglucosona todos ellos capaces de generar productos finales de glicosidación en las proteínas (AGEs) como la pentosidina.

#### *Peroxidación lipídica en DP*

Recientemente se ha demostrado una relación entre peroxidación lipídica (niveles de MDA libre) y función renal residual<sup>330</sup>. Sin embargo, los mecanismos implicados en esta relación no quedan aclarados del todo. Un menor estrés oxidativo podría explicar la mayor supervivencia que muestran los enfermos con mayor función renal residual mantenida. Los autores del estudio anterior pensaron que la comorbilidad presente (diabetes, inflamación o malnutrición) relacionados con mayor pérdida de la función

renal residual podrían justificar este vínculo con el estrés oxidativo, sin embargo el análisis multivariante no logra corroborar esta hipótesis. Por lo tanto, permanece todavía sin resolver el hecho de que los pacientes con mayor función renal residual mantengan mejor balance oxidativo. Hecho que nosotros tampoco hemos podido demostrar.

### *Oxidación proteica en DP*

Los niveles de proteínas carboniladas y el ratio GSSG/GSH se encontraban también elevados respecto a la población control. Boulanger et al<sup>331</sup> observaron un comportamiento curioso en cuanto a los niveles de AOPP en pacientes que iniciaban DP. Medidos en 22 pacientes junto con los AGEs previo al inicio y a los seis y doce meses de tratamiento. Observaron un ascenso de los AGEs y un descenso progresivo en los niveles de moléculas proteicas oxidadas. Los autores opinaban que el ascenso de los AGEs a lo largo del tratamiento debía estar más en relación con la glicosidación que con procesos de glicoxidación, demostrando de hecho el descenso de las moléculas oxidadas. En nuestro grupo también encontramos niveles inferiores de moléculas oxidadas en el grupo DP respecto al grupo Pre-D. Otros autores han encontrado resultados similares<sup>332</sup>. Los AOPP podrían jugar un papel importante en el proceso de arteriosclerosis, probablemente por activación de monocitos y el proceso inflamatorio y disminuir la biodisponibilidad de Oxido Nítrico, potente vasodilatador. Kocak et al<sup>333</sup> encontraron correlación entre parámetros de disfunción endotelial con AOPP en pacientes en DP.

### *Daño oxidativo del material genético en DP*

Como el resto de parámetros las moléculas 8-oxo-dG nuclear y mitocondrial se encontraban aumentadas. Tarng et al han estudiado también el impacto de la DP sobre la generación de 8-oxo-dG nuclear así como la generación de EROs medidos por citometría de flujo<sup>334</sup>. Estos autores midieron la generación de 8-oxo-dG en leucocitos periféricos a lo largo de las cuatro

horas de permanencia de la infusión peritoneal y con diferentes concentraciones. El comportamiento de la 8-oxo-dG fue de ascenso significativo durante la primera hora para descender posteriormente a los niveles iniciales sin diferencias significativas con cualquiera de las concentraciones de glucosa utilizadas. En el análisis multivariante entre todos los sujetos del estudio de Tarng et al (tanto pacientes en DP como en Pre-D), la uremia y el tratamiento con DP fueron los únicos factores independientes predictores de los niveles de 8-oxo-dG.

### *Enzimas antioxidantes en DP*

La presencia de estrés oxidativo en los pacientes en DP se ha relacionado con la bioincompatibilidad de las soluciones utilizadas caracterizadas por tener un bajo pH, alta osmolaridad, altas concentraciones de glucosa que se degradan a productos de glicosidación avanzadas (AGEs), inductores de estrés oxidativo<sup>335</sup> y los residuos plásticos denominados “plásticos” derivados del plástico de las bolsas del líquido peritoneal. La pérdida de factores antioxidantes como vitaminas, glutatión y enzimas antioxidantes, a través del peritoneo tendría también un importante valor. Es por ello, que los niveles de tanto de glutatión como de catalasa, SOD y otras enzimas antioxidantes se encuentran claramente disminuídas en el grupo DP. Sin embargo, es este grupo el que en conjunto presenta mejor perfil antioxidante que el resto de los grupos estudiados con enfermedad renal.

En nuestro trabajo, cabe destacar el comportamiento de la enzima SOD, que mostró correlación significativa con la función renal residual y con el tiempo de permanencia.



### 7.5.- Análisis comparativo entre los grupos

Aunque hacemos un análisis comparativo de los grupos, las conclusiones de estas observaciones deben ser vistas con cautela, ya que no se trata de un estudio prospectivo donde los pacientes se han seguido desde su situación en Pre-D y posteriormente en la técnica sustitutiva. Se trata de un estudio observacional con corte transversal de tres poblaciones con diferencias entre sí y sobre todo con mucha comorbilidad asociada, sin embargo, al comprobar diferencias significativas entre los grupos y aunque su causa sea multifactorial creemos de interés presentar estos resultados.

El grupo Pre-D es el que presenta mayor elevación de las moléculas oxidadas, lo que induce a pensar en el peso de la uremia *per se* y de los factores asociados a la misma sobre el estrés oxidativo.

Una de las preguntas que nos planteamos era si las técnicas sustitutivas al mejorar el estado urémico, mejorarían el estrés oxidativo o si por el contrario la posible bioincompatibilidad de las mismas lo empeoraría.

A pesar de que no se puede afirmar con rotundidad que las técnicas de diálisis mejoran el estrés oxidativo de los pacientes con ERC, los resultados del estudio sugieren que así es, ya que uno de los hallazgos más significativos del presente trabajo es el hecho de encontrar niveles oxidativos menos elevados en las dos poblaciones sometidas a técnicas de depuración extrarrenal, tanto HD como DP.

Clásicamente se ha relacionado la HD con el concepto de bioincompatibilidad. Es esperable, que el hecho de enfrentar la sangre a materiales extraños, genere una reacción defensiva inflamatoria del organismo que paradójicamente acabe dañándolo. A pesar de que quedan muchos puntos por mejorar en el ámbito de la biocompatibilidad, en los últimos años se ha asistido a una revolución tanto en las técnicas como en los materiales implicados en la HD. En este caso, el grupo de HD se dializaba con membranas consideradas biocompatibles y agua ultrapura (1 mSm), de manera que se minimizaron parte de factores amenazantes de estrés oxidativo, y probablemente sea una de las justificaciones de encontrar

niveles inferiores de moléculas oxidadas, respecto al grupo Pre-D. Podemos, por tanto, suponer que la “amenaza” principal era el estado urémico y éste al fin y al cabo estaba parcialmente resuelto.

En el estudio de Pupim et al<sup>319</sup> no encontraron diferencias significativas entre los niveles de proteínas carboniladas justo antes de iniciar la técnica (grupo Pre-D) y transcurridos doce meses después, sin embargo las determinaciones intermedias de estas proteínas oxidadas sí presentaban tendencia a ser inferiores a lo largo del tiempo (determinaciones a los tres, seis y nueve meses), de la misma manera que demostraron un descenso progresivo en los niveles de parámetros inflamatorios (PCR e IL-6) a lo largo de las distintas mediciones en este periodo.

El grupo DP se presenta como el grupo con menor daño oxidativo, lo cual apoyaría, los supuestos anteriores. No hay que olvidar que es el grupo más joven y que en parte, estos resultados estarán influenciados por la edad. Como se observa en la tabla de comparación entre individuos mayores o menores de 70 años existen bastantes diferencias entre ambos grupos. Existen evidencias de que el envejecimiento celular es un proceso relacionado con el estrés oxidativo<sup>336</sup>. Sin embargo, es la técnica más biocompatible ya que no hay membranas extrañas, más que el propio peritoneo y además produce una depuración extrarrenal continua, sin cambios bruscos en los niveles de toxinas, a diferencia de la HD.

Otro hallazgo importante es que la población en DP conserve la mayor capacidad antioxidante de los tres grupos, (a pesar de las posibles pérdidas esperables a través de la membrana peritoneal). Esta reserva antioxidante, es a pesar de todo incapaz de neutralizar la producción de EROs y evitar la oxidación de macromoléculas.

Como se describió anteriormente, el grupo DP presentaba el peor perfil lipídico de los tres grupos estudiados, sin embargo, presentaba menor prevalencia de cardiopatía isquémica y accidentes cerebrovasculares, así como la media más baja de PCR. Por tanto, parece que el mejor control del

estrés oxidativo, pueda tener mayor relevancia que uno de los factores clásicos de arteriosclerosis como es la dislipemia. Por tanto, los esfuerzos para controlar la alta prevalencia de morbi-mortalidad cardiovascular en esta población deberán ir encaminados no sólo al tratamiento de los factores clásicos de riesgo cardiovascular, sino también a la mejora de la biocompatibilidad de las técnicas de diálisis y a fortalecer el sistema antioxidante de estos enfermos.

## ***8.- Fortalezas y debilidades***



- *Fortalezas:*

El análisis de los parámetros estudiados se realizó en células (linfocitos periféricos) y no en plasma como en la mayoría de estudios referidos, lo cual confiere mayor fiabilidad a los resultados por tratarse de un medio más estable.

Se trata de un estudio de varias líneas moleculares (lípidos, proteínas y material genético), con lo que pensamos que se consigue un estudio completo del estrés oxidativo de estos pacientes.

- *Debilidades*

El grupo control tiene una edad inferior al resto de los grupos. Atribuimos a que los grupos estudiados, sobre todo Pre-D y HD, comprenden población de avanzada edad (existían pacientes en Pre-D que debido a su avanzada edad o situación clínica, no eran ni siquiera candidatos a tratamiento sustitutivo), por lo que resultaba difícil encontrar población “sana” como control mayor de 70-75 años. El grupo DP, tiene una edad algo inferior ya que es una opción de tratamiento de gente más joven algunos de ellos en situación laboral activa.

Otra de las debilidades atribuibles podría ser no haber tenido en cuenta a los pacientes fumadores, dada la enorme influencia negativa sobre el estrés oxidativo que ha demostrado tener el tabaco.

La naturaleza del estudio (transversal, observacional), nos permite rechazar la hipótesis nula pero no permite extraer conclusiones definitivas en cuanto al beneficio de una técnica dialítica sobre la otra, debido también a las diferencias existentes entre los tres grupos estudiados.

Sería necesario realizar un estudio prospectivo donde cada paciente pudiera seguirse desde su etapa prediálisis hasta su situación en diálisis.

## ***9.- Conclusiones***





1. Existe un aumento del estrés oxidativo en la población con enfermedad renal crónica, definido por un aumento de macromoléculas oxidadas, tanto lípidos, proteínas como material genético y un descenso de la actividad de las principales enzimas antioxidantes.
2. La población en Pre-D presenta peor perfil oxidativo, con parámetros oxidados significativamente más elevados que la población con tratamiento sustitutivo (HD y DP), lo que induce a pensar que es el estado urémico *per se* uno de los principales causantes, dado que los otros dos grupos mantenían niveles adecuados de depuración de toxinas urémicas.
3. La alta prevalencia de factores comórbidos como la diabetes y la hipertensión en el grupo Pre-D también justificarían el desequilibrio entre oxidación y antioxidación.
4. Los grupos Pre-D y HD presentaban mayor estado inflamatorio definido por niveles altos de PCR de alta sensibilidad.
5. La menor carga oxidativa en los pacientes en DP se justificaría por el uso de una técnica más biocompatible unido a las características especiales de dicha población.
6. En nuestra población no encontramos correlación entre los parámetros de estrés oxidativo con el filtrado glomerular en el grupo Pre-D, probablemente debido a que se trataba de un grupo con ERC avanzada.
7. En los pacientes en diálisis no encontramos correlación con la función renal residual ni con el tiempo de permanencia en la técnica.
8. Entre todas las moléculas oxidadas estudiadas la 8-oxo-dG nuclear se muestra como uno de los parámetros más fiables para la valoración del estado oxidativo en esta población dado el alto número de pacientes con valores por encima del grupo control y el alto grado de correlación que mostraba con el resto de moléculas oxidadas.

