



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

**DAÑO GENÉTICO Y RADIOSENSIBILIDAD
EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA
EVALUADOS MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

TESIS DOCTORAL

Silvia Berenice Sandoval Loera

**DAÑO GENÉTICO Y RADIOSENSIBILIDAD
EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA
EVALUADOS MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales
por Silvia Berenice Sandoval Loera

Bellaterra (Cerdanyola del Valles), Diciembre 2009

Director

Autora

**Dr. Ricard Marcos Dauder
Catedrático de Genética
UAB**

Silvia Berenice Sandoval Loera

A mi Padre

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Tamaulipas, por la beca PROMEP que me ha permitido llegar hasta aquí.

A mi director Ricard Marcos por más de cuatro años de su paciencia, consejos y apoyo, que iniciaron antes de llegar a Barcelona, pero sobre todo por la dirección de mi Tesis.

A la Fundación Pingvest de Barcelona y su Unidad de Hemodiálisis por su valiosa colaboración en este trabajo.

A José María Leal Gutiérrez por todo su apoyo y porque hay que tener siempre en mente los puntos cardinales de nuestra vida.

A todos mis compañeros Mutas, que contribuyen a formar un ambiente en el que conocimientos, opiniones y cultura fluyen en todas direcciones. Donde, la inmensa paciencia de Gloria y Lourdes, con cada uno de nosotros, se agradecerán siempre. Especialmente a los que fuimos parte del L.M.U.

A mi familia de México por entenderme y apoyarme desde mi tierra, sobre todo a mi padre por bajarme el cielo y las estrellas através de la ciencia y motivarme siempre a aprender más de lo que se nos enseña.

Y a mi familia en Barcelona, Anne, Era, Jenny, Lau, Pillana, Nacho, Naw, Omar y con especial cariño a Roberto, por ser quienes han estado a mi lado durante todo este tiempo, tanto en momentos difíciles, como en los mejores. He ganado su confianza, por lo que me han abierto su corazón, y ahora que estoy por ahí en un rinconcito, no pienso salir nunca. A esta familia la llevo conmigo a donde sea que vaya.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La insuficiencia renal crónica (IRC).....	1
1.1.1. Fisiología renal.....	2
1.1.2. El índice de filtrado glomerular	4
1.1.3. Etiología de la IRC.....	6
1.1.4. Espectro clínico de la IRC.....	9
1.1.5. Epidemiología de la IRC	10
1.2. Tratamiento de la IRC	11
1.2.1. Nutrición.....	12
1.2.1.1. Ingesta proteica	12
1.2.1.2. Vitaminas.....	12
1.2.1.3. Líquidos y electrolitos.....	13
1.2.2. Tratamiento renal sustitutivo (TRS).....	13
1.2.2.1. Diálisis: fundamentos físicos.....	15
1.2.2.2. La hemodiálisis convencional.....	17
1.2.2.3. Efectos negativos de la hemodiálisis.....	19
1.3. Enfermedades cardiovasculares en los pacientes con IRC.....	20
1.4. Daño genotóxico en pacientes con IRC.....	22
1.4.1. El estrés oxidativo.....	22
1.4.1.1. Las especies reactivas de oxígeno (EROS).....	22
1.4.1.2. Estrés oxidativo en la IRC.....	24
1.4.1.3. Mecanismos por los cuales las EROS contribuyen al daño renal.....	25
1.4.1.4. Daños en el DNA inducidos por las EROS.....	26
1.4.2. El estrés carbonilo.....	28
1.4.2.1. Rutas para la generación y desintoxicación de los RCO.....	29
1.4.3. Los productos de la glicación avanzada (AGE).....	30
1.4.3.1. Asociación entre el daño al DNA y los AGE en la IRC.....	32
1.4.4. Los productos de la lipoxidación avanzada (ALE).....	33
1.5. Inestabilidad genómica en los pacientes con IRC.....	34
1.5.1. Variaciones en la capacidad de reparación del DNA en la IRC.....	36
1.6. Radiosensibilidad individual.....	41
1.7. Inducción de daño genético y su detección.....	42
1.8. Los micronúcleos (MN).....	45
1.8.1. Ensayo de micronúcleos.....	46
1.8.1.1. Ventajas del ensayo de MN.....	46
1.8.1.2. Inconvenientes del ensayo de MN.....	47
1.8.2. Ensayo de MN en linfocitos humanos.....	48
1.8.2.1. Factores que afectan la frecuencia de MN en humanos.....	40

II OBJETIVOS.....	53
III MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1. Población estudiada	55
3.2. Obtención de las muestras.....	56
3.3. Ensayo de MN	56
3.1. Criterios para la determinación de los MN	57
3.4. Determinación de la radiosensibilidad.....	60
3.4.1. Irradiación de los cultivos de linfocitos.....	60
3.4.2. Parámetros de radiosensibilidad.....	60
3.5. Análisis estadístico.....	61
IV RESULTADOS.....	63
4.1. Estadística descriptiva de la población.....	63
4.2. Daño genético medido con el ensayo de MN.....	74
4.2.1. Pruebas de normalidad de las variables citogénicas.....	75
4.2.2. Analisis multifactorial.....	77
4.3. Relación entre daño genético y la IRC.....	78
4.4. Efectos del tratamiento con HD.....	81
4.4.1. Efecto de un año bajo HD.....	82
4.5. Factores de confusión.....	84
4.5.1. Género.....	84
4.5.2. Edad.....	84
4.5.3. IMC.....	86
4.5.4. Presencia de otras patologías.....	86
4.5.5. Tabaquismo.....	88
4.5.6. Trasplante.....	88
4.5.7. Suplementos antioxidantes.....	88
4.5.8. Medicamentos.....	89
4.6. Radiosensibilidad.....	92
4.6.1. Análisis multifactorial (BNMN 0,5 Gy).....	93
4.6.2. Relación entre radiosensibilidad y la IRC.....	94

4.6.3. Relación entre la radiosensibilidad y la HD.....	99
4.6.3.1. Radiosensibilidad después de un año en HD.....	99
4.7. Factores de confusión para el incremento por la radiosensibilidad.....	102
4.7.1. Género.....	102
4.7.2. Edad.....	102
4.7.3. IMC.....	102
4.7.4. Presencia de otras patologías.....	104
4.7.5. Tabaquismo.....	105
4.7.6. Trasplante.....	105
4.7.7. Suplementos nutritivos.....	105
4.7.8. Medicamentos.....	105
V. DISCUSIÓN	109
5.1. La población estudiada.....	111
5.2. Daño genético y la IRC.....	113
5.3. El ensayo de MN como biomarcador de daño genético fijado.....	120
5.4. Inestabilidad genómica en los pacientes con IRC.....	125
5.5. Papel de la HD en los niveles de daño y la radiosensibilidad.....	126
5.6. Posibles factores moduladores del daño observado en los pacientes con IRC.....	129
VI. CONCLUSIONES.....	137
VII. BIBLIOGRAFÍA	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura del riñón.....	3
Figura 2	Proceso de filtrado glomerular en el riñón.....	4
Figura 3	Modalidades del tratamiento renal sustitutivo.....	14
Figura 4	Filtrado según las características de la membrana.....	17
Figura 5	Esquema del proceso de hemodiálisis.....	18
Figura 6	Rutas para la generación y detoxificación de los RCO.....	29
Figura 7	Vías para la formación de los productos de AGE.....	31
Figura 8	Célula interfásica mostrando dos micronúcleos.....	45
Figura 9	Células binucleadas (bloqueo con citocalasina-B).....	49
Figura 10	Daños al DNA detectados con el ensayo de MN.....	49
Figura 11	Protocolo del ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica.....	57
Figura 12	Fotografías, criterio de selección de MN.....	59
Figura 13	Distribución de MN y BNMN en la población control antes y después de la transformación con log10.....	76
Figura 14	Distribución de MN y BNMN en la población de pacientes con IRC antes y después de la transformación con log10.....	77
Figura 15	Regresión de las BNMN y la creatinina.....	79
Figura 16	Regresión el daño genético y el FG	79
Figura 17	Gráfico de valores de BNMN en cada estadio de la IRC.....	80
Figura 18	Daño genético de acuerdo al estadio de IRC, y HD.....	81
Figura 19	Daño genético de acuerdo al tiempo en HD.....	82
Figura 20	Gráfico del efecto individual de 1 año bajo HD.....	83
Figura 21	Regresión lineal entre la edad y el daño genético.....	85
Figura 22	Gráfico de la media de edad en cada estadio de la IRC.....	85
Figura 23	Daño genético de acuerdo al IMC.....	86
Figura 24	Regresión del incremento por la radiación y la creatinina.....	95

Figura 25	Regresión del incremento por radiación con el FG.....	96
Figura 26	Gráfico del incremento por la radiación en cada estadio de la IRC.....	97
Figura 27	Gráfico del incremento por la radiación, agrupando los estadios 1 y 2 de la IRC.....	98
Figura 28	Gráfica del incremento relativo por radiación en cada estadio de la IRC.....	98
Figura 29	Gráfico del incremento por radiación y el tiempo en HD.....	99
Figura 30	Gráfico de la radiosensibilidad individual, tras un año bajo HD.....	101
Figura 31	Gráfico del incremento basal individual por radiación, tras un año bajo HD.....	101
Figura 32	Regresión entre el incremento de BNMN por la radiación y la edad...	103
Figura 33	Gráficos de las variables de radiosensibilidad y el IMC.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de los estadios de IRC (K/DOOI 2002).....	6
Tabla 2	Factores de riesgo para la IRC y su desarrollo	7
Tabla 3	Causas de la insuficiencia renal crónica.....	8
Tabla 4	El espectro clínico de la insuficiencia renal crónica.....	9
Tabla 5	Compuestos carbonilo reactivos (RCO) y sus precursores.....	28
Tabla 6	AGE incrementados en condiciones de elevada uremia.....	32
Tabla 7	Relación de algunos de los AGE/ALE más conocidos, así como sus precursores.....	33
Tabla 8	Factores que favorecen la transformación maligna o formación de tumores.....	36
Tabla 9	Factores que incrementan o disminuyen la frecuencia de MN.....	50
Tabla 10	Criterios definidos por el HUMN-project para la selección de células binucleadas y micronúcleos en células humanas.....	58
Tabla 11	Descriptiva de la población estudiada.....	65
Tabla 12	Causas de la IRC en la población estudiada.....	67
Tabla 13	Análítica sanguínea de las poblaciones estudiadas.....	69
Tabla 14	Variables citogenéticas para las poblaciones estudiadas.....	74
Tabla 15	Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov.....	75
Tabla 16	Modelo lineal general con Log10 BNMN como variable dependiente...	78
Tabla 17	Diferencias en cuanto a BNMN entre controles e IRC.....	78
Tabla 18	Prueba de t para muestras relacionadas: efecto de 1 año en HD.....	82
Tabla 19	Prueba de t : efecto del género sobre BNMN.....	84
Tabla 20	Pruebas de t para factores de confusión en la población total.....	87
Tabla 21	Pruebas de t para diversos factores en la población control y con IRC.	90
Tabla 22	Pruebas de t para diversos factores en los pacientes con IRC, con y sin HD.....	91
Tabla 23	Variables citogenéticas inducidas por radiación en cada población.....	93

Tabla 24	Modelo lineal general con BNMN 0,5 Gy como variable dependiente...	94
Tabla 25	Diferencias en cuanto al incremento por radiación.....	94
Tabla 26	Prueba de <i>t</i> para muestras relacionadas: efecto de un año en HD.....	101
Tabla 27	Prueba de <i>t</i> efecto del género sobre el daño inducido con la radiación.....	103
Tabla 28	Pruebas de <i>t</i> para distintos factores de confusión en la población total	106
Tabla 29	Análisis de la radiosensibilidad para la población control y con IRC.....	108
Tabla 30	Análisis de la radiosensibilidad en los pacientes con y sin HD.....	109
Tabla 31	Relación de estudios sobre el daño genético con otros ensayos en pacientes con IRC	116
Tabla 32	Relación de estudios sobre el daño genético medido con el ensayo de MN en pacientes con IRC.....	118

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La insuficiencia renal crónica (IRC)

La insuficiencia renal crónica es una enfermedad caracterizada por la pérdida gradual y progresiva, durante un periodo de meses o años, de la capacidad del riñón para mantener bajos los niveles de productos del metabolismo de las proteínas, mantener la presión arterial normal, así como mantener el equilibrio hidroelectrolítico y el ácido-básico (Luke, 2004).

En la guía de prácticas clínicas para la IRC (K/DOQI, 2002) de la National Kidney Foundation (NKF), se define a la enfermedad como:

- a) Daño renal durante al menos 3 meses, ya sea por anomalías estructurales o funcionales del riñón (con o sin descenso del filtrado glomerular), que puede ocasionar el descenso del filtrado glomerular (FG), manifestado por: anomalías patológicas o indicadores de daño en el riñón, incluyendo anomalías en la composición de la sangre o la orina, o anomalías en pruebas de imagen.
- b) Disminución de la función renal con FG menor de 60 mL/min 1,73 m² durante al menos 3 meses, con o sin daño en los riñones.

El parámetro de FG está corregido para un área de superficie corporal promedio de 1,73 m² y la superficie corporal se calcula mediante la fórmula de Dubois:

$$SC = P^{0,425} \times T^{0,725} \times 71,84$$

SC: Superficie corporal; P: Peso en kilogramos; T: Talla en centímetros

Es necesario resaltar las diferentes funciones que desempeñan nuestros riñones para comprender su vital importancia y aún más, lo que supone una disminución o pérdida de éstas en nuestro organismo. Es por esto que a continuación, se presenta un breve repaso de la fisiología renal.

1.1.1. Fisiología renal

La importancia de las funciones del riñón es tal que requiere, para sí, el 30% del flujo sanguíneo que desciende por la aorta y su consumo de oxígeno por gramo de tejido es únicamente sobrepasado por el músculo cardíaco. Los tres tipos de funciones que tiene a su cargo están encaminadas, fundamentalmente, a mantener el equilibrio del medio interno y son las siguientes:

1. Excreción de productos del metabolismo. Por ejemplo, urea, creatinina, fósforo, etc.
2. Regulación del medio interno. Equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base.
3. Función endocrina. Síntesis de metabolitos activos de la vitamina D, sistema renina-angiotensina, síntesis de eritropoyetina, quininas y prostaglandinas.

Estas funciones se llevan a cabo en diferentes zonas del riñón. Así, cada riñón está constituido por un conjunto de alrededor de un millón de unidades funcionales, que son las denominadas nefronas. Cada nefrona está compuesta por el glomérulo y su cápsula de Bowman y el túbulo (**figura 1**). Las dos primeras funciones, es decir la excretora y reguladora del medio interno, se consiguen con la formación y eliminación de la orina, cuya composición se adecua a la situación y necesidades del organismo. Tras formarse en el glomérulo un ultrafiltrado del plasma, el túbulo se encarga en sus diferentes porciones de modificar la composición de dicho ultrafiltrado hasta formar orina de composición definitiva, que se elimina a través de la vía excretora al exterior. Esto se puede apreciar en la **figura 2**.

Por los riñones pasan entre 1.000 y 1.500 mL de sangre por minuto. El glomérulo tiene una membrana basal semipermeable que permite el libre paso de agua y electrolitos, pero es relativamente impermeable a moléculas grandes. En los capilares glomerulares la presión hidrostática es aproximadamente tres veces mayor que la presión en otros capilares.

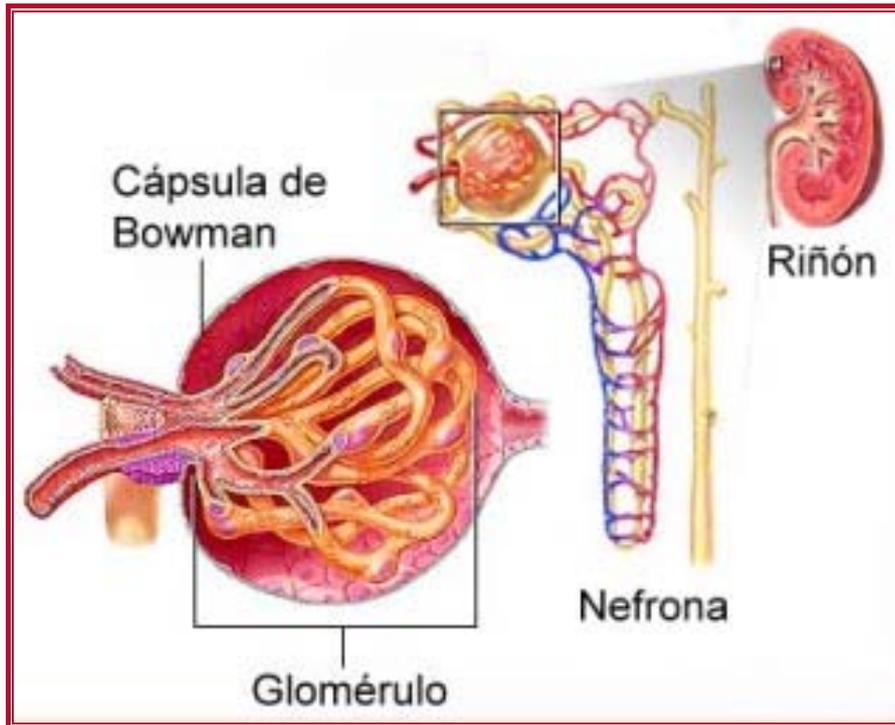


Figura 1. Estructura del riñón.

Como resultado de esta gran presión, las sustancias se filtran a través de la membrana semipermeable en la cápsula de Bowman, a una velocidad aproximada de 130 mL/min; a esto se le conoce como índice de filtrado glomerular (IFG).

Las células sanguíneas y las proteínas plasmáticas de gran peso molecular son incapaces de pasar a través de la membrana semipermeable. Por lo tanto, el filtrado glomerular está formado, esencialmente, por plasma sin las proteínas. En una persona promedio sana, se forman por día más de 187.000 mL de filtrado. Como la excreción normal de orina es alrededor de 1.500 mL por día, nos indica que solamente cerca del 1% de la cantidad de filtrado formado se excreta; por lo tanto, el otro 99% debe ser reabsorbido.

En la **figura 2** podemos ver un esquema donde se representa el balance del filtrado glomerular en el riñón, representado por una nefrona.

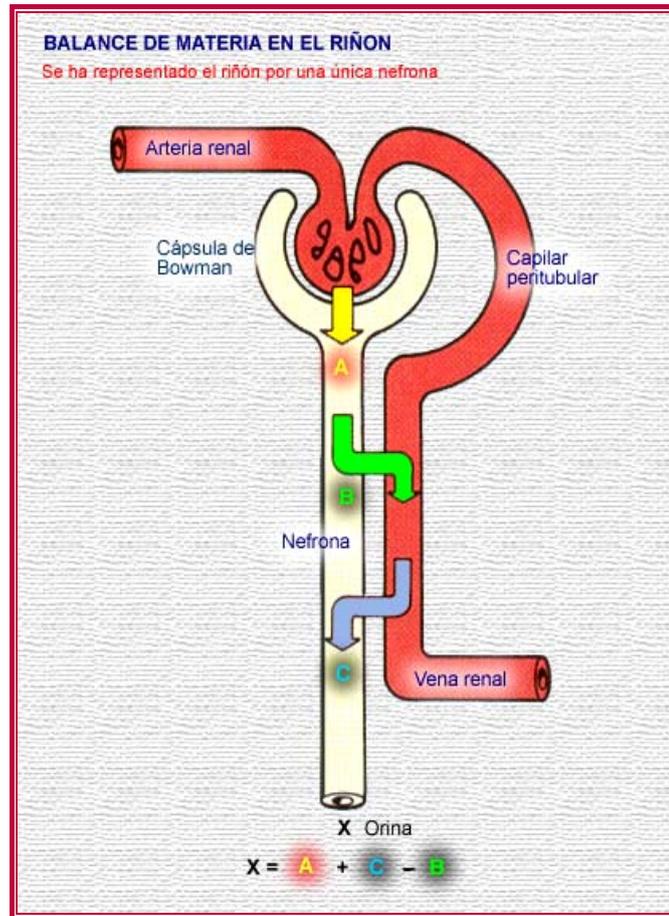


Figura 2. Proceso de filtrado glomerular en el riñón

1.1.2. El índice de filtrado glomerular

El índice de FG es un parámetro extremadamente importante en el estudio de la fisiología renal y, como ya hemos visto, se utiliza para la definición y clasificación de la IRC, siendo fundamental en la evaluación clínica de la función renal. A continuación se indican las dos fórmulas más comunes que determinan el índice de FG:

a) La fórmula MDRD (modificación de la dieta en la enfermedad renal)

Esta fórmula fue propuesta por Levey y colaboradores en 1996 y 1999, y toma en cuenta los niveles plasmáticos de creatinina, nitrógeno uréico y albúmina;

MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) modificada:

(hombre)

$$FG \text{ (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 170 \times Cr \text{ (mg/dL)}^{-0,999} \times \text{edad}^{-0,176} \times NU \text{ (mg/dL)}^{-0,17} \times Alb \text{ (g/dL)}^{0,318}$$

(mujer)

$$FG \text{ (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 0,762 \times 170 \times Cr \text{ (mg/dL)}^{-0,999} \times \text{edad}^{-0,176} \times NU \text{ (mg/dL)}^{-0,17} \times Alb \text{ (g/dL)}^{0,318}$$

(raza negra)

$$FG \text{ (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 1,18 \times 170 \times Cr \text{ (mg/dL)}^{-0,999} \times \text{edad}^{-0,176} \times NU \text{ (mg/dL)}^{-0,17} \times Alb \text{ (g/dL)}^{0,318}$$

FG: filtrado glomerular; Cr: creatinina plasmática; NU: nitrógeno uréico plasmático; Alb: albúmina plasmática.

b) La fórmula de Cockcroft-Gault.

La ecuación de Cockcroft y Gault (1976) es sin duda una de las más usadas, aunque la misma más bien determina el aclaramiento de creatinina que el filtrado glomerular. Debe indicarse que la ecuación determina con bastante precisión el aclaramiento de creatinina sólo en pacientes sin una marcada insuficiencia renal, ya que esta ecuación se desarrolló a partir de estudios en pacientes de asilos geriátricos, con una función renal relativamente normal. En esta fórmula se tiene en cuenta la creatinina plasmática y la aclaración de creatinina (K/DOQI, 2002)

Fórmula de Cockcroft-Gault:

(hombre)

$$CICr \text{ (mL/min)} = (140 - \text{edad}) \times \text{peso (kg)} / 72 \times Cr \text{ (mg/dL)}$$

(mujer)

$$CICr \text{ (mL/min)} = (140 - \text{edad}) \times \text{peso (kg)} \times 0,85 / 72 \times Cr \text{ (mg/dL)}$$

CICr: aclaramiento de creatinina; Cr: creatinina plasmática

La **tabla 1** indica los distintos estadios de la IRC según el FG, donde podemos ver un estadio de riesgo aumentado por distintos factores, los cuales se describen con detalle en la **tabla 2**. Además, la clasificación menciona el término insuficiencia renal terminal (IRT), también conocida como enfermedad renal en fase terminal (por sus siglas en inglés ESRD) y se refiere al último

estadio de la IRC donde el paciente ya se encuentra en un TRS (tratamiento renal sustitutivo).

Tabla 1. Clasificación de los estadios de insuficiencia renal crónica de la National Kidney Foundation (K/DOQI 2002).

CLASIFICACIÓN DE LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA				
Estadio	Descripción	Clasificación por su severidad		Clasificación por su tratamiento
		FG (mL/min 1,73 m ²)	Términos relacionados	
—	Riesgo aumentado	60*	*Con factores de riesgo	
I	Daño renal con FG normal o elevado	>90	Albuminuria, proteinuria, hematuria	
II	Daño renal con disminución leve del FG	60-89	Albuminuria, proteinuria, hematuria	
III	Daño renal con disminución moderada del FG	30-59	Insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal temprana	T: si es receptor para trasplante
IV	Daño renal con disminución severa del FG	15-29	Insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal tardía, pre-insuficiencia renal terminal (IRT)	D: si es hemodiálisis, diálisis peritoneal
V	Fallo renal	<15 (o diálisis)	Fallo renal, uremia, IRT	

FG: filtrado glomerular. **Daño renal:** alteraciones patológicas o marcadores de daño, fundamentalmente una proteinuria/albuminuria persistente (índice albúmina/creatinina >30 mg/g, aunque se han propuesto niveles 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. ***Factores de riesgo:** edad avanzada, antecedentes familiares de IRC, hipertensión arterial, 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, razas afroamericana y otras minoritarias en Estados Unidos y bajo nivel educativo o social (Levey *et al.*, 2005).

1.1.3. Etiología de la IRC

Las causas más comunes de la IRC son las enfermedades inflamatorias del riñón, infecciones, obstrucciones del tracto urinario y desórdenes hereditarios, como los riñones poliquísticos. Sin embargo, esto está cambiando actualmente tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, siendo

ahora las causas más comunes: la diabetes y la hipertensión, que son también las principales causas de la patología cardiovascular.

Tabla 2. Factores de riesgo para la IRC y su desarrollo (Levey *et al.*, 2003).

FACTORES DE RIESGO PARA LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA Y SU DESARROLLO		
Factores de riesgo	Definición	Ejemplos
Factores de susceptibilidad	Incrementan la susceptibilidad de daño renal	Edad mayor, antecedentes familiares de IRC, reducción de la masa renal, bajo peso al nacer, minorías étnicas o raciales, nivel de educación o socioeconómico bajo.
Factores de iniciación	Inician el daño renal directamente	Diabetes, hipertensión, dislipemia, enfermedades autoinmunes, infecciones sistémicas, infecciones del tracto urinario, cálculos urinarios, obstrucción del tracto urinario bajo, toxicidad por medicamentos.
Factores de progresión	Empeoran el daño renal y causan un descenso más rápido de la función renal después de iniciar el daño renal	Nivel alto de proteinuria, mayor presión arterial, poco control glicémico en diabetes, tabaquismo.
Factores de fallo renal	Incrementan la morbilidad y mortalidad en la insuficiencia renal	Dosis baja de diálisis (Kt/V)*, acceso vascular temporal, anemia, nivel bajo de albúmina en suero, remisión tardía.

* Kt/V: Aclaramiento de urea del dializador multiplicado por tiempo de diálisis dividido por el volumen de distribución de la urea (agua corporal total del paciente).

Los individuos aparentemente saludables, a los que se les diagnostica IRC, tienen al menos 10 veces más riesgo de morir por una enfermedad cardiovascular prematura que por desarrollar un fallo renal. Así, la IRC contribuye hacia la morbilidad por ECV en unos 12 millones de individuos cada año; a nivel mundial estas cifras van en aumento debido a la epidemia global de la diabetes tipo 2. Además, los centros de salud pública han observado un incremento de una de las condiciones que ponen a la población en riesgo de sufrir insuficiencia renal: la obesidad.

En España la diabetes es la principal causa conocida de la IRC aportando, al menos, el 21% de los nuevos casos (García, 2004). En los países

latinoamericanos la diabetes también se mantiene como la principal causa de la IRC, con los porcentajes de incidencia más altos en Puerto Rico (65 %), México (51%), Venezuela (42%) y Colombia (35%), según el Informe del Registro Latinoamericano de Diálisis y Trasplante Renal del 2006 (Cusumano y González Bedat, 2008; Cusumano *et al.*, 2009). Aquellas enfermedades que conducen a la insuficiencia renal crónica hasta su fase terminal se presentan en la **tabla 3**, de acuerdo con su frecuencia.

Tabla 3. Causas de la insuficiencia renal crónica (NAC-SEN, 2009).

Principales causas de la IRC	Ejemplos
Glomerulopatías:	
Primarias	Glomerulonefritis crónica Glomeruloesclerosis focal Glomerulonefritis idiopática Nefropatía por IgA (inmunoglobulina) Glomerulonefritis membrano-proliferativa Nefropatía membranosa
Asociadas a una enfermedad sistémica	Amiloidosis Diabetes mellitus Síndrome hemolítico-urémico Glomerulonefritis post-infecciosa Lupus Granulomatosis de Wegener
Hipertensión	Glomeruloesclerosis maligna Nefroangioesclerosis
Enfermedades hereditarias	Nefritis hereditaria (síndrome de Alport) Enfermedad quística medular Síndrome uña-rótula Riñón poliquístico
Nefritis intersticial crónica	Asociada a una diversa gama de enfermedades, incluyendo genéticas, uropatía obstructiva y toxinas ambientales crónicas o por ciertos fármacos.
Uropatía obstructiva e infección urinaria	Hiperplasia prostática benigna Válvulas uretrales posteriores Fibrosis retroperitoneal Obstrucción uretral Reflujo vésico uretral
Enfermedad renal macrovascular	Estenosis de la arteria renal causada por aterosclerosis o displasia fibromuscular

1.1.4. Espectro clínico de la IRC

Durante las etapas iniciales de la enfermedad puede que no se presenten síntomas. De hecho, la progresión puede ser tan gradual que los síntomas pueden presentarse sólo cuando la función renal es ya inferior a la décima parte de su función normal.

Tabla 4. El espectro clínico de la insuficiencia renal crónica (Ortuño Mirete, 2003).

Espectro clínico de la IRC
<p>Trastornos hidroelectrolíticos y del equilibrio ácido-base</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inicialmente incapacidad para la concentración de la orina con alteración de la capacidad de dilución en fases avanzadas. - Acidosis metabólica e hiperpotasémia en estadios finales.
<p>Trastornos del metabolismo fosforo-cálcico</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hiperfosforemia, hipocalcemia e hiperparatiroidismo secundario. - Disminución de la vitamina D3 [1, 25-(OH)₂ D3] - Osteodistrofia (osteomalacia, osteítis fibrosa quística, osteoporosis, osteoesclerosis).
<p>Alteraciones digestivas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anorexia, hipo, náuseas y vómitos, estomatitis, gingivitis (uremia elevada) - Fetor urémico (disociación de urea a amoníaco) - Pirosis, gastritis erosiva y duodenitis. Hemorragia digestiva. - Hepatopatía (incidencia de hepatitis vírica aumentada), ascitis, pancreatitis. - Estreñimiento, diarrea.
<p>Alteraciones endocrinas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Amenorrea, esterilidad – atrofia testicular, disfunción ovárica –, impotencia. - Intolerancia hidrocarbonada. Hiperlipemia. Hiperparatiroidismo secundario.
<p>Alteraciones cardiorrespiratorias</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cardiomiopatía: insuficiencia cardíaca y arritmias. - Neumonitis. Pleuritis fibrinosa. Edema pulmonar atípico. - Aterosclerosis acelerada: cardiopatía isquémica. Hipertensión arterial. - Pericarditis urémica.
<p>Alteraciones hematológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anemia normocítica-normocrómica. Linfopenia. Coagulopatía.
<p>Alteraciones dermatológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Palidez (anemia); piel cérea (depósito de urea); color amarillento (urocromos). - Prurito y excoriaciones (hiperparatiroidismo; depósitos de calcio). - Equimosis y hematomas (defectos de la coagulación).