9. Todas las moléculas oxidadas mostraron un patrón similar entre los tres grupos, a excepción de los F2- Isoprostanos que estaban más elevados en el grupo HD.

## ***10.- Bibliografía***



<sup>1</sup> De Francisco AL. Revisiones SEN. Academia de Nefrología. La

<sup>2</sup>K/DOQUI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:S1-266

<sup>3</sup> Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rosser J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; 67(6): 2089-2100

<sup>4</sup> Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AC, KU Eckardt, ME Nahas, BL Jaber, M Jadoul, A Levin, NR Powe, J Rossert, DC Wheeler, N Lameire and G Eknoyan. Chronic Kidney Disease as a global public health problem: approaches and initiatives- a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 2007; 72: 247-259

<sup>5</sup> C. Canal, R Pellicer, C.I.Rocha, F. Calero, S. García, R. Montañés, J. Ballarín y J. Bover. Tablas para la estimación del filtrado glomerular a partir de la creatinina plasmática. *Nefrología* 2008; 28(3):317-324

<sup>6</sup> 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(4):247-54.

<sup>7</sup> Gracia S, Montañés R, Bover J, Cases A, Deulofeu R, Martín de Francisco AL, Orte LM; Recommendations for the use of equations to

estimate glomerular filtration rate in adults. *Nefrología* 2006; 26(6): 658-65

<sup>8</sup> Sarnak MJ, Levey AS, Shoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW; American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; 108(17): 2154-69.

<sup>9</sup> Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ. National Heart, Lung and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Educational Program Committee: The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 report. *JAMA* 2003;289(19): 2560-72.

<sup>10</sup> Simal F, Martín Escudero JC, Bellido J y cols.: Prevalence of mild to moderate chronic kidney disease in the general population of Spain. Horteaga study. *Nefrología* 2004; 24:329-32, 334, 336-7

<sup>11</sup> Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: Results of the EPIRCE study. *Nefrología* 2010; 30(1): 78-86

<sup>12</sup> Coresh J, AstotBC, Greene T, Eknoyan G, LeveyAS: Prevalence of chronic kidney disease and decrease kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 41: 1-12

<sup>13</sup> Registros de Enfermos Renales. Informe de diálisis y trasplante 2007. Grupo de Registros de Enfermos Renales. [www.senefro.org](http://www.senefro.org)

<sup>14</sup> Rafael Pérez-García, Alejandro Martín-Malo, Joan Fort, Xavier Cuevas on behalf of all investigators from ANSWER study. Baseline characteristics of an incident haemodialysis population in Spain: results from ANSWER- a multicentric, prospective, observational cohort study. *Nephrol Dial Trasplant* 2009; 24:578-588

<sup>15</sup> Ronco C, Ghezzi PM. Principios biofísicos de la diálisis. En: Jofré R, López Gómez JM, Luño J, En: Pérez García R, Rodríguez Benitez P, editores. Tratado de Hemodiálisis, Ed Médica Jims SL, 2006: 55-97

<sup>16</sup> De Francisco ALM, Perez-García R. Ultrapure dialysate and its effect on patient outcome. *Saudi J Kidney Dis Trasplant* 2001;12 (3): 406-412

<sup>17</sup> Bergström J, Heimbürger O, Lindholm B, Quershi AR. C Reactive Protein as predictor for serum albumin and mortality in hemodialysis. *Gen Am Soc Nephrol* 1995; 6: 573

<sup>18</sup> Perez-García R, Rodríguez P, Gonzalez-Parra E. Tratamiento del agua para hemodiálisis. Características del líquido de diálisis. En Pérez García R, Rodríguez Benitez P, editores. Tratado de Hemodiálisis, Ed Médica Jims SL, 2006: 135-155



<sup>19</sup> Colton CK, Ward RA, Shaldon S: Scientific basis for assessment of biocompatibility in extracorporeal blood treatment. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9(suppl 2): 11.17

<sup>20</sup> Martín-Malo A, Velasco F, Rojas R, Castillo D, Rodriguez M, Torres A, Aljama P. Biocompatibility of dialysis membranes: a comparative study. *Nephrol Dial Trasplan.* 1991 6(suppl 2) 55-58

<sup>21</sup> Dinarello DA. Citokines: agents provocateurs in hemodialysis?. *Kidney Int* 1992;41: 683-694

<sup>22</sup> Grooteman MP, Nube MJ, van Lmbeek J et al. Biocompatibility and performance of a modified cellulosic and synthetic high flux dialyzer. A randomized crossover comparison between cellulose triacetate and polisulphon. *ASAIO J* 1995; 41:215-220

<sup>23</sup> Kandus A, Ponikvar R, Drinovec J, Kladnik S, Ivanovich P: Anaphylotoxins C3a and C5a adsorption on acrylonitrile membrane of hollow fiber and plate dialyzer-an in vivo study. *In J Artif Organs*; 1990; 13: 176-180

<sup>24</sup> Richardson D, Lindley Ej, et al. A randomized study of the consequences of the hemodialysis membrane composition on eritropoietic response. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(3): 551-60

<sup>25</sup> Schaefer RM, Heidland A et al. Effect od dialyzer geometry in granulocyte and complement activation. *Am J Nephrol* 1987; 7: 121-126

<sup>26</sup> Rodriguez-Benot A, Santamaría R, Martín-MaloA, Aljama P. Sterilization procedures and biocompatibility. *Contrib Nephrol* 2002; 137:138-45

<sup>27</sup> Ramirez R, Carrascero J, Martín-Malo A, Rodriguez M, Aljama P. Dialysate purity: a must. *Contrib Nephrol*; 2002; 137: 325-31

<sup>28</sup> Gotloib L, Shostak A, Wjsbrot V. Aspectos funcionales del peritoneo como membrana de diálisis vistos a través de la microscopía electrónica. En: Montenegro J, Olivares J, editores. La diálisis peritoneal. Madrid: DIBE SL; 1999: 27-56

<sup>29</sup> Macia M. Concepto de diálisis peritoneal, fisiología y anatomía. En Coronel F editor. Manual práctico de diálisis peritoneal. Badalona: Atrium SL; 2005: 27-32

<sup>30</sup> Teixidó J, Borrás M, Martínez JC. Fundamentos teóricos de la diálisis peritoneal. En: Montenegro J, Olivares J., editores. La diálisis peritoneal. Madrid: DIBE SL: 1999; 57-115

<sup>31</sup> Coles GA, Williams JD. The management of ultrafiltration failure in peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1994; 48: S14-17

<sup>32</sup> Dombros N, Dratwa M, Feriani M, Gokal R, Heimbürger O, Krediet R, Plum J et al. EBPG Expert Group on Peritoneal Dialysis. European best practice guidelines for peritoneal dialysis. 5 Peritoneal dialysis solutions. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20 (Supl 9): 16-20

<sup>33</sup> Otero A. Esclerosis peritoneal encapsulante. En Coronel F, editor. Manual práctico de diálisis peritoneal. Badalona: Atrium SL; 2005: 173-183

<sup>34</sup> Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ; Clinical epidemiology of cardiovascular disease in Chronic Kidney Disease. *Am J Kid Dis* 1998; 32 (S3), 112-119

<sup>35</sup> A Antolín, A. Miguel, J. Perez, C Gómez, O Zurriaga, M<sup>a</sup> J Blasco y R García. Análisis de la supervivencia en diálisis: hemodiálisis vs diálisis peritoneal y la importancia de la comorbilidad. *Nefrología* 2002; 22 (3);253-261

<sup>36</sup> Ishimura E, Shoji T, Emoto M, Motoyama K, Shinohara K, Matsumoto N, Taniwaki H et al. Renal insufficiency accelerates atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (Suppl 1): S 186-S190.

<sup>37</sup> Buzello M, Torning J, Faulhaber J et al. The apolipoprotein E knockout mouse: A model documenting accelerated atherogenesis in uremia. *J Am soc Nephrol* 2003; 14: 311-316

<sup>38</sup> Manjunath G, Tighiouart H, Ibrahim H et al. Level of kidney function as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular outcomes in the community. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 47-55

<sup>39</sup> Shlipak MG, Smith GL, Rathore SS et al. Renal function , digoxin therapy, and heart failure outcomes: outcomes from the digoxin intervention gorup trial. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2195-2203,

<sup>40</sup> Go AS, Chertow GM, Fan D et al. Chronic kidney disease and the risk of death, cardiovascular events and hospitalizaion. *N Eng J Med* 2004; 23: 1296-1305

<sup>41</sup> Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease.*J Am Soc Nephrol* 1998; 9: S16-S23

<sup>43</sup> Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* 2003; 42:1050-1065

<sup>44</sup> Sarnak MJ, Coronado BE, Greene T et al. Cardiovascular risk factors in chronic renal insufficiency. *Clin Nephrol* 2002; 57: 327-35

<sup>45</sup> Culleton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC et al. Cardiovascular disease and mortality in a community based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int* 1999; 56: 2214-9

<sup>46</sup> Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP et al. Cardiovascular disease risk status in elderly persons with renal insufficiency. *Kidney Int* 2002; 62:997-1004

<sup>47</sup> Chade AR, Lerman A, Lerman LO. Kidney in early atherosclerosis. *Hypertension* 2005; 45: 1042-1049

<sup>48</sup> Coresh J, Weil GL, McQuillan G, Bracanti FL, Levey AS, Jones C, Klag MJ. Prevalence of High Blood Pressure and elevated serum creatinine level in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994) *Arch Intern Med* 2001; 161:1207-1216

<sup>49</sup> Marín R, Fernandez Vega F, Gorostidi M, Ruilope LM, Díez J, Praga M, Herrero P et al. Blood Pressure Control in patients with chronic renal insufficiency in Spain: a cross sectional study. *J Hipertension* 2006; 24: 395-402

<sup>50</sup> Rajagopalan S, Kurz S, Munzen T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-1923

<sup>51</sup> Zhou MS, Jaimes EA, Raij L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidative stress. *Hypertension* 2004; 44:186-190

<sup>52</sup> Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* 2003; 92:e80-86

<sup>53</sup> Becker BN, Yasuda T, Kondo S, Vaikunth S, Homma T, Harris RC. Mechanical stretch/relaxation stimulates a cellular renin-angiotensin system in cultured rat mesangial cells. *Exp Nephrol* 1998; 6:57-66,

<sup>54</sup> Joki N, Kaname S, Hirakata M, Hori Y, Yamaguchi T, Fulita T, Katoh T, Kurokawa K. Tyrosine-Kinase dependent TGF-beta and extracellular matrix expression by mechanical stretch in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 2000; 23: 91-99

<sup>55</sup> Martinez-Castelao A, de Alvaro F, Górriz JL. Epidemiology of diabetic nephropathy in Spain. *Kidney Int* 2005; 99: S20-S24

<sup>56</sup> Yusuf S, Hawken S, Ounpuu, S et al. Effects of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study". *Lancet* 2004; 362: 937-52

<sup>57</sup> Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G et al. Metaanalysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 141: 421-31

<sup>58</sup> Lee SH, Bae JS, Park SH, Lee BH et al. Expression of TGF- $\beta$  induced matrix protein betaig h-3 is up regulated in the diabetic rat kidney an human proximal tubular epithelial cells treated with high glucose. *Kidney Int* 2003; 64-1012-1021

<sup>59</sup> Scout RW. Diabetes and atherosclerosis. *Biomed Pharmacother* 1993; 47:1-2

<sup>60</sup> Knott HM, Brown BE, Davies MJ, Dean RT. Glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low molecular mass aldehydes. Formation of modified and oxidized particles. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3572-82

<sup>61</sup> Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Tkebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 1999; 142: 67-77

<sup>62</sup> Lyons TJ. Glycation and Oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1993; 71: 26B-31B

<sup>63</sup> Ishimura E, Shoji T, Emoto M, Motoyama K, Shinohara K et al. Renal Insufficiency accelerates atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: S186-S190

<sup>64</sup> Crook ED, Thallapureddy A, Migdal S, Flack JM, Green EL, Salahudeen A et al. Lipid abnormalities and renal disease: is

dislipidemia a predictor of progression of renal disease? *Am J Med Sci* 2003; 325:340-348

<sup>65</sup> Sahadevan M, Kasiske B. Hyperlipidemia in kidney disease: causes and consequences. *Curr Opin Nephrol* 2002; 11: 323-9

<sup>66</sup> Saki A, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase release from BCF-1 beta adipocytes. Effects of triglyceride rich lipoproteins and lipolysis products. *J Biol Chem* 1992; 267: 15198-204

<sup>67</sup> Lambert G, Sakai N, Abisman, Neufeld EB, Marteyn B, Chan CC et al . Analysis of glomerulosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase deficient mice. *J Biol Chem* 2001; 276: 15090-8

<sup>68</sup> Abrass CK, Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. *Am J Nephrol* 2004; 24: 46-53

<sup>69</sup> Magil AB. Interstitial foam cells and oxidized lipoprotein in human glomerular disease. *Mod Pathol* 1999; 12: 33-40

<sup>70</sup> Keane WF, O'Donnell MP, Kasiske BL, Kim Y. Oxidative modification of low density lipoproteins by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 187-94

<sup>71</sup> Atchley DJ, Lopes Virilla MF, Zheng D, Kenny D, Virilla G. Oxidized LDL antioxidantized LDL complexes and diabetic nephropathy. *Diabetología* 2002; 45: 1562-71

<sup>72</sup> Chade AR, Rodríguez-Porcel AM, Grande JP, Krier JD, et al. Distinct renal injury in early atherosclerosis and renovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 1165-71

<sup>73</sup>Chade AR, Best PJ, Rodríguez-Porcel AM, Hermann J et al. Endothelin-1 receptor blockade prevents renal injury in experimental hypercholesterolemia. *Kidney Int* 2003; 64: 962-9

<sup>74</sup>Bentley MD, Rodríguez-Porcel M, Lerman A, Saratov MH et al. Enhanced renal cortical vascularization in experimental hipercholesterolemia. *Kidney Int* 2002; 61: 1056-63

<sup>75</sup>Chade AR, Bentley MD, Zhu X, Rodríguez-Porcel M et al. Antioxidant intervention prevents renal neovascularization in hipercholesterolemia pigs. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1816-25

<sup>76</sup>Keane WF, Kasiske BL, O' Donnell MP. Hyperlipidemia and the progression of renal disease. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 157-60

<sup>77</sup>Muntner P, Coresh J, Smith JC, Eckfeldt J, Klag MJ et al. Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction. The atherosclerosis risk in communities study. *Kidney Int* 2000; 58:293-301

<sup>78</sup>Hunsicker LG, Adler S, Caggiula A, England BK, Greene T, Kusek JW et al. Predictors of the progression of renal disease Study. *Kidney Int* 1997; 51: 1908-19

<sup>79</sup>Manttari M, Tiula E, Alikoski T, Manninen V. Effects of hypertension and dyslipidemia on the decline in renal function. *Hypertension* 1995; 26: 670-5

<sup>80</sup>Strippoli G, Navaneethan Sankar D, Jonson David W, Perkovic V, Pellegrini Fabio, Nicolucci A, Craig C. *BMJ* 2008; 336:645-651

<sup>81</sup>Praga M. Obesity-a neglected culprit in renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1157-9



<sup>82</sup> Henegar JR, Bigler SA, Henegar LK, Tyagi SC, Hall JE. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1211-7

<sup>83</sup> De Jong PE, verhave JC, Pinto-Sietsma SJ, Hillege HL. Obesity and target organ damage: the kidney. *Int Obes Relat metab Disord* 2002; 26(4); S:21-4

<sup>84</sup> Hall JE, henegar JR, Dwyer TM, Liu J, da Silva AA, Kuo JJ et al. Is obesity a major cause of chronic kidney disease? *Adv renal replan Ther* 2004;11:41-54

<sup>85</sup> Iseki K, Ikemiya Y, Finjo K, Inoue T, Iseki C, Takishita S. Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease ina screened cohort. *Kidney Int* 2004; 65:1870-8

<sup>86</sup> Eckel RH, Barouch WW, Ershow Ag. Report of the nacional Herat, Lung and blood Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease Working group on the pathophysiology of obesity associated cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 105: 2923-8

<sup>87</sup> Stengel B, tarver-Carr ME, Power NR, Eberhardt MS, Brancati FL. Lifestyle factors, obesity and the risk of chronic kideny disease. *Epidemiology* 2003; 14:479-87

<sup>88</sup> Brown WW, Peters RM, Ohmit SE, Keane WF et al. Early detection of kidney disease in community settings: The kidney Early Evaluation program (KEEP). *Am J Kidney Dis* 2003; 42:22-35

<sup>89</sup> Hall JE, Brands MW, Henegar JR. Mechanisms of hipertensión and kidney disease in obesity. *Ann NY Acad Sci* 1999; 892: 92-107

<sup>90</sup> Schelling JR, Sedorf JR. The metabolic syndrome as a risk factor for chronic kidney disease: more than a chance? *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2773-4

<sup>91</sup> Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW et al. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. *Ann Intern med* 2004;140:167-74

<sup>92</sup> El-Atat FA, Stas SN, McFarlane SI, Sowers JR. The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2816-27

<sup>93</sup> Costa LA, Canana LH, Lisboa HR, Tres GS, Gross JL. Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004; 21:252-5

<sup>94</sup> Wise BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2792-800

<sup>95</sup> Foley RN, Herzog CA, Collins AJ. Smoking and Cardiovascular outcomes in dialysis patients: the United States Renal Data System Wave 2 study. *Kidney Int* 2003; 63:1462-7

<sup>96</sup> Kasiske BL, Klinger D. Cigarette smoking in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*; 2000; 11: 753-9

<sup>97</sup> Orth SR, Stockmann A, Conrado C et al. Smoking as a risk factor for end stage renal failure in men with primary renal disease. *Kidney Int* 1998; 54:926-31

<sup>98</sup> Muntner P, He J, Astor B, Folsom A, Coresh J. Traditional and non-traditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 529-38

<sup>99</sup> Ritz E, Benck U, Franek E, Keller C et al. Effects of smoking on renal hemodynamics in healthy volunteers and in patients with glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 9:1798-804

<sup>100</sup> Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA et al. Association of Kidney function with anemia: The third Nacional Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Inter Med* 2002; 162: 1401-8

<sup>101</sup> Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD et al. Clinical and echocardiographic diseases in patients starting end stage renal disease therapy. *Kidney Int* 1995; 47: 186-92

<sup>102</sup> Levin A, Thompson CR, Esther J et al. Left Ventricular mass index increased in early renal disease: impact of decline in haemoglobin. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 125-34,

<sup>103</sup> Eckardt KU, Mac Dougall I, Locatelli F et al. Effects of epoietin, on left ventricular mass in patients with chronic kidney disease ochocardiographic results from yhe CREATE study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 16:36

<sup>104</sup> Kovesdy CP, Trivedi BK, Kalantar-Zadeh K, Anderson JE. Association of anemia with outcomes in men with moderate and severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006; 69: 560-4

<sup>105</sup> Epoetin alfa and darbepoetin alfa: effects on ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *J Nephrol* 2008; 21(4): 543-9

<sup>106</sup> Malyszko J, Malyszko JS, Hryszko T, Pawlak K et al. Is hepcidin a link between anemia, inflammation and liver function in hemodialyzed patients? *Am J Nephrol* 2005; 25: 586-90

<sup>107</sup> Kwack C, Balakrishnan VS. Managing erythropoietin hyporesponsiveness. *Semin Dial* 2006; 19: 146-51

<sup>108</sup> Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofstun N, Lowrie EG and cjerrow GM. Mineral Metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (8); 2208-2218

<sup>109</sup> Marco MP, Craver L, Betriu A, Belart M, Fibla J, fernandez F. Higher impact of mineral metabolism on cardiovascular mortality in European hemodialysis population. *Kidney Int Suppl* 2003, (85): S: 111-4

<sup>110</sup> Ketsenbaum B, Sampson JN, Rudser KD et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 520-528

<sup>111</sup> Amman K, Törning J, Kugel B, Gross ML, Tyralla K et al. Hyperphosphatemia aggravates cardiac fibrosis and microvascular disease in experimental uremia. *Kidney Int* 63 (2003), 1296

<sup>112</sup> Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* 2003 Sep; 14 (9 Suppl 4): S300-4

<sup>113</sup>Block G y cols .*J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (474 A). (Abstract y póster)

<sup>114</sup> Haydar AA, Covic A, Colhoun H, Rubens M, Goldsmith DJ. Coronary artery calcification and aortic pulse wave velocity in chronic kidney disease patients. *Kidney Int* 65(5): 1790-1974; 2004

<sup>115</sup> Block GA, Spiegel DM, Ehrlich J, Mehta R, Lindberg J, Dreisbach A, Raggi P. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int* 2005, 68(4): 1815-24

<sup>116</sup> Amman K, Wolf B, Nichols C, Torning J, Scharz U, Zeier M, Mall G et al. Aortic changes in experimental renal failure: Hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? *Hypertension* 29: 770-75; 1997

<sup>117</sup> Moe SM, Duan D, Doehle BP y cols. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfgal in human blood vessels. *Kidney Int* 2003; 63: 1003-1011

<sup>118</sup> Moe SM, Duan D, O'Neill et al. media artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002; 61: 638-647

<sup>119</sup> Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni m, slatopolsky E. Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 429-436

<sup>120</sup>Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms.*J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2959-2964

<sup>121</sup>Shanahan CM. Vascular calcification. *Current Opin nephrol Hypertens* 2005; 14: 361-367

<sup>122</sup> Goodman WG, London G, Amann K y cols. Vascular calcification in chronic kidney disease. *AM J Kidney Dis* 2004; 43: 572-579

<sup>123</sup> Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal síndrome: refining the definition of a complex simbiosis gone wrong. *Intensive Care Med* 2008 , 34: 957-962.

<sup>124</sup>Foley RN et al. Chronic kidney disease and the risk of cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:489-495

<sup>125</sup> Ohtake T et al. High prevalence of occult coronary artery stenosis in patients with chronic kidney disease at the initiation of renal replacement therapy: An angiographic examination. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1141-1148

<sup>126</sup> Harnett JD et al. Congestive Heart Failure in dialysis patients: Prevalence, incidence, prognosis and risk factors. *Kidney Int* 1995; 47: 884-890.