La insuficiencia renal crónica produce una acumulación de líquidos y productos de desecho en el cuerpo, lo que lleva a una acumulación de productos de desechos nitrogenados en la sangre (azotemia), pudiendo quedar afectados múltiples órganos y sistemas corporales. Un listado de los trastornos y alteraciones que pueden sufrir los individuos con IRC se refleja en la **tabla 4**.

1.1.5. Epidemiología de la IRC

Un aspecto importante que enriquece la perspectiva que podemos llegar a tener de esta enfermedad, y de su impacto a nivel mundial, es el epidemiológico.

Así, la incidencia y la prevalencia son dos conceptos a conocer de la IRC. La incidencia de la IRC se entiende como el número de pacientes que iniciaron por primera vez algún tipo de tratamiento en el curso del período de un año. La prevalencia de la IRC, se entiende como el número de pacientes que siguen algún tipo de tratamiento de diálisis o han recibido un trasplante renal.

En términos generales la IRC representa uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI, con una incidencia y prevalencia en aumento, un desarrollo desfavorable y un costo de tratamiento elevado, afectando principalmente a los países en vías de desarrollo. Según la *International Society of Nephrology* y la *International Federation of Kidney Foundations* (ISN y IFKF), se considera que de 400 a 600 millones de adultos padecen de insuficiencia renal crónica, esto es 1 de cada 10 adultos (Bakris y Ritz, 2009).

Según la Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión (SLANH) los índices de prevalencia de la IRC varían enormemente entre estos países, con una incidencia de más de 600 pacientes por millón de habitantes (pmp) en Puerto Rico, Chile, Uruguay y Argentina, con entre 300 y 600 pacientes por millón de habitantes en Colombia, Brasil, México, Panamá y Venezuela, siendo significativamente menor en el resto de los países de la zona (Cusumano y González Bedat, 2008; Cusumano *et al.*, 2009).

En Estados Unidos el número de pacientes con IRC (bajo tratamiento con diálisis o trasplantados) ha incrementado dramáticamente de 209.000 en 1991 a 472.000 en el 2004, habiéndose observado incrementos del 43% en la incidencia ajustada para sexo, edad y raza durante la década posterior a 1991 (Bethesda, 2007). En ese país la IRC fue responsable de la muerte de 45.000 personas en 2006, estableciéndose en el noveno lugar de las principales causas de muerte (Meloine, 2008).

Según registros del 2006, los países con mayor incidencia en Europa son Alemania, Grecia y Bélgica con 213, 196 y 186 pmp, España se sitúa en séptimo lugar con 132 pmp, siendo los países con menor incidencia Finlandia, Noruega y Holanda con 84, 100 y 112 pmp, respectivamente. En cuanto al orden por prevalencia, en los primeros lugares se encuentran Alemania, Bélgica y Grecia, respectivamente, seguidos por España en el cuarto lugar (ERA_EDTA, 2006).

El estudio EPRICE de la Sociedad Española de Nefrología (SEN) y el Ministerio de Sanidad estiman que un 11% de la población general en España padece insuficiencia renal crónica, que un 6% de la población general y un 21% de las personas que acuden a los Centros de Atención Primaria (estudio EUROCAP) presentan IRC con función renal por debajo del 50% ($FG < 60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$); además, un 40% de la población sin diagnosticar fallece antes de llegar a la diálisis. En el informe de diálisis y trasplante de la SEN del 2007, se cita una incidencia en España de 125 pmp, con la menor incidencia en Cantabria (92,5 pmp) y la mayor en Canarias con 147,1 pmp (SEN, 2008).

1.2. Tratamiento de la IRC

Según las normas de actuación clínica (NAC) de la SEN, los tratamientos a los que se someten los pacientes con IRC varían en relación a la fase en la que se encuentra el paciente, teniendo como objetivos mantener al máximo su calidad de vida. Entre estos objetivos cabe destacar:

- Detener o retardar el deterioro de la función renal
- Detectar y corregir los factores que deterioran la función de forma reversible
- Prevenir y tratar las complicaciones urémicas

- Decidir sobre la inclusión en programa de diálisis/trasplante
- Seleccionar el método de tratamiento inicial
- Educar al paciente y a su familia así como atender los aspectos psicológicos y sociales
- Preparar con suficiente antelación para el tratamiento renal sustitutivo (TRS)
- Iniciar oportunamente el TRS

A continuación se indican los tratamientos más usuales, en función del estado de la patología. Estos tratamientos los podemos clasificar en dos grupos:

1. Aspectos relacionados con la nutrición.
2. Tratamiento renal sustitutivo (en la fase final de la enfermedad)

1.2.1. Nutrición

1.2.1.1. Ingesta proteica

Una reducción de la ingesta proteica forma parte del protocolo de tratamiento de los pacientes con IRC. Aunque la reducción severa de la ingesta proteica ha sido objeto de controversia, se recomienda una reducción moderada (0,8 g/kg/día). Esta reducción es segura y fácil de tolerar para la mayoría de los pacientes. Esta dieta reduce los productos nitrogenados de desecho que provienen de la degradación de las proteínas, previene la aparición de la acidosis metabólica, mejora la hiperfosfatemia e hiperpotasemia, e incluso podría retrasar la progresión a la insuficiencia renal terminal (IRT). En este tipo de dieta, a los pacientes se les proporciona suficientes carbohidratos y grasas para alcanzar los requerimientos de energía y prevenir la cetosis.

1.2.1.2. Vitaminas

Como las restricciones en la dieta pueden reducir la ingesta de vitaminas, los pacientes deben tomar un complejo multi-vitamínico que contenga vitaminas hidrosolubles. La administración de vitaminas A y E es innecesaria, mientras que la vitamina D, en forma de 1,25- di hidroxivitamina D (calcitrol) o sus análogos, se deben administrar de acuerdo a las concentraciones de HPT (hormona paratiroidea) y de fosfatos.

1.2.1.3. Líquidos y electrolitos

La ingesta de agua sólo se restringe cuando la concentración de sodio en suero es < 135 mmol/L. La restricción de sodio a 2 g/día beneficia a los pacientes, especialmente a aquellos con edema, fallo cardíaco e hipertensión.

Por lo que respecta a la ingesta de potasio, ésta está estrechamente relacionada con la ingesta de carne, vegetales y frutas y, usualmente, no requiere de ajustes. Sin embargo, se debe evitar la comida rica en potasio (especialmente sustitutos de sal). La hiperpotasémia es poco frecuente hasta que se llega a la insuficiencia renal terminal, y es entonces cuando es necesario restringir la ingesta de potasio.

Frecuentemente, la restricción de fosfato a <1 g/día es suficiente para mantener los niveles óptimos de fosfato durante la fase temprana del estadio 3 y 4 de la IRC. Sin embargo, en las fases posteriores con frecuencia es necesaria la administración de los denominados fijadores de fosfato, como sales de calcio (acetato o carbonato, evitando el citrato). No se debe administrar como fijadores más de 1.500 mg/día de calcio elemental (NAC-SEN, 2009).

1.2.2. Tratamiento renal sustitutivo (TRS)

El momento ideal en el cual debe iniciarse un TRS es justo antes o cuando el paciente empieza a manifestar los síntomas de la uremia; sin embargo, en pacientes con hipertensión, enfermedad cardiovascular o anemia se debe iniciar el TRS antes de lo previsto. El TRS tiene tres modalidades de tratamiento: *hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante*; cada una con sus propios riesgos y beneficios. La selección del TRS se hace de acuerdo con el cuadro clínico y la preferencia del paciente. Si el paciente cuenta con un donante voluntario vivo y compatible, el trasplante puede llevarse a cabo sin hemodiálisis o diálisis peritoneal previa (Tolkoff-Rubin y Goes, 2004); de lo contrario, cuando el paciente inicie una de las modalidades de diálisis, será incluido en lista de espera para trasplante renal de donante cadáver (NAC-SEN, 2009).

En la **figura 3** podemos ver un esquema de las tres modalidades de tratamiento renal sustitutivo. El tipo de hemodiálisis que será objeto de estudio en este trabajo es la HD convencional con membranas de bajo flujo.

Antes de entrar a detallar a fondo los sistemas de IRC es conveniente mencionar el problema que representa el TRS en los sistemas de salud, y por que es necesario estudiar a fondo los beneficios o desventajas de cada uno de ellos.

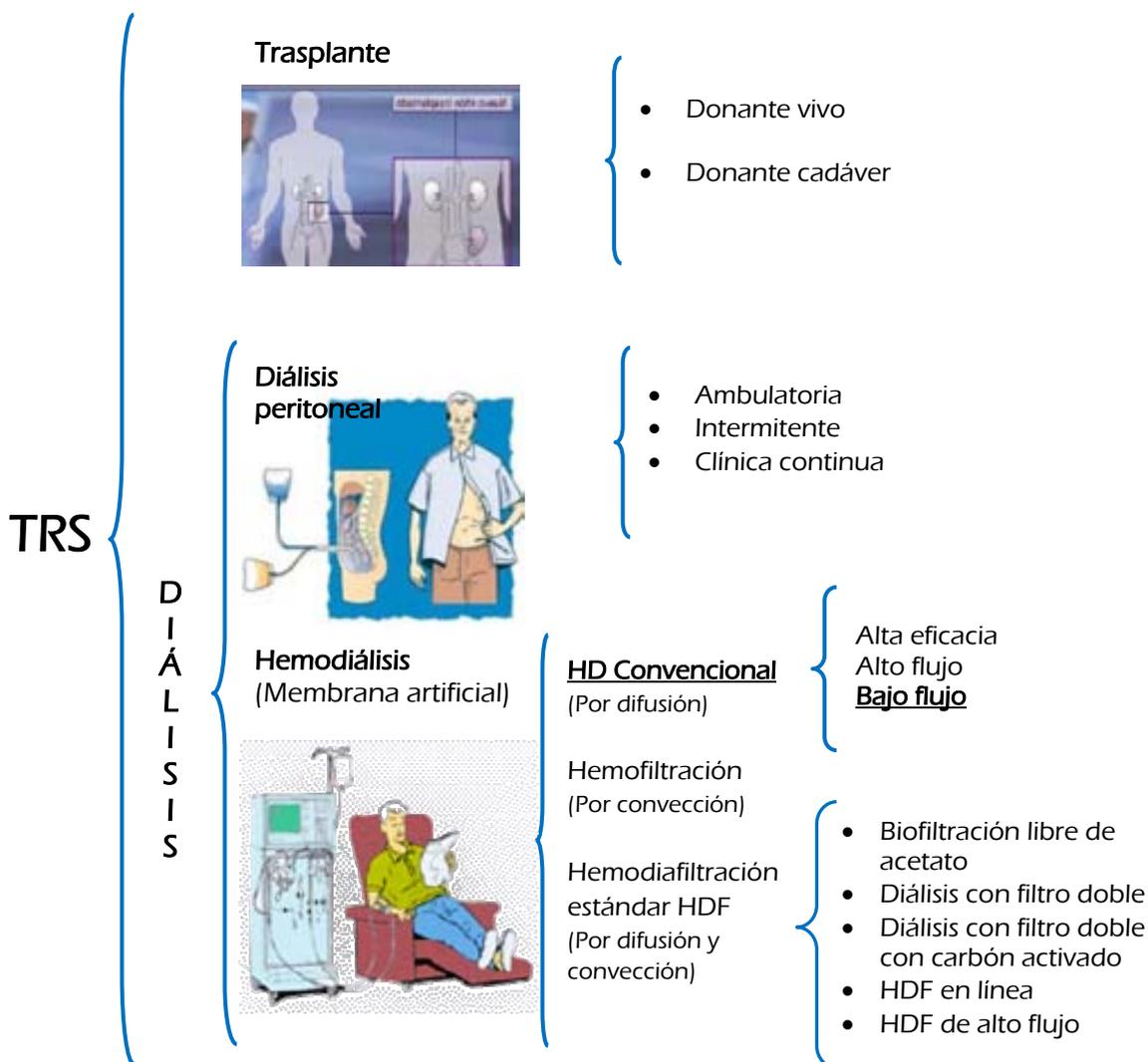


Figura 3. Modalidades del tratamiento renal sustitutivo.

A nivel mundial, más de 1,5 millones de personas viven gracias a un tratamiento renal sustitutivo, con hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplante

renal. Se pronostica que esta cifra se duplicará en los próximos 10 años con lo cual se estima que el costo acumulativo mundial para TRS excederá 1 trillón de dólares (EEUU), lo cual será un gasto imposible de asumir en los países que disponen de un bajo presupuesto destinado a salud pública. De hecho, más de un 80% de los individuos que reciben tratamiento renal sustitutivo viven en países desarrollados (Alebiosu, 2005; Atkins, 2005; Bakris y Ritz, 2009).

Según el estudio EPIRCE (Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica Española) realizado por la Sociedad Española de Nefrología y el Ministerio de Sanidad, para el censo del 2005 se estimaba que más de 40.000 personas se encontraban en TRS, con diálisis o trasplante renal, por pérdida completa de la función renal. Se considera que esta cifra crecerá al menos un 50% en los próximos 10 años, cambiando así el panorama, especialmente dado el envejecimiento de la población y el aumento de la diabetes de tipo II en la población general (García, 2004).

En los países en vías de desarrollo que, además, es donde la insuficiencia renal crónica se manifiesta en edades tempranas (por ejemplo en Guatemala el 40% de los pacientes con IRC tienen menos de 40 años), el TRS es de difícil acceso debido a su costo. En India y Pakistán menos del 10% de los pacientes que requieren el tratamiento lo reciben, y en muchos países africanos se tiene poco o ningún acceso al TRS (Alebiosu, 2005; Atkins, 2005; Bakris y Ritz, 2009).

1.2.2.1. Diálisis: fundamentos físicos

La diálisis es la difusión, o paso, de partículas solubles de una solución a otra a través de una membrana semipermeable. El paso de estas partículas sólo será posible cuando su tamaño sea menor que los poros de la membrana, y se producirá en la dirección determinada por el gradiente de concentración; es decir, de mayor a menor concentración, hasta conseguir el equilibrio osmótico entre ambas soluciones (NAC-SEN, 2009).

Los principios fisicoquímicos que regulan el paso de estas sustancias son:

El transporte difusivo: movimiento pasivo de solutos a través de una membrana por la diferencia de gradiente.

La ultrafiltración o transporte por convección: requiere un gradiente de presión hidrostática para el paso simultáneo de agua y solutos a través de la membrana. En este último caso, se elimina la sobrecarga de líquidos acumulada durante el periodo de inter-diálisis y se depuran los solutos que acompañan este ultrafiltrado del plasma del paciente (Maduell, 2004).

La diálisis se utiliza en medicina como un método de depuración extrarrenal, existiendo dos tipos de diálisis, según la membrana semipermeable utilizada. La diálisis peritoneal utiliza el peritoneo (membrana natural), mientras que la hemodiálisis emplea dializadores fabricados con membranas artificiales (acetato de celulosa y otras). En cualquiera de los casos, la sangre del paciente es una de las soluciones (compartimiento sanguíneo) y está separada por la membrana semipermeable de la otra solución (compartimiento del líquido de diálisis). El tamaño de los poros de estas membranas impide el paso de las células sanguíneas y de las proteínas plasmáticas, así como de las bacterias que puedan contaminar el líquido de diálisis. La composición de este último es similar, electrolíticamente, a la de un líquido extracelular normal, al que se añade glucosa para aumentar su osmolaridad con respecto al plasma. Con ello se consigue una filtración adecuada para la diálisis peritoneal (paso de agua y solutos desde la sangre del paciente al líquido de diálisis). No obstante, también se puede obtener mediante el aumento de la presión hidrostática en el compartimiento sanguíneo o produciendo una presión negativa en el compartimiento del líquido de diálisis, por fuerza de convección como habitualmente se hace en la hemodiálisis (NAC-SEN, 2009).