<sup>127</sup> Rea ME, Dunlap ME. Renal hemodynamics in the heart failure: implications for treatments. *Curr Opin Nephrol Hyperten* 2008; 17: 87-92

<sup>128</sup>Struthers AD , McDonald Tm. Review of alosterone and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc. Res*, 2004; 61: 663-670

<sup>129</sup> Onozato ML et al. Dual blockade of aldosterone and angiotensin II additively suppresses TGF-beta and NADPH oxidase in the hypertensive kidney. *Nephrol, Dial Transplant*, 2007; 22: 1314-1322

<sup>130</sup> Bongartz LG, Cramer MJ, Doevendans PA, Joles JA and Braam B. The severe cardiorenal syndrome: "Guyton revisited". *Eur Heart J*. 2005; 26: 11-17

<sup>131</sup> Mann JF, Gerstein HC, Pogue, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcome and the impact of Ramipril. The HOPE randomized trial. *Ann Intern Med*, 2001; 134: 629-636

<sup>132</sup> Landray MJ, Wheeler DC, Lip GY et al. Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 244-253

<sup>133</sup> Merino A, Nogueras S, Buendía P et al. Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. *Contrib Nephrol* 2008; 161: 83-88

<sup>134</sup> Sela S, Shurtz-Swirski R, Cohen-Mazor M et al. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 3184-3191

<sup>135</sup> Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003; 107: 87-92.

<sup>136</sup> Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Stenvinkel P: Associations between circulating

inflammatory markers and residual renal function in ESRD patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 41(3): 1212-8

<sup>137</sup> Frick M, Weidinger F. Endothelial function: A surrogate endpoint in cardiovascular studies? *Curr Pharm Des* 2007; 13: 1741-1750

<sup>138</sup> Tatematsu S, Wakino S, Kanda T, Homma K, Yoshioka K, Hasegawa K, Sugano N, Kimoto M, Saruta T, Hayashi K: Role of nitric oxide-producing and-degrading pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 741-749

<sup>139</sup> Kielstein JT, Zocalli C. Asymmetric dimethylarginine: A cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 186-202

<sup>140</sup> Zocalli C, Mass R, Cutrupi S, Pizzini P, Finocchiaro P, Cambareri, Panuccio V et al. Assymetric dimethylarginine (ADMA) response to inflammation in acute infection. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 801-806

<sup>141</sup> Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2747-2752

<sup>142</sup> De Zeeuw D: Albuminuria: A target for treatment of type 2 diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007; 27: 70-74

<sup>143</sup> Halbesma N, Kuiken D-S, Brastma AH, Baker SJL, Wetzels JFM et al. Macroalbuminuria is a better risk marker than low estimated GFR to identify individual at risk for accelerated GFR loss in population screening. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2582-2590



<sup>144</sup> Stenvinkel P: Endothelial dysfunction and inflammation. Is there a link? *Nephrol Dial Trasplant* 2001; 16: 1968-1971

<sup>145</sup> Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM: Inflammation and microalbuminuria in non-diabetic and type 2 diabetic subjects. The insulin-resistance Atherosclerosis Study. *Kidney Int* 2000; 58: 1703-1710

<sup>146</sup> Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924

<sup>147</sup> Harrison JE, Schultz J: Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1998; 391: 393-397

<sup>148</sup> Heinecke JW: Mass spectrometric quantification of aminoacid oxidation products in protein: Insights into pathways that promote LDL-oxidation in the human artery wall. *FASEB J* 1999; 13: 1113-1120

<sup>149</sup> Bronw DW, Giles WH, Croft JB: White blood cell count: An independent predictor of coronary heart disease mortality among a national cohort. *J Clin Epidemiol* 2001; 54:316-322

<sup>150</sup> Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1- dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 31; 101(35):13032-7

<sup>151</sup> Shao B, Heinecke JW. HDL, lipid peoxidation and atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50: 599-601

<sup>152</sup> Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Brandt JP, Kedebe M, Salama L et al. Oxidative stress and hemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 335-340

<sup>153</sup> Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, Gross J, Levin NW et al. Elevated F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int* 2001; 59: 1960-1966

<sup>154</sup> Holvoet P, Donck J, Landeloos M, Brouwers E et al. Correlation between oxidized LDL and Von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost* 1996; 76: 663-669

<sup>155</sup> Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa et al. Advanced oxidations protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-1313

<sup>156</sup> Satoh M, Yamasaki Y, Nagake Y, Kasahara J, Hashimoto M et al. Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney Int* 2001; 59: 1943-1950

<sup>157</sup> Malle E, Woenckhaus C, Waeg G, Esterbauer H, Grone EF et al. Immunological evidence for hypochlorite-modified proteins in human human kidney. *Am J Pathol* 1997; 150: 603-615

<sup>158</sup> Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachinawa Y, Takebayashi S et al. Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 1999; 142: 67-77

<sup>159</sup> Vanholder R y cols. Review on uremic toxins: classification, concentration , and interindividual variability. *Kidney Int* 2003 (5): 1934-43

<sup>160</sup> Patruta SI, Edlinger R, Sunder-Plassmann G et al. Neutrophil impairment associated with iron therapy in hemodialysis patients with functional iron deficiency. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 655-663

<sup>161</sup> Paik-Seong Lim, Yau-Huei Wei, York Leng Yu, Benny Kho. Enhance oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Trasplant* 1999; 14: 2680-2687

<sup>162</sup>Sies H. Oxidative Stress: introduction. In *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*, .ed. Sies H. pp xv-xviii. Academic Press.London. 1991

<sup>163</sup>FridovichI. Oxigen: Boon and Bane. *American Scientist* 1975; 63:54-59

<sup>164</sup>Fridovich I.The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 1978; 201: 875-880

<sup>165</sup>Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology.*Acta Physiol Scand Suppl* 1980; 492: 153-168

<sup>166</sup> Margulis L. Evolución y Células. En: *El origen de la célula*. Ed. Reverté, SA 1986.1-18

<sup>167</sup> Margulis L. La vida con oxígeno. En: *El origen de la célula*. Ed. Reverté, SA 1986. 50-67

<sup>168</sup>Fridovich I. Hipoxia and oxygen toxicity.*Adv Neurol* 1979; 26:255-259

<sup>169</sup>Green MJ and Hill AO. Chemistry of dioxygen. *Methods Enzymol* 1984; 105: 3-22.

<sup>170</sup>Bast A, Haenen GRMM and Doelman CJA. Oxidants and Antioxidant: State of the art. In: *Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents*. Ed Crystal R Grand Bast A. *Am J Med* 1991; 91: 2S-13S.

<sup>171</sup>Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. In: *Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents*. Ed Crystal R Grand Bast A. *Am J Med* 91: 14S-22S, 1991.

<sup>172</sup>Barquinero J. Radicales Libres: los enemigos más diminutos. En GSH System. Glutación: Eje de la defensa antioxidante. Ed Crystal RG y Ramón JR. Excerpta Medica (Amsterdam) 9-15, 1991

<sup>173</sup>Halliwell B, Gutteridge JMC and Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620

<sup>174</sup>Marquina EP. Teoría de orbitales y oxígeno molecular: estructura electrónica del átomo de oxígeno y de las moléculas de oxígeno diatómicas. En *Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina, importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados*. Sáez Tormo G y Puig Parellada P. Ed: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados (Valencia) 2000; 9-24

<sup>175</sup>Siggara-Andersen O, Ulrich A and Gothen IH. Classes of tissues hypoxia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39: 137-142

<sup>176</sup>Antonini E, Brunoni M, Greenwood C and Malmström BG. Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. *Nature* 1970; 228: 936-937,

<sup>177</sup>Mc Cord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 1983; 94: 412-414

<sup>178</sup>Boveris A, Arnaiz SL, Alvarez S, Costa LE and Valdez L. The mitochondrial production of free radicals. In: Free radicals in chemistry, Biology and Medicine. Ed: Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y and Naito Y 2000; 256-261

<sup>179</sup>Boveris A and Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134: 707-716.

<sup>180</sup>Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-344

<sup>181</sup>Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412-426

<sup>182</sup>Pearlstein DP, Ali MH, Mungai PT, Hynes KL, Gewertz BL and Schumacker PT. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 566-573.

<sup>183</sup>Haber F and Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Natl Soc Lond Ser A* 1934; 147: 332-351,

<sup>184</sup>Halliwell B, Richmond R, Wong SF and Gutteridge JMC. The biological significance of the Haber-Weiss reaction. In:

*Developments in Biochemistry. Vol. 11B: Biological and Clinical Aspects Of Superoxide and Superoxide Dismutase.* Ed: Bannister, WH and Bannister JV. New York: Elsevier North Holland, Inc 1980:32-40.

<sup>185</sup>Mc Cord JM and Day D Jr. Superoxide dependent production of hydroxyl radical catalysed by iron EDTA complex. *FEBS Lett* 1978; 86:139-142

<sup>186</sup>Gutteridge JMC and Wilkins S. Copper salt-dependent hydroxyl radical formation damage to proteins acting as antioxidants. *Biochim Biophys Acta* 1983; 759:38-41

<sup>187</sup>Halliwell B and Gutteridge MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* .1984; 219: 1-14,

<sup>188</sup>Nappi AJ and Vass E. Interactions of iron with reactive intermediates of oxygen and nitrogen. *Dev Neurosci* 2000; 24: 134-142,

<sup>189</sup>Rowley DA and Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of thiol compounds. *FEBS Lett* 1982; 138: 33-36

<sup>190</sup>Koppenol WH. The basic chemistry of of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 385-391

<sup>191</sup>Keller GA, Warner TG, Steimer KS and Hallewell RA. Cu, Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblast and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1991; USA88:7381-7385

<sup>192</sup>Khuel FA and Egan RW. Prostaglandins, araquidonic acid and inflammation. *Science* 1980; 210: 978-984

<sup>193</sup>Deby C and Deby-Dupont G. Oxygen species in prostaglandin biosynthesis in vitro and in vivo. In: *Developments in Biochemistry. Vol. 11B: Biological and Clinical Aspects of Superoxide and superoxide dismutase*. Ed Bannister WH and Banister JV. Elsevier North Holland, Inc(New York) 1980; 84-97

<sup>194</sup>Rowe GT, MansonNH, Caplan M and Hess ML. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leucocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cyclooxygenase pathway. *Circ Res* 1983; 53: 584-591

<sup>195</sup>Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML and Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 59; 1986: 612-619.

<sup>196</sup>Mc Cord JM and Fridovich I. The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968; 243:5753-5760.