Por lo tanto, tenemos que los distintos aspectos que determinan la eliminación de sustancias son los siguientes:

- a) El tamaño molecular; la eliminación depende del tamaño y es mayor para moléculas pequeñas.
- b) El gradiente de concentración entre la sangre y la solución de diálisis de una sustancia en particular; mientras más grande sea el gradiente de concentración más rápida será la difusión.
- c) El área de la membrana; la transferencia neta del soluto incrementa conforme incrementa la superficie del área de la membrana.

- d) La permeabilidad de la membrana; ésta viene determinada por las características específicas de la membrana tales como el tamaño del poro, carga y conformación cuaternaria.
- e) La velocidad de flujo de la sangre y el dializado; a mayor velocidad de flujo, mayor eliminación del soluto, especialmente si el flujo del dializado va en sentido contrario del flujo de la sangre, lo que permite el máximo gradiente a través de la membrana (Tolkoff-Rubin y Goes, 2004).

La **figura 4** muestra como tiene lugar el filtrado según el tamaño del poro de la membrana.

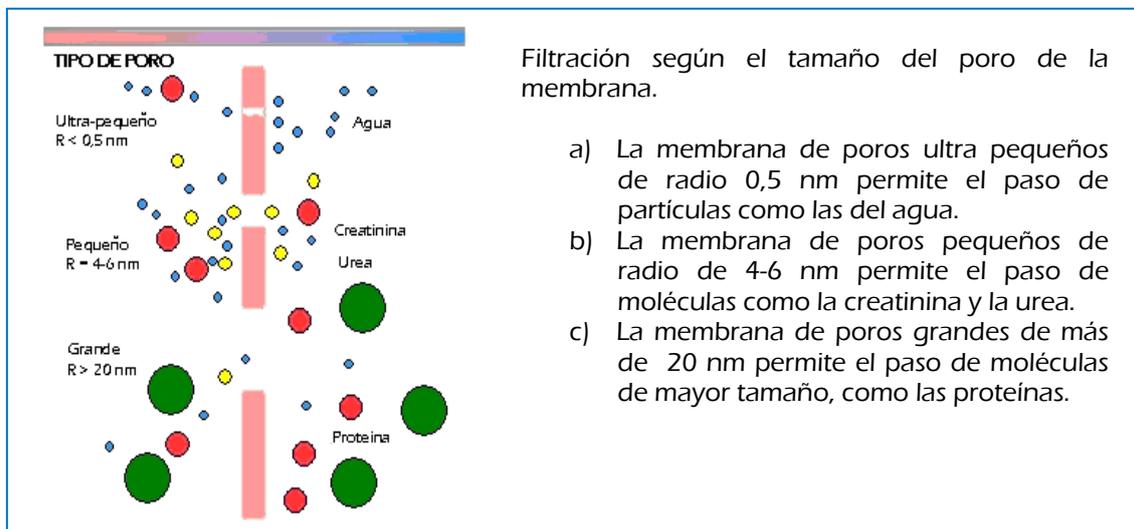


Figura 4. Filtrado según las características de la membrana.

1.2.2.2. La hemodiálisis convencional

La hemodiálisis es un procedimiento que permite depurar la sangre de sustancias acumuladas, mediante un acceso vascular por el cual se extrae sangre venosa y se hace circular a través de una serie de finos tubos o capilares contruidos con un material semi-permeable. Esta red se baña con en un líquido de composición conocida en electrolitos y bases llamado dializado, que circula en sentido contrario a la sangre. La diferencia de concentración provoca un movimiento de urea, potasio, creatina y otras partículas desde la sangre hacia el dializado y de bicarbonato en sentido contrario. Como sangre y dializado

circulan en sentidos opuestos a cierta velocidad, el equilibrio no se alcanza a lo largo de este sistema o filtro y siempre existe un gradiente que favorece el movimiento de partículas descrito. Aplicada durante un periodo de 3-4 horas al día se logra la máxima eficiencia para llevar los niveles de electrolitos y urea a un rango no peligroso, hasta que la acumulación de partículas vuelva a hacer necesaria una nueva sesión (NAC-SEN, 2009).

La **figura 5** ilustra el proceso de HD donde podemos ver la interacción de la sangre al pasar por la membrana con el dializado.

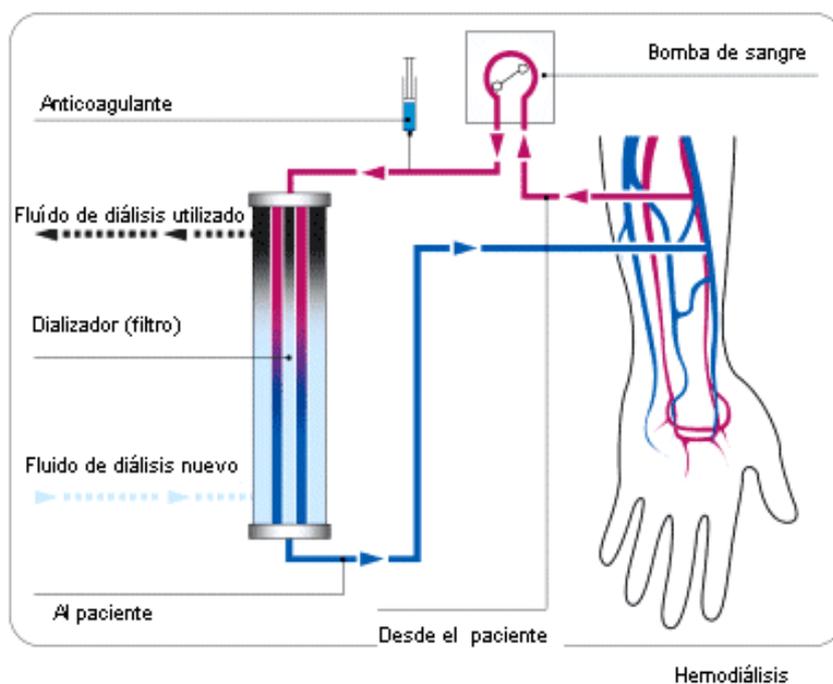


Figura 5. Esquema del proceso de hemodiálisis

La HD convencional es la forma más económica de tratamiento pero en la actualidad se considera de baja eficacia. La depuración se realiza casi exclusivamente por un mecanismo difusivo, utilizando la ultrafiltración para eliminar la sobrecarga hídrica y no requiere de líquido de reposición (Maduell, 2004).

1.2.2.3. Efectos negativos de la hemodiálisis

A pesar de sus ventajas, el proceso de hemodiálisis puede suponer una serie de efectos negativos, como los siguientes:

a) Anemia

El desarrollo de la anemia va paralelo a la progresión de la IRC. La anemia relacionada con la IRC es usualmente normocromática y normocítica. Casi dos tercios de los pacientes que empiezan un tratamiento de hemodiálisis tienen los niveles de hematocrito por debajo del 30%. La anemia sin tratamiento contribuye a la morbilidad y mortalidad cardiovascular, y está relacionada con la capacidad de hacer ejercicio y la habilidad para realizar tareas simples. Un factor importante en los pacientes con IRC, que contribuye a la anemia, es el descenso en la producción de eritropoyetina.

Existen otros factores que pueden contribuir a la anemia, tales como la reducción de la vida media de los eritrocitos, inhibidores urémicos de eritropoyesis, deficiencia de hierro debido a la baja absorción de éste en el tracto gastrointestinal, pérdida de sangre debido al muestreo frecuente de sangre y pérdidas durante la hemodiálisis. La diálisis remueve el ácido fólico, haciendo necesario el remplazo con folato. La intoxicación por aluminio, ya sea por contaminación del abastecimiento de agua de diálisis, o a través del uso de captadores de fosfatos que contienen aluminio (para tratar la hiperfosfatemia), se ha asociado con la anemia microcítica observada en los pacientes con largos periodos en hemodiálisis que tienen reservas normales de hierro (Douthat *et al.*, 2003).

Para el tratamiento de la anemia en la IRC se debe tomar una decisión individual para cada paciente, de acuerdo con la repercusión clínica de la anemia (tanto en pacientes en HD como en pre-HD), estableciendo una concentración de hemoglobina estándar para cada paciente. Para alcanzar y mantener estas concentraciones de hemoglobina se administra eritropoyetina (si la anemia es consecuencia de un déficit en su producción) y hierro (oral y/o intravenoso). La eritropoyetina (EPO) mejora significativamente la calidad de

vida de los pacientes, proporcionando sensación de no tener cansancio, mejorías en el apetito, la capacidad de trabajo, la tolerancia al ejercicio, la función cardiaca, la función cognitiva, la depresión y, asimismo, normaliza el ritmo de sueño.

Las transfusiones de sangre están indicadas en el paciente gravemente anémicos con signos y síntomas de anemia, por ejemplo: pérdidas sanguíneas agudas que provoquen inestabilidad hemodinámica, o angina grave. También están indicadas en pacientes resistentes a la EPO con pérdidas sanguíneas cuya concentración de hemoglobina disminuya por debajo de los niveles críticos (NAC-SEN 2009).

b) Malnutrición

La hipoalbuminemia está asociada con un incremento de la mortalidad en diálisis. El marcado catabolismo, la anorexia, y las severas limitaciones en la dieta durante el período de prediálisis, tienen como consecuencia la pérdida de peso. Después de la iniciación de la hemodiálisis, los pacientes por lo general tienen un mejor apetito; en estos pacientes la ingesta diaria de proteínas y calorías debe ser regulada, y la ingesta de vitaminas solubles en agua, incluyendo el ácido fólico, deben ser complementada ya que se eliminan durante la diálisis (Tolkoff-Rubin y Goes, 2004).

1.3. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) en la IRC

Las ECV son la mayor causa de muerte en la población general, y como tal no es sorprendente que también lo sea entre los pacientes con IRC en diálisis (Cheung *et al.*, 2004). Lo que si es diferente de los pacientes con IRC es la magnitud de las complicaciones cardiovasculares y la casi equivalente mortalidad cardiaca entre grupos de diferentes edades. Aunque, la mortalidad cardiaca para los pacientes en diálisis con edades de 45 años o menos, sea más de 100 veces mayor que en la población en general, también en los grupos de edad mayor, la mortalidad cardiovascular es al menos 5 veces mayor en los

pacientes con IRC que en la población general (Foley *et al.*, 1998). Existen datos que sugieren que las complicaciones cardiovasculares se aceleran conforme la función renal se pierde progresivamente, y que un alto porcentaje de casos de pacientes en diálisis ya cuentan con una carga substancial de ECV al iniciar su vida en diálisis (Foley *et al.*, 1998; Baigent *et al.*, 2000).

En la última década, numerosos estudios epidemiológicos han intentado determinar las causas o factores que contribuyen a la alta mortalidad por ECV en los pacientes con IRC, y dichos estudios han encontrado que los factores de riesgo tradicionales para la ECV tales como la hipertensión y niveles altos de colesterol no tienen un papel relevante en los pacientes en diálisis (Becker *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 2000). Más importantes que los factores de riesgo tradicionales, son los nuevos factores no-tradicionales, como la inflamación y la malnutrición, los cuales son difíciles de concretar.

Un resumen con las observaciones epidemiológicas se cita a continuación (Himmelfarb *et al.*, 2002).

1. Las mayores causas de muerte en la IRT (IRC estadio 5) son las ECV (50%) y las enfermedades infecciosas (25%).
2. La inflamación, detectada por concentraciones elevadas de proteína C-reactiva, como medida de la respuesta puntual de fase, está asociada al incremento de mortalidad por ECV.
3. Los pacientes con IRT con evidente malnutrición calórica-protéica, medida por bajas concentraciones de albúmina y pre-albúmina, tienen un riesgo relativo más alto de mortalidad, que incrementa con el grado de hipoalbuminemia.
4. La inflamación y la malnutrición están interrelacionadas, pero cada una contribuye de forma independiente al riesgo de mortalidad.
5. Los aspectos del TRS que contribuyen a la inflamación, tales como el uso prolongado de catéteres para el acceso vascular o el uso de membranas biocompatibles, también están asociados al incremento de riesgo de mortalidad por ECV o por enfermedades infecciosas.

6. La hiperhomocisteinemia es altamente prevalente en la uremia y puede estar asociada con la toxicidad CV.

1.4. Daño genotóxico en pacientes con IRC

Una de las características de los pacientes con IRC es que, como consecuencia de su enfermedad, se asume que están sometidos a estrés oxidativo y carbonilo. Resultado de esta exposición es que tendrán también una acumulación de productos finales de la glicación avanzada (AGE) y productos finales de la lipoxidación (ALE). A continuación se describe la naturaleza y significado de estas exposiciones.

1.4.1. El estrés oxidativo

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una rotura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (EROS). Las EROS incluyen a los radicales libres y a otras especies no radicálicas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes (Gutiérrez y Justo, 2002).

1.4.1.1. Las especies reactivas de oxígeno (EROS)

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo (HO^\cdot)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O_2^-)
- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
- Óxido nítrico (NO)
- Peróxido (ROO^\cdot)

- Semiquinona ($O_2^{\cdot-}$)
- Ozono (O_3)

Los daños ocasionados por las EROS sobre el material biológico son diversos, dependiendo de la especie. Así, el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) es un potente radical libre, varias miles de veces más reactivo que el $O_2^{\cdot-}$. Produce daño principalmente sobre el DNA, proteínas y lípidos, induciendo la peroxidación lipídica y daño sobre membranas, siendo capaz de estimular la respuesta inflamatoria. Las EROS pueden actuar sobre el DNA, la peroxidación lipídica y las proteínas, alterando el equilibrio oxidación-reducción, de la siguiente manera:

- Daño sobre el DNA. Se produce alteración de las bases, roturas de cadena, intercambios entre cromátidas hermanas y entrecruzamientos entre DNA y proteínas. Esto puede conducir a la inducción de mutaciones y alteraciones en el control celular.
- Peroxidación lipídica (PL). Ésta es una reacción en cadena en la cual un OH^{\cdot} quita un átomo de hidrógeno de un grupo metilo de un ácido graso de la membrana celular, transformándolo en un nuevo radical libre (radical peróxido). Éste a su vez, sustrae un átomo de hidrógeno de un grupo metilo, de un ácido graso vecino, proceso que se repite en cadena hasta la muerte celular.
- Daño sobre las proteínas: las EROS alteran la conformación y la función de las proteínas oxidando aminoácidos específicos, como la lisina, serina, arginina y prolina. La pérdida de función frena procesos celulares e induce la producción de anticuerpos.
- Señal REDOX (equilibrio óxido-reducción). La alteración del balance REDOX cambia las señales intracelulares pudiendo inducir la proliferación, la apoptosis, la desregulación génica y la necrosis (Andersen *et al.*, 2006).

1.4.1.2. Estrés oxidativo en la IRC

Estudios realizados en pacientes con distintos grados de IRC, sugieren que los enfermos renales están en una situación de estrés oxidativo al compararse con individuos sanos. Además, el grado de estrés oxidativo se correlaciona con el grado de IRC (Ong-Ajyooth *et al.*, 1996; Annuk *et al.*, 2001).

El desplazamiento del equilibrio REDOX hacia la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y otras toxinas urémicas de naturaleza oxidante, en relación con la capacidad de defensa antioxidante, está favorecido en los pacientes con fallos en la función renal, por varios factores. Así el paciente sometido a hemodiálisis (HD) por lo general tiene reservas deficientes de vitaminas y minerales que son de importancia fundamental en los mecanismos de defensa antioxidante. Además, la hemodiálisis no logra corregir totalmente la toxicidad urémica y, por el contrario, el propio procedimiento tiene algunos efectos negativos. Se ha demostrado la acumulación de sustancias de naturaleza prooxidante en la sangre, y en otros tejidos, en los pacientes con IRC (Panzetta *et al.*, 1995; Hashimoto *et al.*, 1996; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 1997); éstas incluyen la homocisteína, capaz de generar H_2O_2 durante su metabolismo, la carboximetilisina y la pentosidina. Estos compuestos se producen como consecuencia de la glicosidación y autoxidación de carbohidratos, lípidos y proteínas (Saldaña *et al.*, 2004).

En la insuficiencia renal crónica y en el proceso de diálisis: el daño tubular por isquemia/reperfusión está, en parte, ocasionado por el aumento del estrés oxidativo (Edelstein *et al.*, 1997). Las EROS producen la activación de la enzima xantina-oxidasa y de los neutrófilos, mecanismos importantes del daño renal por isquemia/reperfusión. El óxido nítrico (NO) parece aumentar en la fase isquémica y las EROS en la de reperfusión, por lo que el balance NO/EROS condicionará la magnitud del daño, así como los donantes de NO tendrán un potencial papel citoprotector frente a la acción de las EROS (Nath *et al.*, 1998). En las nefritis por formación de inmunocomplejos, se estimula a los leucocitos polimorfonucleares y a los macrófagos a producir radicales aniones superóxido. Por tanto, las EROS juegan un papel importante en el desarrollo del daño renal

y en la formación de la proteinuria (Sanaka *et al.*, 1997), al tiempo que la pérdida de nefronas conduce a una mayor producción de EROS (Van den Braden *et al.*, 1997). Se ha visto que en pacientes con IRC existe un aumento de la peroxidación de lípidos de la membrana de los glóbulos rojos, lo cual es un reflejo del aumento del estrés oxidativo por las EROS (Panzetta *et al.*, 1995; Ongajooth *et al.*, 1996; Ong-awyoorth *et al.*, 1997; Peuchant *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 1998).

Por otro lado, el contacto entre la membrana dializadora, y los componentes séricos y polimorfonucleares, produce una activación del complemento, junto a la producción de citoquinas y de EROS. Esta situación lleva a la peroxidación lipídica, una desnaturalización de proteínas, daño en las células endoteliales y a un continuo estrés oxidativo (Hashimoto *et al.*, 1996). Además, es conocido que el hierro, utilizado como suplemento en los pacientes hemodializados, permanece en estado libre algunas horas después de la administración endovenosa. En esta condición cataliza la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), pudiendo contribuir de manera significativa al incremento del estrés oxidativo (Jacobson y Moldeus, 1994; Michelis *et al.*, 2003; Anraku *et al.*, 2004).

Resumiendo, parece demostrado que las EROS están implicadas en el daño renal progresivo, de acuerdo con diversas evidencias (Zorrilla *et al.*, 2004), tales como:

- En la IRC la producción de EROS está aumentada
- Distintas estrategias antioxidantes ejercen efectos beneficiosos en modelos de insuficiencia renal crónica
- El estrés oxidativo puede inducir en el riñón sano cambios similares a los observados en la IRC (Haugen y Nath, 1999).

1.4.1.3. Mecanismos por los cuales las EROS contribuyen al daño renal

Los mecanismos a través de los cuales las EROS pueden contribuir a la progresión de la enfermedad renal son los siguientes:

- Hemodinámicamente, al dañar las propiedades características del glomérulo.
- Induciendo respuestas de crecimiento anormal.
- Al inducir la pérdida del fenotipo celular y la apoptosis.
- Promoviendo respuestas inflamatorias agudas y crónicas. Los oxidantes pueden suprarregular la adhesión de ciertas moléculas y medidores proinflamatorios, la transcripción de factores y citoquinas fibrogénicas que están claramente implicadas en la progresión de la enfermedad renal (Haugen y Nath, 1999).
- Tras una pérdida de la masa renal, en las nefronas supervivientes se produce un aumento del consumo de O₂, lo que implica un aumento del estrés oxidativo potencialmente dañino para estas nefronas (Nath *et al.*, 1998).

1.4.1.4. Daños en el DNA inducidos por las EROS

Las EROS inducen un amplio abanico de efectos negativos sobre la molécula del DNA, algunas de las lesiones citadas son: rotura de una o de las dos cadenas del esqueleto azúcar-fosfato, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina), y la formación de uniones cruzadas (*cross-links*) DNA-DNA o DNA-proteína, a través de diferentes mecanismos (Zorrilla *et al.*, 2004).

De forma mas detallada, estos efectos son:

- **Modificación de bases del DNA:** se conoce que el daño en el DNA por radicales libres (RL) endógenos ocurre de forma espontánea y existe un nivel normal de bases modificadas por EROS en el DNA celular. La acción del OH[•] da lugar a más de 20 modificaciones y entre ellas la más frecuente es la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) que tiene un potencial altamente mutagénico, al igual que la 5-hidroximetil-2-desoxiuridina (Jaruga y Dizdaroglu, 1996; Okamoto *et al.*, 1996).

- **Depuración de bases del DNA:** los sitios apurínicos o apirimidínicos (AP), se generan por rotura del enlace glicosídico, que puede resultar del ataque al azúcar por parte del OH. Estas lesiones presentan adenina insertada preferencialmente opuesta a la lesión. Los mutágenos que producen daño oxidativo incluyen las radiaciones ionizantes, el H₂O₂, la bleomicina, la neocarzinostatina y el complejo Cu-fenantrolina, y estos son capaces de producir sitios AP por oxidación de la desoxirribosa del DNA (Zorrilla *et al.*, 2004).
- **Roturas de una cadena del DNA:** las roturas de cadena simple (SSB) se producen por escisión del enlace fosfodiéster. Ocurren frecuentemente por ataque químico o de radicales libres a la porción desoxirribosa del esqueleto del DNA. Se ha demostrado que sustancias carcinógenas, generadoras de EROS, provocan la aparición de roturas de una cadena en el DNA, además de modificaciones de bases (Shi *et al.*, 1996).
- **Mutaciones:** la no reparación, o la mala reparación de las lesiones anteriores, conduce a la fijación del daño como mutaciones. En tumores inducidos por exposición a agentes que inducen EROS se ha detectado la presencia de mutaciones independientes, considerándose que el efecto del ataque al DNA por las EROS desempeña un papel importante en el incremento de estas mutaciones que conducen al cáncer (Reid *et al.*, 1991).
- **Activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores:** agentes oxidantes como el H₂O₂, O₂, oxígeno hiperbárico y ozono, pueden inducir experimentalmente la activación de oncogenes en células iniciadas y protegidas (Clemens, 1991; Lo *et al.*, 1996). Es posible también que conduzcan a la inactivación de genes supresores de tumores. De esta forma se modifica la proliferación celular.

1.4.2. El estrés carbonilo

El estrés carbonilo se refiere a la acumulación de compuestos carbonilo reactivos (RCO), por ejemplo: el glioxal, el metilglioxal, la arabinosa, el glicolaldehído, la 3-desoxiglucosona y el deshidroascorbato, que se forman por la oxidación de lípidos y carbohidratos, y que conducen indirectamente a una glicación o lipoxidación avanzada de proteínas, dando como resultado los productos finales de la glicación y lipoxidación avanzada (AGE y ALE). En la **tabla 5** podemos ver algunos RCO y sus precursores.

La uremia crónica presente en los pacientes con IRC se asocia a un incremento de proteínas modificadas por RCO, lo que produce un incremento en el contenido de AGE y ALE en plasma y tejido. El mecanismo por el cual el estrés carbonilo está incrementado en la uremia no se comprende en su totalidad, pero puede que esta acumulación sea por una producción excesiva de RCO, o por una capacidad disminuida de aclaramiento o de desintoxicación de estos compuestos (Miyata *et al.*, 1999).

Tabla 5. Compuestos carbonilo reactivos y sus precursores.

RCO	Precursor	Referencia
3-Desoxiglucosona	Carbohidrato	Niwa <i>et al.</i> , 1995
Deshidroascorbato	Acido ascórbico	Miyata <i>et al.</i> , 1997
Glioxal	Carbohidrato, lípido, aminoácido	Odani <i>et al.</i> , 1999
Metilglioxal	Carbohidrato, lípido, aminoácido	Odani <i>et al.</i> , 1999
Malondialdehído	Lípido	Miyata <i>et al.</i> , 1998a
Arabinosa	Carbohidrato	Wells-Knecht <i>et al.</i> , 1995 Miyata <i>et al.</i> , 2000c

RCO: compuestos carbonilo reactivos (*reactive carbonyl compounds*).

1.4.2.1. Rutas para la generación y desintoxicación de RCO

En la **figura 6** vemos que el nivel de estrés oxidativo se plantea como balance entre la producción total de EROS ($K_1 \times [O_2]$) y el grado de su inactivación por las defensas antioxidantes ($K_1 \times [O_2]^* \times [\text{substrato}]$), que da como resultado la formación de RCO. Los RCO también se forman por reacciones no enzimáticas (K_4 : ej., metilglioxal). Hay diferentes mecanismos de eliminación de estos RCO, ya sea por la denominada desintoxicación de RCO ($K_6 \times [RCO]$), por una variedad de vías metabólicas (ej., vía glioxalasa), o por aclarado por el cuerpo (K_7). Posteriormente los RCO reaccionan con proteínas para formar productos de la glicación avanzada (AGE) y productos de la lipoxidación avanzada (ALE). La acumulación de RCO en la uremia se da como resultado de un incremento en su producción ($K_3+K_4+K_5$) o de un descenso en su eliminación (K_6+K_7).

Como conclusión de lo anterior, tenemos que tanto los AGE como los ALE se transforman por la reacción entre los residuos de las proteínas y los RCO (Miyata *et al.*, 1996a), y que estos RCO se producen constantemente por el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y aminoácidos, los cuales están presentes en abundancia en todo el cuerpo.

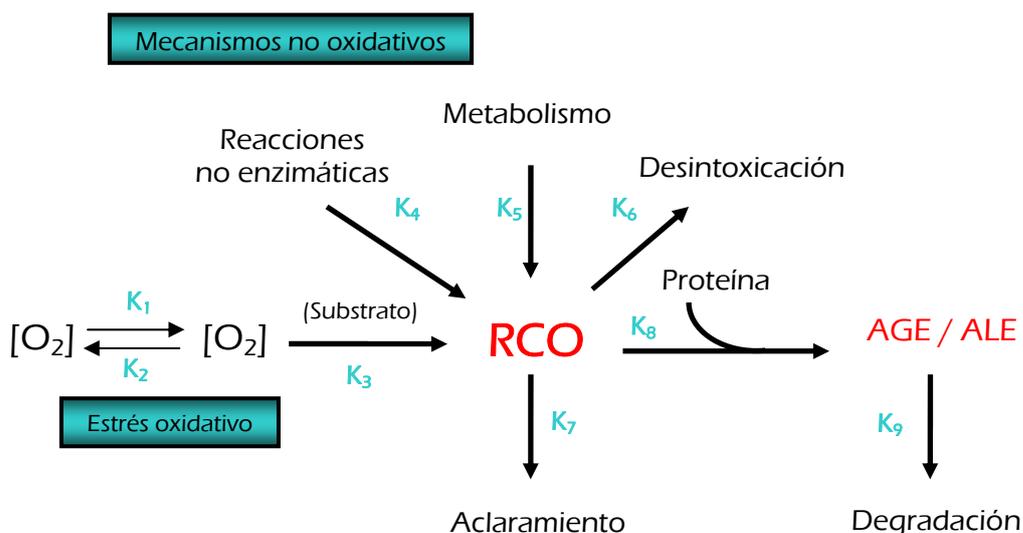


Figura 6. Rutas para la generación y detoxificación de los RCO.

1.4.3. Los productos de la glicación avanzada (AGE)

Los productos finales de la glicación avanzada (*advanced glycation end products*, AGE) se generan por una reacción no enzimática (reacción de Maillard) donde azúcares reducidos reaccionan con proteínas, generando compuestos inestables (glicosaliminas), las cuales subsecuentemente se reorganizarán para formar productos más estables (Amadori). Dentro de semanas o meses las reacciones complejas siguientes o paralelas llevarán a la formación de compuestos estables irreversibles llamados AGE. Alternativamente, compuestos carbonilos reactivos, resultantes de reacciones de la peroxidación lipídica, de la auto-oxidación de glucosa, o de varias vías no oxidativas, pueden reaccionar con grupos de proteínas libres de aminas, péptidos, aminoácidos, productos Amadori o DNA para formar AGE más rápidamente (Sebekova *et al.*, 2007). En la **figura 7** podemos ver el esquema de las vías alternativas para la formación de AGE.

Esta glicación avanzada ocurre de manera irreversible y se acumula en las células, tejidos y fluidos corporales formando parte del proceso de envejecimiento, de la diabetes, de la insuficiencia renal y de otras enfermedades degenerativas, tales como el Alzheimer (Brownlee, 1995; Münch *et al.*, 1997). El reciente progreso en la comprensión de este proceso, relacionado con la edad, ha confirmado que los AGE juegan un papel muy importante en la patogénia de las complicaciones vasculares aceleradas en la diabetes y en la IRC (Bierhaus *et al.*, 1998; Dawnay y Millar, 1998; Raj *et al.*, 2000). Como se ve en la **figura 7**, el estrés oxidativo y carbonilo (incrementado en la uremia) promueve la producción de compuestos reactivos carbonilo, estimulando de esta forma la generación de AGE (Monnier *et al.*, 1992; Miyata *et al.*, 1998b; 1999). En la **tabla 6** se citan aquellos AGE mas frecuentes, indicando los niveles normales, y aquellos observados en situaciones con elevados niveles de uremia.

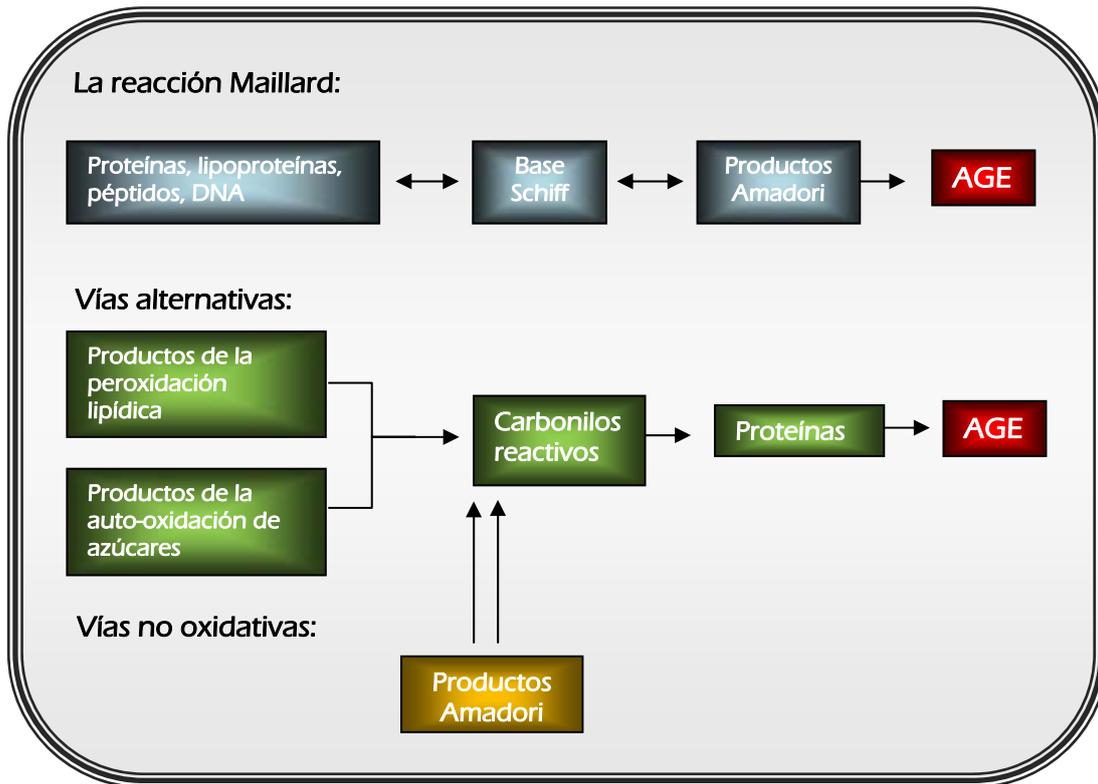


Figura 7. Vías para la formación de los productos de la glicación avanzada (AGE). Modificado de Sebekova *et al.* (2007).