<sup>197</sup>Porras AG, Olson JS and Palmer G. The reaction of reduced xanthine oxidase with oxygen. *J Biol Chem* 1981; 256:9096-9103

<sup>198</sup>Fridovich I. Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23:239-257

<sup>199</sup>Jewett SL, Eddy LJ and Hochstein P. Is the catecholamines involved in ischemia reperfusion injury? *Free Radic Biol Med* 1989; 6:185-188

<sup>200</sup>Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Eng J Med* 1989; 320: 365-376

<sup>201</sup>Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS and Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 1995; 9:200-209

<sup>202</sup>Barbior BM, Kipnes RS and Curnutte JT. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973; 52:741-744

<sup>203</sup>Babior BM. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. (Second of two parts). *New Engl J Med* 1978; 298:721-725

<sup>204</sup>Babior BM. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. (First of two parts). *New Engl J Med* 1978; 298:659-668

<sup>205</sup>Barbior BM and Peters WA. The O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-producing enzyme of human neutrophils: further properties. *J Biol Chem* 1981; 256:2321-2323

<sup>206</sup>Rossi F. The superoxide forming NADPH oxidase of phagocytes: nature, mechanism of activation and function. *Biochim Biophys Acta* 1986; 853: 65-69

<sup>207</sup>Riesz P and Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Rad Biol Med* 1992; 13:247-270

<sup>208</sup>Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu rev Physiol* 1986; 48: 657-667

<sup>209</sup>Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-162



<sup>210</sup>Granger DN, Grishman MB and Kvietys PR. Mechanisms of microvascular injury. In *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3 th ed. Ed: Leonard RJ. Raven Press. (New York) 1994; 1693-1722

<sup>211</sup>Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828

<sup>212</sup>Nelson SK, Bose SK and Mc Cord JM. The toxicity of high dose superoxide dismutase suggest that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free Rad Biol Med* 1994; 16: 195-200

<sup>213</sup>Slater TF. Free radicals mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15

<sup>214</sup>Omar BA, Gad NM, Jordan MC, Striplin SP, Russell WJ, Downey JM and MacCord JM. Cardioprotection by Cu-Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:465-471

<sup>215</sup>Ramos CL, Pou S, Britigan BE, Cohen MS and Rosen GM. Spin trapping evidence for mieloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J Biol Chem* 1992;267:8307-8312

<sup>216</sup>Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human diseases processes. *Surgery* 1983; 94:407-411

<sup>217</sup>Cadet J, Rabanat JL, Buchko GW, Yeo HC and Ames BN. Singlet Oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods Enzymol* 1994; 234:79-88

<sup>218</sup>Ullah Khan A and Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;91:12365-12367

<sup>219</sup>Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15

<sup>220</sup>Kellogg EW III and Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 1975; 250:8812-8817

<sup>221</sup> Auchère F and Capellère-Blandin C. Oxidation of Cu,Zn-superoxide dismutase by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system: functional and structural effects. *Free Radic Res* 2001;36: 1185-1198

<sup>222</sup>Van de Berg J and Winterbourn C. Measurement of reaction products from hypochlorous acid and unsaturated lipids. *Methods Enzymol* 1994; 233: 639-649

<sup>223</sup>Southorn FA and Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63:681-389

<sup>224</sup> Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;209: 112-117

<sup>225</sup> Coffey MJ, Phare SM and Peters-Golden M. Interaction between nitric oxide, reactive oxygen intermediates, and peroxynitrite in the regulation of 5-lipoxygenase metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1584: 81-90

<sup>226</sup> McCord JM. Superoxide radical: controversies, contradictions and paradoxes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 112-117

- <sup>227</sup> McCord JM. Superoxide dismutase in aging and disease: An overview. *Methods Enzymol* 2002; 349:331-341
- <sup>228</sup> Li C and Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol* 2002; 282: C227-C241.
- <sup>229</sup> Grune T, Siems WG, Kowalewski J and Esterbauer H. Postischemic accumulation of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in rat small intestine. *Life Sci* 1994; 55: 693-699
- <sup>230</sup> Wolff SP and Dean RT. Fragmentation of proteins by free radical and its effect on their susceptibility to enzymatic hydrolysis. *Biochem J* 1986; 234:399-403
- <sup>231</sup> Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *Biol Chem* 1987; 262:9895-9901
- <sup>232</sup> Stadtman ER and Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991; 266: 2005-2008
- <sup>233</sup> Grune T, Reinheckel T and Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 1997; 11: 526-534
- <sup>234</sup> Abu-Zidan FM, Winterbourn CC, Bonham MJD, Simovic MO, Buss H and Windsor JA. Small Bowel ischaemia-reperfusion increases plasma concentrations of oxidized proteins in rats. *Eur J Surg* 1999; 165:383-389
- <sup>235</sup> Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. In Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic

determinants and therapeutic agents. Ed: Crystal R, Grand Bast A. *Am J Med* 1991; 91: 23S-30S

<sup>236</sup>Wolff SP and dean RT. Glucose oxidation and protein modification. The potential role of “autooxidative glycosilation” in diabetes. *Biochem J* 1987; 245: 243-250

<sup>237</sup>Wiseman H and Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progresión to cáncer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29

<sup>238</sup>Halliwell B and Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracelular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8

<sup>239</sup>Sies H. oxidative Stress: From Basic research to clinic application. In Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents. Ed: Crystal R Grand Bast A. *Am J Med* 1991; 91:31S-38S

<sup>240</sup>Rice-EvansCA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *Free Radc Biol Med* 1993; 15: 77-96

<sup>241</sup>Barquinero J. Los antioxidantes defienden la vida. En GSH System. Glutati3n: Eje de la defensa antioxidante. Ed: Crystal RG y Ramon JR. *Excerpte Medica (Amsterdam)*, 1992, 22-30

<sup>242</sup>Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; 49: 345-361

<sup>243</sup>Antonini E, Brunori M, Grrenwood C and Malmstr3m BG. Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. *Nature* 1970; 228:936-937

<sup>244</sup>Mc Cord and Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055

<sup>245</sup>Hassan MH and Fridovich I. Superoxide dismutases: detoxication of a free radical. In: *Enzymatic basis of detoxication*. Vol I. Academic press Inc. (London) LTD. 1980; 311-332

<sup>246</sup>Weisiger RA and Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase and other : Site of sintesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; 248: 4793-4796

<sup>247</sup>Marklund SL. Extracelular superoxide dismutase. *Methods Enzymol* 2002, 349:74-80

<sup>248</sup>Marklund SL. Extracelular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 1984; 222:649-655

<sup>249</sup>Karlsson K, Sandström J, Edlum T and Marklund SL. Pharmacokinetics of extracellular superoxide dismutase in the vascular system. *Free Rad Biol Med* 1993; 14: 185-190

<sup>250</sup>Tsan MF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 107-113

<sup>251</sup> Klug D, Rabani J and Fridovich I. Electrostatic interactions in the reaction of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* 1982; 257: 11443-11447

<sup>252</sup> Hodgson EK and Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide:

chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry* 1975; 14: 5299-5303

<sup>253</sup> Yim MB, Chock PB and Stadtman ER. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J Biol Chem* 1993; 268: 4099-4105

<sup>254</sup> Yim MB, Chock PB and Stadtman ER. Copper, zinc superoxide dismutase catalyses hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5006-5010

<sup>255</sup> Kono Y and Fridovich I. Superoxide dismutase inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982; 257: 5751-5754

<sup>256</sup> Halliwell B. Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organism: the key role of superoxide dismutase. *Cell Biol Int Rep* 1978; 2: 113-118

<sup>257</sup> Serbinova EA and Packer L. Antioxidant properties of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol. *Methods Enzymol* 1994; 234: 354-366

<sup>258</sup> Schüep W and Rettenmaier R. Analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue: high performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1994; 234: 294-302

<sup>259</sup> Packer JE, Slater TF and Wilson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979; 278: 737-738

<sup>260</sup> Sun Y and Oberley LW. The inhibition of catalase by glutathione. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 595-602

<sup>261</sup> Santus R, Patterson LK, Filipe P, Morlière P, Hug GL, Fernandes A and Mazière JC. Redox reactions of the urate radical/urate couple with the superoxide radical anion, the tryptophan neutral radical and selected flavonoids in neutral in neutral aqueous solutions. *Free Rad Res* 2001; 35:129-136

<sup>262</sup> Beyer RE. The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic Biol Med* 1990; 8:545-565

<sup>263</sup> Kagan VE, Serbinova EA, Stoyanovsky DA, Khwaja S and Packer. Assay of ubiquinones and ubiquinols as antioxidants. *Methods Enzymol* 1994; 234: 343-354

<sup>264</sup> Sagone AL Jr, Greenwald J, Kraut EH, Bianchine J and Singh D. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 97-104

<sup>265</sup> Wolff SP and Dean RT. Glucose oxidation and protein modification. The potential role of “autooxidative glycosilation” in diabetes *Biochem J* 1987; 245: 243-250

<sup>266</sup> Stocker R, Glazer AN and Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 5918-5922

<sup>267</sup> Reif DW and Simmons RD. Nitric Oxide mediates iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283: 537-541

<sup>268</sup> Reiff DW. Ferritin as a source of iron for oxidative damage *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 417-427

<sup>269</sup> Biemond P, Swaak AJG, Beindorff CM and Koster JF. Superoxide-dependent and independent mechanisms of iron

mobilization from ferritin by xantine oxidase. *Bioche J* 1986; 239: 169-173

<sup>270</sup>Allen DR, Wallis GL and Mc Cay PB. Catechol adrenergic agents enhance hydroxyl radical generation in xanthine oxidase systems containing ferritin: implications for ischemia/reperfusion. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315: 235-243

<sup>271</sup>Reilly PM, Schiller HJ and Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991; 161: 488-503

<sup>272</sup>Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scan J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77-89

<sup>273</sup>Muñiz P, Valls V, Perez-Broseta C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR, Saez GT. The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rymycin-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1995;18: 747-755,

<sup>274</sup>Ursini, F., M. Maiorino, et al. "Diversity of glutathion peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38-53.

<sup>275</sup>Espinosa O, Jiménez-Almazan J, Chaves FJ, Tormos MC et al Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hipertensión. *Free Radic Res* 2007; 41: 546-54

<sup>276</sup>Navarro, J., E. Obrador, et al. "Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans." *FreeRadic Biol Med*1997; 22(7): 1203-9.



<sup>277</sup>Higuchi, M and F Yoshida. Lowry determination of protein in the presence of sulphhydryl compounds or other reducing agents. *Anal Biochem* 1977 (77): 542-7

<sup>278</sup> Latorre A, Moya A et al. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(22): 8649-8653

<sup>279</sup> Nebot C, Mouet et al Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclin catachol. *Anal Bioche* 1993; 214(2): 442-51

<sup>280</sup> Fossati P, Prencipe et al. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem* 1980; 26(2): 227-31

<sup>281</sup> Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-69

<sup>282</sup>Massey V and Williams CH Jr. On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem* 1965; 240 (11): 4470-80

<sup>283</sup>Registro español de enfermos renales. Informe 2007. [www.senefro.es](http://www.senefro.es)

<sup>284</sup> Ejido de los Ríos J, Alcazar Arroyo R. Enfermedad renal inducida por ácido úrico. Nefropatía por plomo. En: L Hernando Avendaño. Nefrología Clínica. Ed Médica Panamericana. 2008, 431-438

<sup>285</sup> Fang J, Alderman MH: Serum uric acid and cardiovascular mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study. 1971-1992, National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2000; 283: 2404-2410

<sup>286</sup> Stenvinkel P. New insights on inflammation in chronic kidney disease-genetic and non-genetic factors. *Nephrol Ther* 2006; 2: 111-119

<sup>287</sup> Schreck R, Rieber P, Beauerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247-2252

<sup>288</sup> Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4- hidroxy-nonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad Med* 1991; 11:81-128

<sup>289</sup> Atamer A, Kocyigit Y, Ecder SA, Selek S, Ilhan N, Ecder T, Atamer Y. Effect of oxidative stress on antioxidant enzyme activities, homocysteine and lipoproteins in chronic kidney disease. *J Nephrol* 2008; 21(6): 924-30

<sup>290</sup> De Vecchi A F, Bamonti F, Walter MF, Novembrino C, et al. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. *Nephrol Dial Trasplant* 2009; 24: 2524-2529

<sup>291</sup> Handelman G, Walter MF, Adhikarla R et al. Elevated plasma F2-Isoprostanes in patients on long-term hemodiálisis. *Kidney Int* 2001; 59: 1960-1966

<sup>292</sup> Morrow JD, Frei B, Longmire AW, et al. Increased in circulating products of lipid peroxidation (F2-Isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Eng J Med* 1995; 332:1198-1203

<sup>293</sup> Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI et al. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995; 368:225-229

<sup>294</sup> Cottone S, Mulè G, Guarneri M. Et al. Endothelin-1 and F2-Isoprostane relate to and predict renal dysfunction in hipertensive patients. *Nephrol Dial Trasplant* 2009; 24: 497-503

<sup>295</sup>Donousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis* 2006; 48(5): 752-60

<sup>296</sup> Simmons EM, Langone A, Sezer MT, vella jd, Himmelfarb J. Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. *Transplantation* 2005; 79(8): 914-9

<sup>297</sup> Oberg BP, McMenamin E, Lucas F, McMonagle E. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004; 65:1009-16

<sup>298</sup> Morrow JD, Moore KP, Awad JA, Ravenscraft MD, Marini G et al. Marked overproduction of non-cicloxygenase derived prostanoids (F2-Isoprostanes) in the hepatorenal syndrome. *J Lipid Mediat* 6: 417-420

<sup>299</sup>Witko-sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.*Kidney Int* 1996; 49: 1304-1313.