La eliminación de los desechos de los AGE se lleva a cabo predominantemente en los riñones. Es ahí donde los AGE son filtrados (particularmente la fracción de bajo peso molecular), son parcialmente degradados en el sistema tubular, y finalmente el resto es excretado en la orina (Gugliucci, 1996). Con la disminución de la función renal, los AGE se acumulan en los tejidos (Monnier *et al.*, 1992; Niwa *et al.*, 1996; Miyata *et al.*, 2000b; Meerwaldt *et al.*, 2005), mientras que sus niveles en plasma aumentan progresivamente. Así, los niveles en suero en pacientes urémicos muestran incrementos de 3 a 5 veces, en comparación con controles sanos (Tabla 6). Hay que señalar que casi todas las estructuras renales (membrana basal, células endoteliales y mesangiales, podocitos, túbulos) son susceptibles a la acumulación de AGE (Bucala *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 2005).

En la IRC se cree que los AGE son, al menos parcialmente, responsables de promover el estrés oxidativo, la inflamación, la aterosclerosis acelerada, así

como de la progresión de la pérdida de la función renal, debido a la inducción de una proliferación celular anormal, promoción de la fibrosis renal e hipertrofia (Vlassara *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995; Sebekova *et al.*, 1998; Raj *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2001).

Tabla 6. AGE en condiciones de elevada uremia (Vanholder *et al.*, 2003).

AGE	Concentración normal	Concentración urémica
3-Desoxiglucosoma (mg/L)	0,3 ± 0,1	1,7 ± 1,0
Fructosalisina (mg/L)	—	58,1 ± 1,08
Glioxal (µg/L)	67,0 ± 20,00	221,0 ± 28,0
Metilglioxal (µg/L)	47,0 ± 20,0	110,0 ± 18,0
(CML) N ^ε -(carboximetil) lisina (mg/L)	1,1 ± 0,3	4,3 ± 1,3
Pentosidina (µg/L)	51,6 ± 18,8	896,0 ± 448,0

AGE: productos de la glicación avanzada (*advanced glycation end products*).

1.4.3.1. Asociación entre el daño al DNA y los AGE en la IRC

La elevada reactividad de los AGE los hace candidatos para inducir daño en el material genético y originar sus subsiguientes efectos. Existe evidencia que liga la presencia de elevados niveles de CML, que es uno de los AGE listados en la **tabla 6**, con un incremento en los daños inducidos en el DNA, medido con un incremento significativo en la frecuencia de los micronúcleos, que miden la inducción de roturas cromosómicas y/o aneuploidías (Fragedaki *et al.*, 2005).

Esta asociación en pacientes con IRC, la podemos aceptar en base a los siguientes puntos:

- 1) Los AGE se acumulan en los pacientes con IRC.
- 2) Los AGE y sus precursores reactivos inducen daño genómico.
- 3) Existe una relación directa entre los niveles de AGE en plasma y marcadores de daño genético.
- 4) Los pacientes con IRC muestran un elevado grado de daño en el DNA.

- 5) Tanto los AGE como los RAGE se expresan en las células tumorales.
- 6) La interacción AGE-RAGE participa en la actividad invasiva y la metástasis tumoral.
- 7) La incidencia de cáncer en los pacientes con IRC es más alta que en la población general; además, entre los pacientes que desarrollan un cáncer existe un mayor grado de daño genómico en los que padecen IRC, comparado con los que no la padecen.

1.4.4. Los productos de la lipoxidación avanzada (ALE)

Como se ha visto anteriormente, las proteínas no sólo se modifican por acción de carbohidratos sino también por la de los lípidos (Esterbauer *et al.*, 1991), dando como resultado los denominados productos finales de la lipoxidación avanzada, conocidos por sus siglas en inglés como ALE. Algunos de estos compuestos se indican en la **tabla 7** donde se indican también sus precursores.

Tabla 7. Relación de algunos de los AGE/ALE más conocidos, así como sus precursores.

AGE/ALE	Precursor	Referencia
Pentosidina	Carbohidrato	Miyata <i>et al.</i> , 1996a y 1997
Carboximetil-lisina	Carbohidrato, lípido, aminoácido	Miyata <i>et al.</i> , 1998a
Malondialdehído-lisina	Lípido	Miyata <i>et al.</i> , 1998a
Imidazolona	Carbohidrato	Takayama <i>et al.</i> , 1998
Dímero glioxal-lisina	Carbohidrato, lípido, aminoácido	Odani <i>et al.</i> , 1998
Dímero metilglioxal-lisina	Carbohidrato, lípido, aminoácido	Odani <i>et al.</i> , 1998

AGE: productos de la glicación avanzada (*advanced glycation end products*);

ALE: productos de la lipoxidación avanzada (*advanced lipoxidation end products*).

Los niveles de AGE y ALE aumentan concomitantemente en el plasma urémico; así, la presencia de CML en plasma, que es un compuesto AGE, está altamente correlacionada con la presencia de malondialdehído-lisina, que es un compuesto clasificado como ALE en los pacientes crónicos sometidos a HD

(Miyata *et al.*, 1998a). Esta observación apunta hacia una causa común de génesis de los AGE/ALE. Además, esta conclusión se apoya en los resultados de un estudio donde se encontró que la peroxidación lipídica y la glicoxidación incrementaban, con una estrecha relación entre si, en la matriz de colágeno de pacientes con IRC (Meng *et al.*, 1999).

1.5. Inestabilidad genómica en los pacientes con IRC

La insuficiencia renal terminal, también llamada enfermedad renal en fase terminal, se refiere al último estadio de la IRC (el 5) donde el paciente ya se encuentra sometido a un tratamiento renal sustitutivo (TRS) o en preparación para iniciarlo.

Diversos estudios han demostrado que los pacientes con IRT, tienen una incidencia incrementada de enfermedades malignas, comparados con la población general (Matas *et al.*, 1975; Giacchino *et al.*, 1985; Inamoto *et al.*, 1991; Iseki *et al.*, 1993; Teschner *et al.*, 2002). En un meta-análisis donde se consideraron un total de 15 estudios, se observó que en 10 estudios (72.484 pacientes con IRT) el riesgo relativo (casos de cáncer observados sobre casos de cáncer esperados) promedio fue de 7,6. En contraste, en los 5 estudios restantes (35.407 pacientes con IRT), el riesgo promedio fue de 0,98 (Marple y MacDougall, 1993). Se debe resaltar que en varios de los estudios donde no hubo un incremento en el riesgo de cáncer, algunos tipos de tumores, como linfomas y carcinomas del riñón, próstata, hígado y útero mostraron una prevalencia incrementada, comparada con la de la población en general. Por lo que respecta al cáncer de riñón, distintos trabajos han mostrado su mayor incidencia en pacientes con IRC. Así, en el estudio de Port *et al.* (1989) se observó un incremento 4 veces mayor de cánceres renales en los 4.161 pacientes con IRT del Registro Renal de Michigan. De la misma manera, en un estudio con una población japonesa, de 88.534 pacientes crónicos en HD, la incidencia de cáncer fue 41 veces mayor. Incrementos similares se han encontrado en otro trabajo donde se observaron incrementos de 3 a 6 veces

más tumores de células renales en pacientes bajo tratamiento con HD (Levine, 1992; Ishikawa, 1993).

Más recientemente se ha publicado un amplio estudio de colaboración internacional sobre incidencia de cáncer en pacientes con IRT en HD. Con el uso de los registros de diálisis de Estados Unidos, Europa y Australia/Nueva Zelanda se conformó una cohorte de 831.804 pacientes desde 1980 a 1994 y se comparó el número de casos observados de cáncer, con el de la población general. Dentro de un periodo medio de observación de 2,5 años (correspondiente a 2.045.035 pacientes año), se observaron un total de 25.044 cánceres primarios (se excluyeron tumores de piel no melanomas) comparados con 21.185 esperados. La ratio estandarizada de incidencia (REI), calculada restando los casos esperados de los observados, dió un promedio de 1,18. La prevalencia de cáncer mas alta en pacientes con IRC en HD se encontró en Australia/Nueva Zelanda (REI =1,8) seguida por Estados Unidos (REI =1,2) y Europa (REI = 1,1); en las tres cohortes, la mayor incidencia de cáncer se observó en pacientes jóvenes (<35 años) y, conforme incrementaba la edad, el RIE disminuía, con sólo un ligero incremento en el grupo de edad de mayores de 65 años (Maissonneuve *et al.*, 1999).

El riesgo incrementado de cáncer en pacientes con IRT en diálisis, demostrado en ese estudio, confirma y amplía el gran número de estudios con grupos menores de pacientes (Port *et al.*, 1989; Inamoto *et al.*, 1991; Iseki *et al.*, 1993; Pope *et al.*, 1994; Bucciatti *et al.*, 1996; Cuckovic *et al.*, 1996). Se debe destacar que la inclusión de pacientes con cáncer en el periodo de prediálisis (PD) hubiera incrementado aún más la prevalencia de cáncer. Sin embargo, en este estudio fueron excluidos un total de 44.866 pacientes (correspondientes a casi un doble incremento del número de pacientes con cáncer en diálisis) con diagnóstico previo de cáncer, o aquellos a los que su insuficiencia renal fue atribuida a enfermedades malignas o amiloidosis. Existe evidencia de que el riesgo de cáncer ya está favorecido en la fase previa a la IRT. En este estudio de colaboración internacional, destaca la alta incidencia de enfermedades malignas dentro del primer año de diálisis (comparado con los años siguientes), lo que indica la importancia del periodo de PD para el desarrollo de cáncer, ya

que la mayoría de tipos de cáncer tienen un periodo de latencia de varios años. (Heidland *et al.*, 2000).

Aunque los mecanismos patogénicos responsables del incremento en la incidencia de cáncer aun no han sido totalmente aclarados, algunos factores asociados directa o indirectamente con la insuficiencia renal y los regímenes terapéuticos aplicados en el tratamiento de estos pacientes podrían favorecer la transformación maligna o la formación de tumores, como podemos ver en la **tabla 8**

Tabla 8. Factores que favorecen la transformación maligna (Vamvakas *et al.*, 1998).

Mecanismos potenciales de transformación maligna en la IRT
Función deteriorada del sistema inmune
Disminución de la capacidad antioxidante, concomitante con una incrementada formación de especies reactivas de oxígeno
Exceso de la hormona paratiroidea y deficiencia de vitamina D3
Infecciones e inflamaciones crónicas
Medicamentos: terapia inmunosupresora previa, abuso de analgésicos, diuréticos y bloqueadores de canales de calcio
Acumulación de compuestos carcinogénicos (aminas heterocíclicas y nitrosodimetilamina)
Hipometilación
Tabaquismo
Factores relacionados con la diálisis
Mala reparación del DNA

1.5.1 Variaciones en la capacidad de reparación del DNA en la IRC

El mayor mecanismo de defensa contra el cáncer reside en la capacidad celular de reparación del daño al DNA (Culotta y Koshland., 1994), y esta aseveración general es válida para el caso de pacientes con IRC. Existen diversos trabajos que han tratado de relacionar el desarrollo de la IRC con alteraciones en la capacidad de reparación de las lesiones del DNA. Así, en el estudio de Vamvakas *et al.* (1996) se investigó la reparación del DNA en linfocitos aislados

de pacientes con IRC sometidos a HD con y sin cáncer, comparándola con controles sanos y con pacientes con carcinomas con una función renal normal. Como indicador de daño al DNA se consideraron los inducidos por la irradiación con luz UV (9 y 18 J/m²) observándose una baja reparación en el grupo de pacientes en HD y en el grupo de pacientes que desarrollaron un carcinoma durante su tratamiento en HD. En los pacientes con menos tiempo en HD (el de <3 meses y el de 3 a 12 meses) se observó una reparación incrementada del DNA, comparada con la de los controles, mientras que en los grupos de duración media en HD (60 meses) la reparación observada fue similar a la de los controles. Estos resultados son similares a los encontrados por Zevin *et al.* (1991) en pacientes sometidos a HD durante 45 meses. Otros estudios que demostraron una menor capacidad de reparación del DNA en pacientes con IRC no sometidos a HD son los de Friedman *et al.* (1988) y de Malachi *et al.* (1993). En un estudio más reciente Herman *et al.* (2008) se encontró que la capacidad de reparación disminuye (debido a estrés oxidativo) en los pacientes con IRC inmediatamente después de una sesión de HD.

Se conoce que el incremento agudo de los niveles de calcio en linfocitos inhibe la reparación del DNA *in vitro*, y en los pacientes urémicos la concentración celular de calcio es elevada, debido a el exceso crónico de la hormona paratiroidea y su habilidad para promover la entrada de calcio a las células (Massry, 1987). Este dato podría ayudar a entender la razón de la disminución de la capacidad reparadora observada en pacientes con IRC.

Por lo que respecta a los niveles de daño fijado, se ha encontrado que existe una mayor incidencia de cromosomas estructuralmente anormales y una mayor frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas en pacientes con IRC (Cengiz *et al.*, 1988; Buemi *et al.*, 2006; Pernice *et al.*, 2006). Utilizando el ensayo de MN se ha encontrado que existe una frecuencia significativamente mayor de MN en los pacientes con IRC sometidos o no a HD, comparada con la observada en una población control (Stopper *et al.*, 1999; Kobras *et al.*, 2006; Shupp *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2008). Otros estudios han encontrado que las frecuencias de MN son mayores en los pacientes con IRC bajo HD convencional que en los que están bajo HD diaria (Fragedaki *et al.*, 2005; Shupp *et al.*, 2008a).

Recientemente se ha demostrado que mediante la administración de ácido fólico y vitamina B12 se reduce la frecuencia de este biomarcador en pacientes con IRC, lo que indicaría que los incrementos de MN tal vez se deban a la reducción de la homocisteína, una de las toxinas urémicas que se encuentra elevada en la mayoría de estos pacientes (Shupp *et al.*, 2008b; Stopper *et al.*, 2008).

Una manera indirecta de medir alteraciones en la capacidad de reparar las lesiones del DNA, es la observación de incrementos significativos en los niveles de daño genómico, ya sea a nivel primario o fijado. Son diversos los estudios que han dado este enfoque a su trabajo. Estudios donde se determina el daño genómico midiendo las concentraciones de 8-OHdG, han encontrado que en los pacientes con IRC sometidos o no a HD los niveles de daño genómico son mayores que en controles (Tarn *et al.*, 2000; 2001 y 2002); Otros estudios con la misma técnica han medido el efecto de las infusiones de hierro que reciben los pacientes bajo HD, encontrado que los niveles de daño son mayores (con un efecto dosis dependiente) en los pacientes que reciben dichas infusiones durante la HD, respecto a los que no las reciben (Muller *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2008;). Así mismo, en un estudio, donde se midieron las concentraciones de 8-OHdG, y se utilizó el ensayo del cometa para medir los niveles de daño al DNA, se observó que la administración de vitamina E a pacientes PD y a pacientes en HD, reducía el daño en ambos grupos (Domenici *et al.*, 2005).