<sup>300</sup>Descamps-Latscha, Witko-Sarsat.Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure.*Kidney Int* 2001 S78: S108-S113

<sup>301</sup> Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in protein: Insights into pathways that promote

LDL oxidation in the human artery wall. *FASEB J* 1999; 13: 113-1120

<sup>302</sup> Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage by mieloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disease. *J Lab Clin Med* 1999; 133:321-325

<sup>303</sup> Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heninecke JW. Mieloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1994; 94:437-444

<sup>304</sup> Zhang R, Brennan ML, Fu X, Avilés RJ, pearce GL, penn MS, Topol EJ et al. Association between mieloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; 286: 2136-2142

<sup>305</sup> Witko-sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al Advanced Oxidation Protein Products as novel mediators of inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. *J Immunol* 1998; 161:2524-2532

<sup>306</sup> Satoh M, Yamasaki Y, Nagake Y, et al .Oxidative stress is reduced by the long term use of vitamin E coated diálisis filtros. *Kidney Int* 2001; 59: 1943-1950

<sup>307</sup> Lodovi M, Casalini C, Carriaggi R et al. Levels of 8-hydroxy-deoxiguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. *Free radic Biol med* 2000; 28:13-17

<sup>308</sup> Tarng D, Huang T, Wei T et al. 8-Hydroxy-2'- deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of Oxidative Stress in Chronic Hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000;36 (5):934-944

<sup>309</sup>Tarng D, Huang T, Wei T et al. Protective effect of vitamin c on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level in peripheral blood lymphocytes of chronic hemodialysis. *Kidney Int* 2004; 66: 820-831

<sup>310</sup>Tarng DC, Tsai TJ, Chen WT, Wei YH. Effect of OGG1→G gene polymorphism on 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine levels of leucocyte DNA among patients undergoing chronic hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(11): 2338-47

<sup>311</sup> Arizawa T, Kinugasa E, Koshikawa S: Increased risk of malignancy and blood-membrane interactions in uremic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9 (Suppl 2):162-164

<sup>312</sup> Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V et al. Antioxidant activities and Oxidative stress byproducts in Human Hipertension. *Hypertension* 2003;41:1096-1101

<sup>313</sup> Moradi H, Pahl MV, Elahimer R, Vaziri ND. Impaired antioxidant activity of high density lipoprotein in chronic kidney disease. *Transl Res.* 2009; 153(2): 77-85

<sup>314</sup> Boaz M, Matas Z, Biro A, et al. Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int* 1999; 56: 1078-1083

<sup>315</sup> Palleschi, Da Angelis, Diana L et al. Reliability of oxidative stress biomarkers in hemodialysis patients: a comparative study. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45 (9): 1211-1218

<sup>316</sup> Dascher M, Lenhartz H, Botticher D, Schaefer F, Wollschlager M, Mehls O, et al. Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidants levels. *Kidney Int* 1996; 50: 1268-72

<sup>317</sup> Ikizler TA, Morrow JD, Roberts LJ, Evanson JA et al. Plasma F2 Isoprostanes levels are elevated in chronic hemodialysis patients. *Clinical Nephrol* 2002; 58: 190-197

<sup>318</sup> Himmelfarb J, McMonagle E, Mc Menamin. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58:2571-2578

<sup>319</sup> Pupin L, Himmelfarb J, McMonagle E et al. Influence of initiation maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int* 2004; 65:2371-2379

<sup>320</sup> Ward RA, Ouseph R, McLeish RM. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. *Kidney Int* 2003; 63: 353-359

<sup>321</sup> Gonzalez Rico MA, MJ Puchades, R García Ramón, G Sáez, MC Tormos y A Miguel. Efecto del tratamiento con hemodiálisis sobre el estrés oxidativo en pacientes con insuficiencia renal crónica. *Nefrología* 2006; 26: 218-225

<sup>322</sup> Roselaar SE, Nazhat NB, Winyard PG, Jones P, Cunningham J, Blake DR. Detection of oxidants in uremic plasma by electro-spin resonance spectroscopy. *Kidney Int* 1995; 48: 199-206

<sup>323</sup> Drüeke T, Witko-Sarsat V, Massy Z et al- Iron therapy, Advanced Oxidation Protein Products, and carotid artery Intima-media Thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 2002; 106:2212-2217

<sup>324</sup> Takeuchi T, Nakajima M, Morimoto K. Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in neutrophil-like cells. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1543-1548

<sup>325</sup> Henle ES, Luo Y, Gassmann W, Linn S. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions. *J Biol Chem*; 1996; 271: 21177-21186

<sup>326</sup> Ko-Lin Kuo, Szu-Chun Hung, Yau-Huei Wei. Intravenous Iron Exacerbates Oxidative DNA damage in peripheral Blood lymphocytes in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(9): 1817-26

<sup>327</sup> Morena M, Cristol JP, Bosc JY et al. Convective and diffusive losses of vitamine C during haemodiafiltration sesión: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Trasplan* 2002; 17: 422-427

<sup>328</sup> Lim PS, Wei YH, Yu YL et al. Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Trasplant* 1999; 14: 2680-2687

<sup>329</sup> Taylor JE, Scott N, Bridges A, Henderson IS, StewartWK. Lipid peroxidation and antioxidants in continuous ambulatory dialysis patients. *Perit Dial Int* 1992; 12: 252-256

<sup>330</sup> Ignace S, Fouque D, Arkouche W, Steghens JP et al. Preserved residual renal function is associated with lower oxidative stress in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1685-1689

<sup>331</sup> Boulanger E, Moranne O, Wautier MP, et al. Changes in glycation and oxidation markers in patients starting peritoneal dialysis: a pilot study. *Perit Dial Int* 2006; 26:207-212

<sup>332</sup> Agalou S, Ahmed N, Babaei-Jaididi R, et al. Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1471-85

<sup>333</sup> Kocak H, Gumuslu S, Sahin E, et al. Advanced oxidative protein products are independently associated with endothelial function in peritoneal dialysis patients. *Nephrology* 2009, 14: 273-280

<sup>334</sup> Der-Cherng Tarng, Tzen Wen Chen, Tung-Po Huang et al. Increased Oxidative Damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1321-1330

<sup>335</sup> Ha H, Lee HB: Effect of high glucose on peritoneal mesothelial cell biology. *Perit Dial Int* 2000; 20 (suppl 2):S15-S18

<sup>336</sup> Gautam N, Mashapatra D, Chakraborty Sp. Age associated oxidative damage in lymphocytes. *Oxid Med cell Longev* 2010; 3(4): 275-282





## **Anexos**



## **ANEXO 1: MATERIAL DE LABORATORIO UTILIZADO PARA LA MEDICIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO**

- Centrifugas: para las centrifugaciones a baja velocidad se ha utilizado una centrifuga refrigerada de la marca Eppendorf modelo 5702R. Las centrifugaciones a alta velocidad se han realizado en una ultracentrífuga refrigerada de la firma Jouan modelo MR1812.
- Espectrofotómetro: Ultrospec 3000pro de Amersham Biosciences.
- pHmetro: el pHmetro empleado es de la marca CRISON , modelo Microph , con un electrodo incorporado INGLOD.
- Baño termostatzado: con agitación automática regulable, marca Clifton, modelo Níkel electro LTD.
- Fluorímetro: SPECTRA MAX GEMINI XS.
- Balanzas: se han utilizado 2 tipos de balanzas, una de precisión GR-120 A&D (Instruments LTD) y una METTLER modelo PJ400.
- Agitador magnético: modelo ARE (VELT Scientifica).
- Sistema de depuración de agua: marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.
- Cromatógrafo líquido de alta eficacia: HPLC modelo 515 de Waters, Spherisorb columnas ODS de Waters, detectores electroquímico y ultravioleta (UV), electrodos coulométrico y amperométrico.

## ANEXO 2.- COMPARACIONES MÚLTIPLES

Tabla 12.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: Ácido Úrico

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	-0.3998	-0.957
	HD	0.609	-2.482	0.596
	DP	0.012	-3.367	-0.277
Pre-D	CONTROL	0.000	0.957	3.998
	HD	0.001	0.521	2.548
	DP	0.525	-0.369	1.680
HD	CONTROL	0.609	-0.596	2.482
	Pre-D	0.001	-2.548	-0.521
	DP	0.028	-1.686	-0.072
DP	CONTROL	0.012	0.277	3.367
	Pre-D	0.525	-1.680	0.369
	HD	0.028	0.072	1.686

Tabla 13.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: Homocisteína

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.064	-54.121	1.7913
	HD	0.000	-32.829	-10.738
	DP	0.001	-18.8175	-4.094
Pre-D	CONTROL	0.064	-1.791	54.121
	HD	0.953	-23.216	31.978
	DP	0.341	-13.031	42.449
HD	CONTROL	0.000	10.738	32.829
	Pre-D	0.953	-31.978	23.216
	DP	0.103	-1.453	22.108
DP	CONTROL	0.001	4.094	18.817
	Pre-D	0.341	-42.449	13.031
	HD	0.103	-22.109	1.453

**Tabla 14.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: HDL-colesterol**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	1.0	-21.57	28.34
	HD	1.0	-29.35	21.31
	DP	1.0	-21.23	29.88
Pre-D	CONTROL	1.0	-28.34	21.57
	HD	1.0	-23.97	9.16
	DP	1.0	-15.97	17.86
HD	CONTROL	1.0	-21.31	29.35
	Pre-D	1.0	-9.16	23.97
	DP	1.0	-9.12	25.81
DP	CONTROL	1.0	-29.88	21.23
	Pre-D	1.0	-17.86	15.97
	HD	1.0	-25.81	9.12

**Tabla 15.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: LDL-colesterol**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.355	-9.62	45.13
	HD	0.011	6.52	55.84
	DP	0.879	-17.12	35.49
Pre-D	CONTROL	0.355	-45.13	9.62
	HD	0.422	-7.81	34.66
	DP	0.904	-32.37	15.23
HD	CONTROL	0.011	-55.84	-6.52
	Pre-D	0.422	-34.66	7.81
	DP	0.019	-41.46	-2.53
DP	CONTROL	0.879	-35.49	17.12
	Pre-D	0.904	-15.23	32.37
	HD	0.019	2.53	41.46

**Tabla 16.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: Triglicéridos**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.418	-95.73	25.43
	HD	0.903	-78.36	41.68
	DP	0.028	-211.52	-8.67
Pre-D	CONTROL	0.418	-25.43	95.73
	HD	0.737	-18.88	52.50
	DP	0.176	-169.14	19.25
HD	CONTROL	0.903	-41.68	78.36
	Pre-D	0.737	-52.50	18.88
	DP	0.057	-185.34	1.82
DP	CONTROL	0.028	8.67	211.52
	Pre-D	0.176	-19.25	169.14
	HD	0.057	-1.82	185.34