Mediante el ensayo del cometa (EC) se ha visto también una relación entre el daño al DNA en linfocitos de sangre periférica y el grado de severidad de la IRC (niveles de creatinina, pacientes prediálisis) o con la duración de tratamiento, en el caso de los que se encuentran en HD (Stopper *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios posteriores encontraron que la iniciación del tratamiento con HD no supone cambios en los niveles de daño genómico, sólo tendencia a disminuirlos (Kobras *et al.*, 2006; Scupp *et al.*, 2006). Otro estudio con el EC encontró que el daño disminuye después de 14 semanas de suplementación con vitamina E, y que no se hay una asociación con el tiempo en HD (Kan *et al.*, 2002). En un estudio con el EC se encontró que los niveles de daño genómico

aumentan inmediatamente después de una sesión de HD, pero que estos niveles disminuyen 48 horas después de la sesión de HD (Bagatini *et al.*, 2008). Por último, con respecto a los estudio con el EC, se ha realizado un estudio en nuestro grupo de investigación (Stoyanova *et al.*, 2009) donde se encontró que los niveles de daño genómico son mayores en los pacientes con IRC que en la población control y que son mayores en los pacientes bajo HD, comparados con los que aún no han iniciado tratamiento con HD; además, se encontró que dichos niveles de daño se asocian con la progresión (creatinina y ferritina) de la patología y disminuyen con el tiempo en HD.

Hay algunos estudios que evalúan el daño inducido en el DNA mitocondrial mostrado, que existen mayores niveles de daño en los pacientes con IRC comparados con los controles (Lim *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Finalmente, también existe un estudio donde se encontró que en pacientes con IRC, la longitud telomérica aumenta con el tiempo bajo tratamiento con HD (Boxall *et al.*, 2006).

Los resultados anteriores apuntan a que los pacientes con IRC poseen una menor capacidad de reparar el daño inducido en su DNA; por lo tanto, una manera de contrastar esta hipótesis consiste en inducir un determinado nivel de daño y medir el efecto final, una vez se hayan dejado actuar los mecanismos de reparación. Entre los distintos agentes que se pueden utilizar para inducir el daño en el DNA destaca la radiación ionizante.

Las radiaciones ionizantes (electromagnéticas o particuladas) son aquellas con energía, longitud de onda y frecuencia tales que al interaccionar con un medio le transfieren energía suficiente para desligar a un electrón de su átomo. En ese instante en el que el electrón se desprende del átomo al que pertenecía, se produce la ionización que es, por lo tanto, la formación de un par de iones, el negativo (el electrón libre) y el positivo (el átomo sin uno de sus electrones). La ionización producida por una radiación incidente que interacciona con la materia (inerte o viva) puede ser directa o indirecta. En el caso de la célula viva, las modificaciones sufridas por sus átomos y moléculas tienen importantes consecuencias a nivel biológico.

- La acción directa se produce cuando la RI interacciona con una célula y se producen ionizaciones y excitaciones en moléculas voluminosas como el DNA, RNA, enzimas, proteínas, etc., que también son conocidas como moléculas diana.
- La acción indirecta es cuando la interacción se produce con el medio (mayoritariamente agua) en el que están en suspensión las estructuras celulares (el citoplasma) produciendo radicales libres, siendo estos los que acaban interaccionando con la macromolécula diana.

La importancia de la acción sobre el medio reside en que, debido a que en la célula hay más cantidad de agua que en cualquier otro componente, la probabilidad de lesiones mediadas por estos mecanismos es mucho mayor que la de las lesiones directas sobre las moléculas diana. Además, la modificación radio-inducida puede producirse lejos del lugar de la interacción con la radiación, ya que los radicales libres pueden difundirse en el medio como mínimo hasta distancias de 40 Å, ya que su vida media es del orden de 10^{-5} s (Dubner *et al.*, 1995).

Los efectos que la RI tiene sobre el DNA son los siguientes: pérdida o cambios de bases, roturas de simple cadena (SSB) y roturas de doble cadena (DSB); y si estos daños no son reparados, dan lugar a efectos celulares como aberraciones cromosómicas, necrosis, apoptosis o iniciación del cáncer. La frecuencia relativa de aparición de aberraciones varía con la dosis total, la tasa de dosis y la transferencia lineal de energía (*LET: linear energy transfer*) de la radiación. Las roturas simples se producen sobretodo con radiaciones de baja LET y aumentan con la dosis. Las roturas dobles aumentan con la dosis y con la tasa de dosis, y predominan con las radiaciones de alta LET (Baverstock y Will, 1989).

Actualmente el sistema internacional de medidas utiliza como unidad de radiación absorbida al Grey, que equivale a la energía absorbida por kilogramo de sustancia irradiada, y es la unidad de medida utilizada en el presente estudio.

Una vez administrada una dosis de RI a linfocitos primarios, de sangre periférica, procedentes e distintos individuos, podemos obtener un gran abanico de efectos, desde individuos donde la dosis aplicada produce poco daño, a individuos que muestran elevados niveles de daño. A esta variación en su respuesta se le denomina radiosensibilidad.

1.6. Radiosensibilidad individual

La radiosensibilidad individual es una característica inherente al sujeto, se ha observado que un 5-7% de los pacientes sometidos a protocolos de radiación terapéutica desarrollan efectos adversos en los tejidos sanos, incluyendo radiotoxicidad aguda y/o tardía (con dosis inferiores a la dosis de tolerancia en tejidos sanos) e inducción de cáncer (Twardella y Chang-Claude, 2002). Se sugiere que la incidencia y severidad de estas reacciones está influenciada por la susceptibilidad genética a la radiación (Thierens *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1998; 1999; 2000; Baeyens *et al.*, 2002; Popanda *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2004; Lou *et al.*, 2004), aunque diversos factores relacionados con el paciente: estados de alteración de la microvasculatura (diabetes, senescencia, aterosclerosis) y alteraciones de la respuesta inmune (colagenopatías) pueden modificar la respuesta tisular a las radiaciones ionizantes. Esta susceptibilidad genética se asocia fundamentalmente con alteraciones en la capacidad de reconocer y/o reparar las lesiones inducidas por la RI.

En los últimos años ha aumentado el interés en la evaluación de la susceptibilidad genética en relación con la hipersensibilidad al riesgo carcinogénico y con la hipersensibilidad a los efectos deterministas de la RI. Probablemente estos dos tipos de hipersensibilidad coexistan en un número de situaciones, siendo la misma causa biológica (diferencias en la capacidad de reparación del DNA) la que puede conducir tanto a un riesgo aumentado de cáncer radioinducido, como a severos efectos deterministas de la radiación (Bourguignon *et al.*, 2005b).

Comúnmente se usan los linfocitos de sangre periférica para estudiar la radiosensibilidad (Slonina y Gasinska, 1997; Alsbeih *et al.*, 2000; Kizilian-Martel

et al., 2003; Dunne *et al.*, 2003; Bourguignon *et al.*, 2005a) siendo el ensayo de MN uno de los ensayos mas comunes, ya que es rápido y útil para estudiar la radiosensibilidad (Fenech, 2002; Ban *et al.*, 2004), pudiendo medir el daño cromosómico inducido de una manera mas fácil que la requerida para contar las aberraciones cromosómicas estructurales.

El ensayo de MN se está utilizado cada vez más para detectar el daño cromosómico inducido por la radioterapia (Mozdarani *et al.*, 2005). En pacientes con carcinoma cervical se ha encontrado que la frecuencia de MN inducidos *in vitro* en los linfocitos es mayor en pacientes que desarrollan reacciones cutáneas tisular después de la terapia con radiación, que aquellos que no presentan reacciones. Además, existe una correlación entre la frecuencia de MN y la severidad de estas reacciones (Widel *et al.*, 2003).

Sobre las ventajas del ensayo de MN en los estudios de radiosensibilidad cabría citar los estudios de Lou *et al.* (2004; 2008) donde se analizó la respuesta a la radiación en los linfocitos, mediante tres ensayos genéticos diferentes: MN, cometa y mutación génica en el gen *HPRT*, encontrándose que la diferencia entre pacientes con cáncer y controles se detectó únicamente con el ensayo de MN.

1.7. Inducción de daño genético y su detección.

La toxicología genética o la mutagénesis tienen como objetivo estudiar la inducción de mutaciones por agentes físicos, químicos y biológicos, identificar estos agentes y analizar sus interacciones y mecanismos de acción. Los estudios de mutagénesis enfocan su atención sobre niveles de exposición que no se consideran tóxicos, porque no causan efectos inmediatos identificables fácilmente, pero tienen un efecto sobre el DNA. En 1983 la Comisión Internacional para la Protección contra Mutágenos y Carcinógenos Ambientales estableció una definición que limita el uso del término genotóxico a aquellos agentes que causan daños en el material genético a dosis subtóxicas (ICPEMC, 1983).

Las alteraciones inducidas en el DNA, como las ocasionadas por las EROS, son el objeto de estudio de la toxicología genética, que se sirve de herramientas específicas para estudiar dichos efectos: los ensayos de genotoxicidad. Así, tenemos que los métodos utilizados en esta disciplina son amplios y variados, dependiendo de los objetivos que se deseen alcanzar. Como el objetivo, en la mayoría de los casos, es determinar si un agente en particular es capaz de inducir daño en el DNA, se han desarrollado ensayos para analizar las modificaciones en el DNA y para detectar las mutaciones antes y después de la exposición al agente de interés. Los ensayos de genotoxicidad se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*, y los ensayos pueden utilizar un amplio abanico de complejidad biológica abarcando desde bacterias, a cultivos de células eucarióticas, así como utilizando distintos animales destinados a experimentación, incluyendo mamíferos. Ningún ensayo por sí sólo tiene la capacidad de detectar todos los agentes genotóxicos, ni los distintos tipos de daño genético que se pueden generar, por lo que se hace necesario el empleo de un conjunto de ensayos que abarquen diferentes sistemas biológicos y marcadores de mutación; a este conjunto de pruebas se le denomina batería de ensayos de genotoxicidad, donde cada ensayo permite detectar efectos específicos, por lo que son denominados biomarcadores de efecto.

Los biomarcadores son una medida cuantitativa de una señal química, celular, molecular, inmunológica, genética o fisiológica, evento o estado biológico, que se pueda medir en el material biológico. Los biomarcadores son una herramienta útil para detectar la exposición a un agente genotóxico, y contribuyen a que se analice una situación más real ya que consideran la exposición general, que no sólo incluye el agente objeto de estudio, sino también el ambiente complejo en el que se encuentra.

Los biomarcadores se utilizan para detectar la existencia de una exposición y determinar sus consecuencias biológicas, como por ejemplo: un factor que cause una enfermedad o un factor que proteja contra una enfermedad, detectar los estados iniciales e intermedios de una enfermedad, realizar estudios más rápidos y precisos a nivel preclínico, relacionar la exposición individual a la historia particular de cada individuo, identificar a los

individuos sensibles de una población, y para fundamentar la decisión de intervenir tanto a nivel individual como ambiental (Peña *et al.*, 2001).

Según Albertini y colaboradores (1996), los biomarcadores se pueden dividir en tres grupos:

- Biomarcadores de exposición, detectan si el agente genotóxico ha penetrado en el organismo a diferentes niveles, localizando la presencia de agentes mutagénicos y/o carcinogénicos (o sus metabolitos) en tejidos y secreciones corporales. Si el compuesto ha penetrado y ha interactuado con el material genético, se puede detectar por la aparición de aductos en proteínas (albúmina y hemoglobina) y en el DNA, así como por la formación de intercambios entre cromátidas hermanas, lo que refleja una exposición primaria.
- Biomarcadores de efecto, miden el daño genético una vez que ya ha sido procesado por el organismo. Las lesiones en el DNA, una vez procesadas, pueden convertirse en cambios permanentes en las células (mutaciones). Como son efectos fijados, reflejan daños correspondientes a exposiciones pasadas, por lo que son útiles para detectar daño acumulativo. Si se quiere detectar daño cromosómico se pueden utilizar como biomarcadores de efecto temprano, ensayos citogenéticos, tales como el de aberraciones cromosómicas (AC), intercambios entre cromátidas hermanas o micronúcleos (MN), como es el caso de nuestro estudio.
- Biomarcadores de susceptibilidad, se basan en identificar aquellas diferencias interindividuales que hacen que un individuo sea más susceptible o responda de una manera diferente, con un mayor riesgo para su salud, frente a diferentes exposiciones ambientales. La capacidad de reparación del daño genético también está determinada genéticamente y aquellos individuos deficientes en los mecanismos de reparación sufrirán mayores niveles de daño genético irreversible, incluso frente a exposiciones de baja intensidad.

1.8. Los micronúcleos (MN)

Los micronúcleos (MN) son masas de cromatina que tienen forma de pequeños núcleos y que aparecen cerca del núcleo principal de las células interfásicas. Se pueden originar por la pérdida de fragmentos cromosómicos y/o cromosomas enteros durante la división celular, ya sea de manera espontánea o como respuesta a la acción de agentes clastogénicos y/o aneugénicos (Fenech y Morley, 1985). Las roturas cromosómicas darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos que, al no disponer de centrómero, no se incluirán en los núcleos hijos durante la división celular, al no poderse unir al huso mitótico en la anafase. Estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos. Si el daño genotóxico ha afectado a las proteínas del cinetocoro, al centrómero o al huso mitótico, lo más probable es que se produzca un retraso y por lo tanto un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, provocando que aquellos cromosomas rezagados se pierdan durante la anafase y se rodeen de membrana nuclear, como ocurre también con los fragmentos cromosómicos acéntricos, originando micronúcleos.

En la **figura 8** podemos observar la representación de una célula que, además de su núcleo, contiene dos micronúcleos.

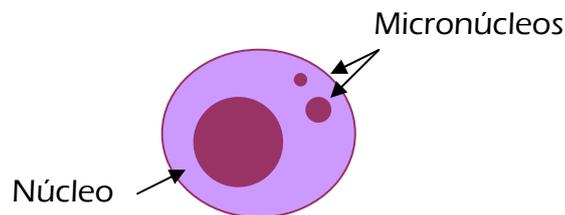


Figura 8. Célula interfásica mostrando dos micronúcleos.

1.8.1. El ensayo de micronúcleos

Teniendo en cuenta el origen de los micronúcleos, pronto se buscó una manera fácil de poderlos detectar y cuantificar, convirtiéndolos en biomarcadores de efecto genotóxico. En este contexto, la técnica de micronúcleos fue inicialmente desarrollada en 1975 por W. Schmid, y actualmente es una de las técnicas citogenéticas más utilizadas para evaluar el daño genético. Se utiliza tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, siendo los eritrocitos de médula ósea de ratón o de sangre periférica, las células con las que más se realiza. Desde 1983 éste es el ensayo *in vivo* más utilizado en la evaluación genotóxica de los productos químicos. Además, está incluido dentro de la batería de ensayos de genotoxicidad oficialmente validados (OECD, 1997). Según un estudio donde se analizó el número de trabajos publicados que utilizaron el ensayo de MN y los que utilizaron el ensayo de aberraciones cromosómicas, se observa que últimamente existe una marcada tendencia a utilizar el ensayo de MN en los estudios de genotoxicidad (Bonassi *et al.*, 2005).

1.8.1.1. Ventajas del ensayo de MN

La amplia difusión del uso del ensayo de MN se debe, sin duda, a sus múltiples ventajas. Algunas de éstas se enumeran a continuación.