**Tabla 17.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: PCR as**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.023	-15.55	-0.836
	HD	0.017	-9.47	-0.668
	DP	0.148	-6.044	0.572
Pre-D	CONTROL	0.023	0.836	15.55
	HD	0.864	-4.96	11.21
	DP	0.275	-2.18	13.09
HD	CONTROL	0.017	0.69	9.47
	Pre-D	0.864	-11.21	-4.96
	DP	0.717	-2.56	7.22
DP	CONTROL	0.148	-0.572	6.044
	Pre-D	0.275	-13.09	2.18
	HD	0.717	-7.22	2.56

**Tabla 18.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: Fibrinógeno**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	1.0	-17.64	15.06
	HD	1.0	-20.96	9.57
	DP	1.0	-16.64	14.03
Pre-D	CONTROL	1.0	-15.06	17.64
	HD	1.0	-16.41	7.59
	DP	1.0	-12.11	12.07
HD	CONTROL	1.0	-9.57	20.96
	Pre-D	1.0	-7.59	16.41
	DP	1.0	-6.19	14.97
DP	CONTROL	1.0	-14.03	16.65
	Pre-D	1.0	-12.07	12.11
	HD	1.0	-14.97	6.19

**Tabla 19.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: MDA**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	-0.722	-0.408
	HD	0.000	-0.516	-0.369
	DP	0.000	-0.459	-0.275
Pre-D	CONTROL	0.000	0.4075	0.722
	HD	0.184	-0.037	0.281
	DP	0.014	0.031	0.365
HD	CONTROL	0.000	0.369	0.516
	Pre-D	0.184	-0.281	0.037
	DP	0.165	0.019	0.171
DP	CONTROL	0.000	0.275	0.459
	Pre-D	0.014	-0.365	-0.031
	HD	0.165	-0.171	0.019



**Tabla 20.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: F2-Isoprostanos**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	-696.84	-404.64
	HD	0.000	-1124.85	-686.57
	DP	0.000	-716.22	-488.05
Pre-D	CONTROL	0.000	404.63	696.84
	HD	0.001	-575.32	-134.63
	DP	0.636	-167.14	64.35
HD	CONTROL	0.000	686.57	1124.85
	Pre-D	0.001	134.63	575.32
	DP	0.002	101.44	505.71
DP	CONTROL	0.000	488.05	716.22
	Pre-D	0.636	-64.35	167.14
	HD	0.002	-505.71	-101.44

**Tabla 21.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: 8-oxo-dG nuclear**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	-4.84	-3.34
	HD	0.000	-4.09	-3.24
	DP	0.000	-3.18	-2.21
Pre-D	CONTROL	0.000	3.34	4.84
	HD	0.376	-0.27	1.12
	DP	0.000	0.67	2.13
HD	CONTROL	0.000	3.24	4.09
	Pre-D	0.376	-1.12	0.27
	DP	0.000	0.58	1.37
DP	CONTROL	0.000	2.21	3.18
	Pre-D	0.000	-2.13	0.67
	HD	0.000	-1.37	-0.59

**Tabla 22.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: 8-oxo-dG mitocondrial**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.046	-3.73	-0.03
	HD	0.026	-3.63	-0.23
	DP	0.273	-2.78	0.63
Pre-D	CONTROL	0.046	0.03	3.73
	HD	0.999	-1.24	1.14
	DP	0.313	0.42	2.03
HD	CONTROL	0.026	0.23	3.63
	Pre-D	0.999	-1.14	1.24
	DP	0.025	0.08	1.63
DP	CONTROL	0.273	-0.63	2.78
	Pre-D	0.313	-2.03	0.42
	HD	0.025	-1.63	-0.08

**Tabla 23.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: GSSG/GSH**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	-6.37	-4.36
	HD	0.000	-2.87	-1.81
	DP	0.000	-2.54	-1.37
Pre-D	CONTROL	0.000	4.36	6.37
	HD	0.000	1.95	4.1
	DP	0.000	2.3	4.51
HD	CONTROL	0.000	1.81	2.87
	Pre-D	0.000	-4.1	-1.95
	DP	0.49	-0.32	1.08
DP	CONTROL	0.000	1.37	2.56
	Pre-D	0.000	-4.51	-2.3
	HD	0.49	-1.08	-0.32

**Tabla 24.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: Proteínas carboniladas**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	-4.41	-2.68
	HD	0.000	-3.54	-1.94
	DP	0.000	-3.1	-1.43
Pre-D	CONTROL	0.000	2.68	4.41
	HD	0.000	0.37	1.24
	DP	0.000	0.77	1.79
HD	CONTROL	0.000	1.94	3.54
	Pre-D	0.000	-1.24	-0.37
	DP	0.007	0.11	0.84
DP	CONTROL	0.000	1.43	3.1
	Pre-D	0.000	-1.79	0.77
	HD	0.007	-0.84	-0.11

**Tabla 25.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: Catalasa**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	66.19	112.28
	HD	0.000	102.31	148.62
	DP	0.000	67.95	112.17
Pre-D	CONTROL	0.000	-112.84	-66.19
	HD	0.000	23.87	48.59
	DP	0.996	-9.05	10.69
HD	CONTROL	0.000	-148.62	-102.31
	Pre-D	0.000	-48.59	-23.87
	DP	0.000	-45.60	-25.21
DP	CONTROL	0.000	-112.17	-67.95
	Pre-D	0.996	-10.69	9.05
	HD	0.000	25.21	45.60

**Tabla 26.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: GPX (glutathion peroxidasa)**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	10.43	20.22
	HD	0.000	9.56	17.55
	DP	0.000	9.26	17.15
Pre-D	CONTROL	0.000	-20.22	-10.43
	HD	0.669	-5.9	2.34
	DP	0.519	-6.21	1.97
HD	CONTROL	0.000	-17.55	-9.56
	Pre-D	0.669	-2.37	5.9
	DP	0.988	-3.21	2.52
DP	CONTROL	0.000	-17.15	-9.6
	Pre-D	0.519	-1.97	6.21
	HD	0.988	-2.52	3.21

**Tabla 27.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: GSR (Glutathion Reductasa)**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	5.54	12.51
	HD	0.000	4.5	11.46
	DP	0.000	4.99	11.94
Pre-D	CONTROL	0.000	-12.51	-5.54
	HD	0.002	-1.77	-0.32
	DP	0.141	-1.24	0.12
HD	CONTROL	0.000	-11.46	-4.5
	Pre-D	0.002	0.32	1.77
	DP	0.233	-0.18	1.15
DP	CONTROL	0.000	-11.94	-4.99
	Pre-D	0.141	-0.12	1.24
	HD	0.233	-1.15	0.18

**Tabla 28.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: GSH (Glutacion)**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.004	2.55	18.93
	HD	0.033	0.46	17.2
	DP	0.17	-1.42	15.13
Pre-D	CONTROL	0.004	-18.93	-2.55
	HD	1.000	-11.6	7.77
	DP	1.000	-13.49	5.71
HD	CONTROL	0.033	-17.19	-0.46
	Pre-D	1.000	-7.77	11.6
	DP	1.000	-11.73	7.79
DP	CONTROL	0.17	-15.13	1.42
	Pre-D	1.000	-5.71	13.49
	HD	1.000	-7.79	11.73

**Tabla 29.- Test ANOVA de un factor. Variable dependiente: SOD (Superóxido Dismutasa)**

GRUPO		SIGNIFICACIÓN (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CONTROL	Pre-D	0.000	1.885	3.132
	HD	0.000	2.782	4.046
	DP	0.000	1.998	3.253
Pre-D	CONTROL	0.000	-3.132	-1.885
	HD	0.000	0.312	1.499
	DP	1.000	-0.471	0.705
HD	CONTROL	0.000	-4.046	-2.782
	Pre-D	0.000	-1.499	-0.313
	DP	0.003	-1.386	-0.191
DP	CONTROL	0.000	-3.252	-1.998
	Pre-D	1.000	-0.705	0.471
	HD	0.003	0.191	1.386

### ANEXO 3.- COMPARACION DE MEDIAS ENTRE MUESTRAS INDEPENDIENTES (t de Student).

Tabla 30.- Comparación de medias (t de Student) entre grupos definidos por presencia o no de ciertos factores de riesgo clásicos. GRUPOS Pre-D, HD y DP (n=93)

Grupo 1: Ausencia de DM, Cardiopatía isquémica, Accidente cerebrovascular. (n=46)

Grupo 2: Presencia de al menos uno de ellos. (n=47)

Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>MDA</b>				
1	0.55 $\pm$ 0.21	0.053	-0.18	0.001
2	0.64 $\pm$ 0.24			
<b>F2-Isoprostanos</b>				
1	1002.08 $\pm$ 282.95	0.861	-139.48	116.83
2	1013.4 $\pm$ 314.55			
<b>GSSG/GSH</b>				
1	4.33 $\pm$ 2.17	0.155	-1.49	0.24
2	4.95 $\pm$ 2.05			
<b>P. Carboniladas</b>				
1	6.49 $\pm$ 0.84	0.045	-0.69	-0.007
2	6.85 $\pm$ 0.83			
<b>8-oxo-dG nuclear</b>				
1	6.35 $\pm$ 1.02	0.641	-0.56	0.35
2	6.46 $\pm$ 1.18			
<b>8-oxo-dG mitochondrial</b>				
1	15.36 $\pm$ 1.4	0.475	-0.93	0.44
2	15.6 $\pm$ 1.85			
<b>Catalasa</b>				
1	157.23 $\pm$ 24.23	0.486	-12.94	6.21
2	160.66 $\pm$ 22.23			
<b>GPX</b>				
1	47.07 $\pm$ 5.19	0.361	-1.25	3.39
2	46.01 $\pm$ 6.05			
<b>GSR</b>				
1	4.85 $\pm$ 1.15	0.904	-0.43	0.48
2	4.82 $\pm$ 1.07			

Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>SOD</b>				
1	4.66 $\pm$ 0.78	0.803	-0.31	0.41
2	4.61 $\pm$ 0.94			
<b>GSH</b>				
1	17.65 $\pm$ 2.24	0.158	-0.27	1.65
2	16.96 $\pm$ 2.41			

**Tabla 31.- Comparación de medias entre grupos definidos por presencia o no diabetes mellitus. GRUPOS Pre-D, HD y DP (n=93)**

Grupo 1: Diabéticos (n=31)

Grupo 2: No diabéticos (n=62)

Variable Grupo	Media ± desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>MDA</b> 1 2	0.65±0.24 0.56±0.22	0.107	-0.02	0.18
<b>F2-Isoprostanos</b> 1 2	1016±340.66 1003.55±276.74	0.847	-121.47	147.69
<b>GSSG/GSH</b> 1 2	4.87±2.03 4.56±2.17	0.510	-0.62	1.24
<b>P. Carboniladas</b> 1 2	6.82±0.85 6.62±0.84	0.296	-0.17	0.56
<b>8-oxo-dG nuclear</b> 1 2	6.29±1.21 6.48±1.05	0.427	-0.68	0.29
<b>8-oxo-dG mitochondrial</b> 1 2	15.89±1.33 15.27±1.78	0.092	-0.103	1.34
<b>Catalasa</b> 1 2	160.02±21.53 158.36±24.31	0.749	-8.61	11.92
<b>GPX</b> 1 2	45.59±4.77 47.01±6.05	0.253	-3.91	1.04
<b>GSR</b> 1 2	4.87±1.03 4.83±1.15	0.853	-0.44	0.53



Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>SOD</b> 1 2	4.57 $\pm$ 0.85 4.66 $\pm$ 0.88	0.666	-0.464	0.29
<b>GSH</b> 1 2	17.09 $\pm$ 2.44 17.40 $\pm$ 2.32	0.570	-1.33	0.74

**Tabla 32.- Comparación de medias entre grupos definidos por presencia o no diabetes mellitus. GRUPO Pre-D (n=32)**

Grupo 1: Diabéticos (n=13)

Grupo 2: No diabéticos (n=19)

Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>MDA</b> 1 2	0.75 $\pm$ 0.28 0.64 $\pm$ 0.33	0.345	-0.12	0.34
<b>F2-Isoprostanos</b> 1 2	989.13 $\pm$ 268.42 821.62 $\pm$ 145.89	0.035	12.51	322.52
<b>GSSG/GSH</b> 1 2	6.21 $\pm$ 2.04 7.13 $\pm$ 2.03	0.217	-2.42	0.57
<b>P. Carboniladas</b> 1 2	7.39 $\pm$ 0.84 7.35 $\pm$ 0.87	0.893	-0.59	0.67
<b>8-oxo-dG nuclear</b> 1 2	6.61 $\pm$ 1.48 7.29 $\pm$ 1.28	0.175	-1.68	0.32
<b>8-oxo-dG mitocondrial</b> 1 2	16.59 $\pm$ 1.19 15.14 $\pm$ 2.67	0.048	-1.73	3.06
<b>Catalasa</b> 1 2	162.53 $\pm$ 22.12 176.62 $\pm$ 12.98	0.05	-28.43	0.26
<b>GPX</b> 1 2	43.87 $\pm$ 5.55 46.21 $\pm$ 8.75	0.364	-7.5	2.83
<b>GSR</b> 1 2	4.56 $\pm$ 1.08 4.15 $\pm$ 1.13	0.313	-0.41	1.23
<b>SOD</b> 1 2	4.78 $\pm$ 0.75 5.09 $\pm$ 0.88	0.304	-0.93	0.3

Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
GSH 1 2	16 $\pm$ 2.42 14.97 $\pm$ 1.88	0.186	-0.53	2.58

**Tabla 33.- Comparación de medias entre grupos definidos por presencia o no de cardiopatía isquémica. GRUPOS Pre-D, HD y DP (n=93)**

Grupo 1: Pacientes con cardiopatía isquémica (n=24)

Grupo 2: Pacientes sin cardiopatía isquémica (n=69)

Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>MDA</b> 1 2	0.60 $\pm$ 0.22 0.59 $\pm$ 0.23	0.879	-0.10	0.12
<b>F2-Isoprostanos</b> 1 2	1079 $\pm$ 322.43 982 $\pm$ 287.62	0.183	-46.65	240.49
<b>GSSG/GSH</b> 1 2	4.77 $\pm$ 1.9 4.62 $\pm$ 2.2	0.782	-0.88	1.16
<b>P. Carboniladas</b> 1 2	6.84 $\pm$ 0.82 6.64 $\pm$ 0.85	0.313	-0.19	0.61
<b>8-oxo-dG nuclear</b> 1 2	6.59 $\pm$ 1.06 6.36 $\pm$ 1.12	0.378	-0.29	0.77
<b>8-oxo-dG mitochondrial</b> 1 2	15.18 $\pm$ 2.29 15.58 $\pm$ 1.41	0.315	-1.20	0.39
<b>Catalasa</b> 1 2	155.85 $\pm$ 25.01 159.95 $\pm$ 22.81	0.468	-15.28	7.07
<b>GPX</b> 1 2	46.59 $\pm$ 7.09 46.49 $\pm$ 5.17	0.948	-2.64	2.82
<b>GSR</b> 1 2	4.89 $\pm$ 1.18 4.82 $\pm$ 1.09	0.795	-0.46	0.60

Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>SOD</b> 1 2	4.55 $\pm$ 1.1 4.66 $\pm$ 0.78	0.61	-0.52	0.31
<b>GSH</b> 1 2	16.87 $\pm$ 2.23 17.44 $\pm$ 2.39	0.32	-1.69	0.56

**Tabla 34.- Comparación de medias entre grupos definidos por presencia o no de antecedente de accidente cerebrovascular. GRUPOS Pre-D, HD y DP (n=93)**

Grupo 1: Pacientes con ACV (n=9)

Grupo 2: Pacientes sin ACV (n=84)

Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>MDA</b> 1 2	0.6 $\pm$ 0.19 0.59 $\pm$ 0.23	0.97	-0.16	0.16
<b>F2-Isoprostanos</b> 1 2	985 $\pm$ 35 1010 $\pm$ 69	0.811	-235.36	184.68
<b>GSSG/GSH</b> 1 2	4.41 $\pm$ 2.1 4.69 $\pm$ 2.14	0.708	-1.77	1.21
<b>P. Carboniladas</b> 1 2	6.69 $\pm$ 0.61 6.69 $\pm$ 0.87	0.994	-0.59	0.59
<b>8-oxo-dG nuclear</b> 1 2	6.66 $\pm$ 0.75 6.39 $\pm$ 1.13	0.485	-0.49	1.05
<b>8-oxo-dG mitochondrial</b> 1 2	15.11 $\pm$ 2.85 15.53 $\pm$ 1.51	0.483	-1.58	0.75
<b>Catalasa</b> 1 2	155.14 $\pm$ 24.34 159.33 $\pm$ 23.3	0.611	-20.50	12.12
<b>GPX</b> 1 2	47.19 $\pm$ 6.29 46.45 $\pm$ 5.63	0.712	-3.23	4.71
<b>GSR</b> 1 2	5.28 $\pm$ 0.78 4.79 $\pm$ 1.13	0.22	-0.29	1.25

Variable Grupo	Media ± desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>SOD</b> 1 2	4.43±0.72 4.65±0.88	0.471	-0.82	0.38
<b>GSH</b> 1 2	16.79±1.97 17.35±2.39	0.505	-2.19	1.09

**Tabla 35.- Comparación de medias entre grupos definidos por ser mayores o menores de 70 años. GRUPOS Pre-D, HD y DP (n=93)**

GRUPO 1: MENORES DE 70 AÑOS (n=42)

GRUPO 2: IGUAL O MAYOR DE 70 AÑOS (n=51)

Variable Grupo	Media ± desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>MDA</b> 1 2	0.55±0.16 0.64±0.27	0.045	-0.18	-0.002
<b>F2-Isoprostanos</b> 1 2	1009.65±254.89 1006.72±333.74	0.96	-125.46	131.29
<b>GSSG/GSH</b> 1 2	3.67±1.39 5.44±2.29	0.000	-2.54	-1.004
<b>P. Carboniladas</b> 1 2	6.33±0.69 6.96±0.87	0.000	-0.95	-0.31
<b>8-oxo-dG nuclear</b> 1 2	6.04±0.89 6.71±1.17	0.002	-1.09	-0.25
<b>8-oxo-dG mitocondrial</b> 1 2	15.39±1.35 15.55±1.88	0.634	-0.85	0.52
<b>Catalasa</b> 1 2	156.10±22.28 161.26±23.85	0.288	-14.74	4.42
<b>GPX</b> 1 2	47.56±4.28 45.68±6.47	0.098	-0.35	4.10
<b>GSR</b> 1 2	5.08±0.82 4.64±1.24	0.044	0.012	0.88
<b>SOD</b> 1 2	4.61±0.68 4.66±0.99	0.749	-0.40	0.29



Variable Grupo	Media $\pm$ desviación típica	P	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
<b>GSH</b> <b>1</b> <b>2</b>	18.25 $\pm$ 2.02 16.52 $\pm$ 2.31	0.000	0.82	2.63

#### ANEXO 4.-CORRELACIONES BIVARIADAS:

Tabla 36.- Correlación de parámetros oxidados y enzimas antioxidantes con el tiempo de permanencia. GRUPOS HD Y DP (n=61)

		MDA	F2-Isoprostanos	GSSG/GSH	P. Carboniladas	8-oxo-dG nuclear	8-oxo-dG mitocondrial
Permanencia	Coefficiente de correlación	-0.198	0.201	<b>0.284</b>	0.216	0.151	-0.142
	Sig. (bilateral)	0.134	0.141	<b>0.029</b>	0.101	0.253	0.283

		Catalasa	SOD	GPX	GSR	GSH
Permanencia	Coefficiente de correlación	-0.067	<b>-0.351</b>	<b>0.368</b>	0.172	-0.068
	Sig. (bilateral)	0.613	<b>0.006</b>	<b>0.004</b>	0.193	0.610

Tabla 37.- Correlación de parámetros oxidados y enzimas antioxidantes con el MDRD.

Grupo Pre-D (n=32)

		<b>MDA</b>	<b>F2-Isoprostanos</b>	<b>GSSG/GSH</b>	<b>P. Carboniladas</b>	<b>8-oxo-dG nuclear</b>	<b>8-oxo-dG mitocondrial</b>
<b>MDRD</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	0.192	-0.171	-0.114	0.034	-0.022	-0.062
	<b>Sig. (bilateral)</b>	0.308	0.719	0.550	0.856	0.908	0.747

		<b>Catalasa</b>	<b>SOD</b>	<b>GPX</b>	<b>GSR</b>	<b>GSH</b>
<b>MDRD</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	-0.055	0.11	-0.247	0.083	-0.042
	<b>Sig. (bilateral)</b>	0.771	0.563	0.188	0.664	0.827

Tabla 38.- Correlación de parámetros oxidados y enzimas antioxidantes con función renal residual (FRR). Grupo DP (n=31)

		MDA	F2-Isoprostanos	GSSG/GSH	P. Carboniladas	8-oxo-dG nuclear	8-oxo-dG mitocondrial
<b>FRR</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	0.286	0.271	-0.201	0.081	0.184	-0.149
	<b>Sig. (bilateral)</b>	0.125	0.163	0.287	0.672	0.329	0.798

		Catalasa	SOD	GPX	GSR	GSH
<b>FRR</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	-0.088	<b>0.443</b>	<b>-0.478</b>	-0.232	-0.027
	<b>Sig. (bilateral)</b>	0.643	<b>0.014</b>	<b>0.008</b>	0.216	0.888

Tabla 39.- Correlación entre parámetros oxidados (n=93)

		MDA	F2-Isoprostanos	GSSG/GSH	P. Carboniladas	8-oxo-dG nuclear	8-oxo-dG mitocondrial
MDA	Coefficiente de correlación	--	0.028	0.308	0.371	0.233	0.123
	Sig. (bilateral)		0.8	0.003	0.000	0.024	0.238
F2-Isoprostanos	Coefficiente de correlación	0.028	--	-0.315	-0.213	-0.209	-0.091
	Sig. (bilateral)	0.8		0.003	0.048	0.052	0.402
GSSG/GSH	Coefficiente de correlación	0.308	-0.315	--	0.728	0.578	0.03
	Sig. (bilateral)	0.003	0.003		0.000	0.000	0.777
P. Carboniladas	Coefficiente de correlación	0.371	-0.213	0.728	--	0.549	0.187
	Sig. (bilateral)	0.000	0.048	0.000		0.000	0.073
8-oxo-dG nuclear	Coefficiente de correlación	0.233	-0.209	0.578	0.549	--	0.328
	Sig. (bilateral)	0.024	0.05	0.000	0.000		0.001
8-oxo-dG mitocondrial	Coefficiente de correlación	0.123	-0.091	0.03	0.187	0.328	--
	Sig. (bilateral)	0.238	0.402	0.77	0.073	0.001	