- a) El ensayo de MN permite detectar diferentes tipos de lesiones:
- roturas de doble cadena del DNA.
 - roturas de cadena simple del DNA (mal reparadas o sin reparar). La mayoría de los MN derivan de la mala reparación de diferentes lesiones (Surrallés *et al.*, 1995), por lo que el ensayo de MN también se podría utilizar para evaluar la eficacia de la reparación.
 - Puentes nucleoplasmáticos, generados por la presencia de cromosomas dicéntricos.
 - Amplificación génica, que es el mecanismo por medio del cual el DNA amplificado es eliminado de las células. Se puede cuantificar al observar

la presencia de un MN que ha sido expulsado del núcleo pero aún está adherido a éste por un puente.

- Apoptosis, mediante la frecuencia de núcleos condensados (Kirsch-Volders *et al.*, 1997).
- b) Es un método preciso y confiable para la medición de daño genético, siendo también relativamente rápido y económico (Fenech, 2002).
- c) Se puede identificar el mecanismo de inducción de los MN utilizando técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y de esta manera identificar la región cromosómica que se ha perdido o roto.
- d) Al no requerir la observación cromosómica, permite trabajar con diferentes tipos celulares (células sanguíneas, células epiteliales de la mucosa bucal o nasal, espermatozoides, células uroteliales, etc.).
- e) Es posible valorar efectos meses después de que haya ocurrido la exposición (Lee *et al.*, 2002).

1.8.1.2. Inconvenientes del ensayo de MN

Como todo ensayo, el de MN tiene una serie de aspectos que han de tenerse en cuenta para evitar malas interpretaciones de los resultados obtenidos. Algunos de los puntos que se ha de tener en cuenta se presentan a continuación. Hay que resaltar, sin embargo que la mayoría de objeciones presentadas se podría también aplicar a otros ensayos.

- a) Durante el proceso de análisis de los resultados deben tomarse en cuenta factores de confusión como la edad y sexo (Migliore *et al.*, 1991), así como la tinción utilizada (Surrallés *et al.*, 1995).
- b) El tabaquismo, cuando se aplica el ensayo a monitoreo de poblaciones humana, podría ser en algunos casos un factor de confusión (Bonassi *et al.*, 2003).
- c) En algunos casos la variabilidad intraindividual puede alcanzar hasta un 67% atribuible al error experimental (Fenech y Neville, 1992).
- d) La persistencia relativamente baja de los MN en células con elevado índice de división, ya que los MN provienen de aberraciones

cromosómicas inestables y, por lo tanto, tienden a perderse con el tiempo (Tucker y Preston, 1996; Ramírez *et al.*, 1999).

- e) Las diferencias de protocolo con variaciones entre diferentes laboratorios son una importante fuente de variabilidad al comparar resultados (Bonassi *et al.*, 2001).
- f) Variabilidad en los criterios de recuento entre distintos laboratorios e incluso entre personal del mismo laboratorio, lo que representa el 45% de la variabilidad total (Bonassi *et al.*, 2001).

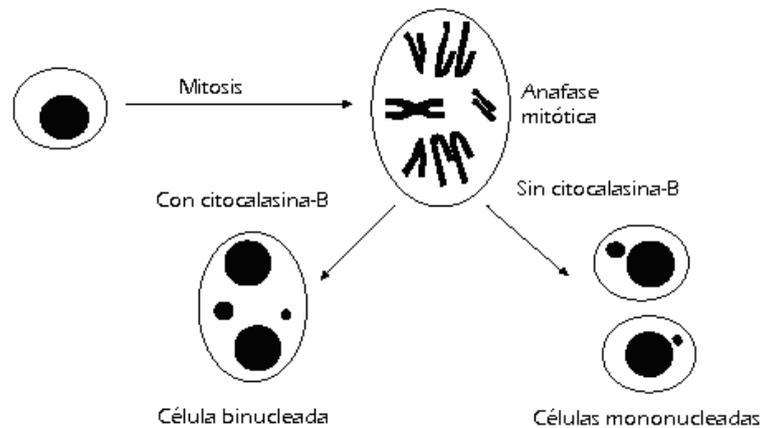
1.8.2. Ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos

La técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesta por primera vez por Countryman y Heddle en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica. Más tarde, en 1985, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley, consiguiendo señalar cuando una célula había sufrido una división mitótica; para ello desarrollaron la denominada técnica del bloqueo de la citocinesis (*CBMN: cytokinesis-block micronucleus*) cuyo fundamento se basa en la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B cuya función es impedir la citocinesis celular, bloqueando la polimerización de las fibras de actina, impidiendo la citocinesis sin afectar la división nuclear, lo que supone generar células con los dos núcleos hijos dentro del mismo citoplasma (binucleada).

En la **figura 9** se muestra la obtención de células binucleadas por el bloqueo con citocalasina-B.

La citocalasina-B es una molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*, que inhibe la polimerización de la actina, impidiendo la citocinesis al imposibilitar la creación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesario para la partición celular en telofase mitótica. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del

núcleo, por lo que origina células binucleadas que han sufrido una sola división (Fenech, 1993; 2000).



Formación de micronúcleos debido a la pérdida de un cromosoma entero y/o un fragmento cromosómico de tipo acéntrico en la anafase mitótica. El esquema muestra el bloqueo con citocalasina-B y la consecuente obtención de células binucleadas, sin el cual se observarían células mononucleadas con pérdida cromosómica, siendo imposible diferenciar si se trata de células madres o hijas (Fenech, 1993).

Figura 9. Obtención de células binucleadas por bloqueo con citocalasina-B.

En la **figura 10** podemos ver un esquema que muestra los distintos tipos de daño causados en células binucleadas debido a la interacción de un agente genotóxico.

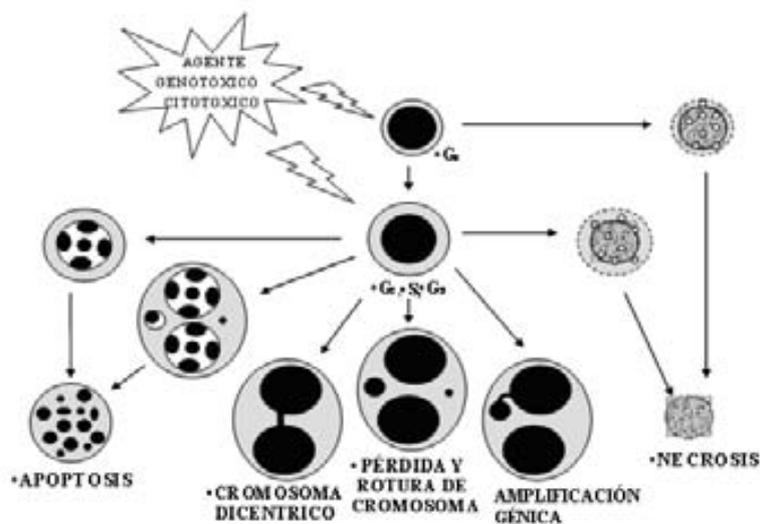


Figura 10. Daños al DNA y muerte celular, efectos que puede detectar el ensayo de micronúcleos (Fenech, 2002).

1.8.2.1. Factores que afectan a la frecuencia de MN en humanos

Existen diversos factores que pueden influir en la frecuencia basal de micronúcleos observada en humanos (Zalacain *et al.*, 2005). Estos los podemos ver en la **tabla 9**.

Entre los diversos factores que pueden influir en la frecuencia basal de MN; la edad ha sido ampliamente estudiada, relacionándose una mayor edad con un mayor índice de MN (Migliore *et al.*, 1991; Bonassi *et al.*, 2001; Bukvic *et al.*, 2001). En el caso del análisis del género, las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los hombres y el número de MN incrementa cuando se superan los 35 años de edad, se ha visto que este incremento se debe a una mayor frecuencia de MN originados por pérdida cromosómica.

Tabla 9. Factores que incrementan o disminuyen la frecuencia de MN

FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS	
LA INCREMENTAN	LA DISMINUYEN
Edad (>edad > MN)	Agentes antioxidantes
Género (> en mujeres)	Vitamina E y C
Presencia de homocisteína	β-caroteno
Déficit de folato y vitamina B12	Infusiones de ginseng y té
Procesos fisiológicos (menopausia, osteoporosis)	
Fármacos citostáticos (tratamientos antitumorales)	
Exposición a agentes tóxicos	

La presencia de homocisteína en plasma, junto al déficit de folato y de vitamina B12 también conduce a un incremento de la frecuencia basal de MN (Fenech, 1993; Fenech *et al.*, 1999; Fenech y Crott, 2002). En el caso de las mujeres, la entrada en la menopausia y el posible desarrollo de la osteoporosis se relacionan con un mayor índice de MN (Landi *et al.*, 2000). Otros estudios relacionan un descenso del número de MN al suplementar la dieta con agentes antioxidantes como la vitamina E, vitamina C, β-caroteno, ginseng e incluso infusiones de té (Xue *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2004).

Diversos estudios se han centrado en el estudio de los fármacos citostáticos utilizados en los protocolos antitumorales en pacientes con cáncer, cuya acción está dirigida a frenar la proliferación celular. La exposición reiterada a agentes citostáticos puede causar efectos adversos tales como mutaciones, inmunotoxicidad y cáncer debido a que pueden inducir daños genotóxicos y alterar los mecanismos de división en células que se multiplican rápidamente. El resultado de estos trabajos demostró que las combinaciones de fármacos utilizados incrementan de modo significativo el número de MN (Migliore *et al.*, 1991; Jagetia *et al.*, 2001).

Con respecto al efecto de los metabolitos tóxicos del tabaco, medido mediante el ensayo de MN, existe una gran controversia, ya que varios trabajos han demostrado que el hábito de fumar no se veía reflejado en la frecuencia de MN frente a grupos controles no fumadores (Barale *et al.*, 1998; Bukvic *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 2002). Al contrario, varias publicaciones han detectado diferencias entre grupos de fumadores y no fumadores. Así, en un estudio realizado en personas expuestas a bajas dosis de radiación, por su actividad laboral, se observaron frecuencias de MN significativamente incrementadas en el grupo de personas expuestas a radiación que fumaban, frente a los no fumadores expuestos (Maffei *et al.*, 2002). En un reciente estudio, en el que se incluyen 24 bases de datos implicadas en el proyecto HUMN, se ratificó la gran controversia y disparidad de los resultados con respecto al hábito fumador y su implicación en la formación de MN. La mayoría de los laboratorios demostraron que no existían diferencias entre el grupo de fumadores y no fumadores; un único laboratorio encontró diferencias significativas entre ambos grupos y otros dos relacionaron el hecho de ser fumador con una disminución significativa en la frecuencia de MN. Por último, la conclusión extraída por la mayoría de laboratorios fue que los fumadores habituales que consumían 30 o más cigarrillos/día y que no estaban expuestos a ningún otro agente tóxico externo manifestaban un incremento significativo en el número de MN; un estudio más reciente obtuvo las mismas conclusiones siendo el corte de consumo de tabaco el de 20 cigarrillos/día (Bonassi *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; De la Chica *et al.*, 2005).

II OBJETIVOS

La IRC es una patología que se asocia con una elevada incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares y se ha propuesto que los pacientes con IRC poseen un cierto grado de inestabilidad genética responsable, al menos en parte, de la patología.

Con esta premisa, la presente Tesis tiene por objetivo general determinar si en pacientes afectados con IRC, existen niveles anormales de daño genético y susceptibilidad genómica. Para cumplir este objetivo general, se han propuesto diferentes objetivos específicos, como pueden ser:

1. Determinar si la frecuencia de MN se asocia con la progresión de la enfermedad; para ello, a los pacientes con IRC se les ha clasificado de acuerdo al parámetro de filtrado glomerular (FG).
2. Determinar si en pacientes con IRC sometidos a diálisis, los niveles de daño genético (MN) son mayores que en los pacientes que no están bajo dicho tratamiento.
3. Determinar si hay una correlación entre el tiempo en HD y la frecuencia de MN.
4. Determinar si la población con IRC es más radiosensible que la población control, sometiendo a los linfocitos de los pacientes con IRC a una dosis de radiación de 0,5 Gy.
5. Determinar si la radiosensibilidad está relacionada con el grado de IRC, de acuerdo a su FG.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población estudiada

La población estudiada fue reclutada en la Fundación Puigvert de Barcelona (España) y consta de un total de 258 individuos, clasificados de la siguiente manera:

- 1) Una población de 201 pacientes con IRC, de los cuales:
 - 103 padecen la enfermedad, pero aún no están bajo HD, y
 - 98 están en el programa de HD convencional con membranas sintéticas de baja permeabilidad, de la Unidad de Hemodiálisis de esta Fundación. De los pacientes en HD, 33 fueron analizados por segunda vez, aproximadamente un año después.

- 2) Una población control de 57 voluntarios.

El estudio fue aprobado por la Comisión de Ética de la Fundación Puigvert, y cada paciente leyó y firmó un consentimiento informado en el momento de proporcionar la muestra de sangre. Mediante una encuesta realizada a cada voluntario y los historiales médicos de los pacientes, se obtuvo la siguiente información.

Características generales, tales como el género, la edad y el hábito tabáquico; desafortunadamente, en la encuesta a los pacientes con IRC no se ha pedido especificar cuantos cigarrillos al día consumen los fumadores, y no se cuenta con información acerca de este hábito en los controles.

Asimismo se obtuvieron características específicas de la población con IRC, como las causas de la enfermedad, el estadio de la IRC, en su caso, el tiempo en tratamiento con HD, el número de pacientes que ha recibido un trasplante, la frecuencia de patologías asociadas al desarrollo de la enfermedad, así como los medicamentos que toman para su control. Otro

aspecto que caracteriza a esta población es la administración de suplementos como parte del tratamiento nutricional, por lo que se obtuvo información acerca de los suplementos administrados. También se realizaron análisis bioquímicos en el laboratorio de Bioquímica y Hematología de la Fundación Puigvert y se cuenta con estos parámetros analíticos.

3.2. Obtención de las muestras

La extracción de sangre para los distintos parámetros analíticos y para el ensayo de MN fue de 5 mL. En el caso de los pacientes con IRC (no en HD) se realizó durante su revisión médica; en el caso de los pacientes en HD, se realizó antes de iniciar su sesión de hemodiálisis y, en el caso de los controles, se realizó al reclutarlos durante su visita (por diversas razones ajenas a la patología) a las instalaciones de la Fundación Puigvert.

Las muestras se almacenaron en tubos con heparina de sodio, se mantuvieron a temperatura ambiente y se trasladaron inmediatamente a los laboratorios de Grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y de Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona; donde fueron procesadas el mismo día de la extracción.

3.3. Ensayo de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos se realizó siguiendo el protocolo estandarizado del Grupo, tal como se describe a continuación:

Se agregaron 0,5 mL de sangre completa a 4,5 mL de medio RPMI 1640 con 15% de suero bovino fetal (desactivado con calor), 1% fitohemaglutinina, 1% glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina. Después de una incubación de 44 horas a 37 °C, se agregó citocalasina B a una concentración final de 6 µg/mL para bloquear la citoquinesis; los cultivos se incubaron durante otras 28 horas (tiempo total de cultivo: 72 hrs), se cosecharon los cultivos y se agregó gota a gota 5 mL de solución hipotónica (KCl 0,075 M a 4 °C),

posteriormente se fijó tres veces con 5 mL de metanol: ácido acético en proporción 3:1, agregando de 3 a 4 gotas de formaldehído al 37% en el segundo lavado. Posteriormente se gotearon las células y se llevó a cabo la tinción con Giemsa. Se contaron 1000 células binucleadas por individuo, donde se analizó el número de MN y el de células binucleadas con MN (BNMN). Se evaluó la citotoxicidad contando el número de núcleos en 500 células y se determinó la proliferación celular utilizando el índice CBPI (Surrallés *et al.*, 1995). La **figura 11** muestra el esquema que representa el protocolo utilizado en el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica.

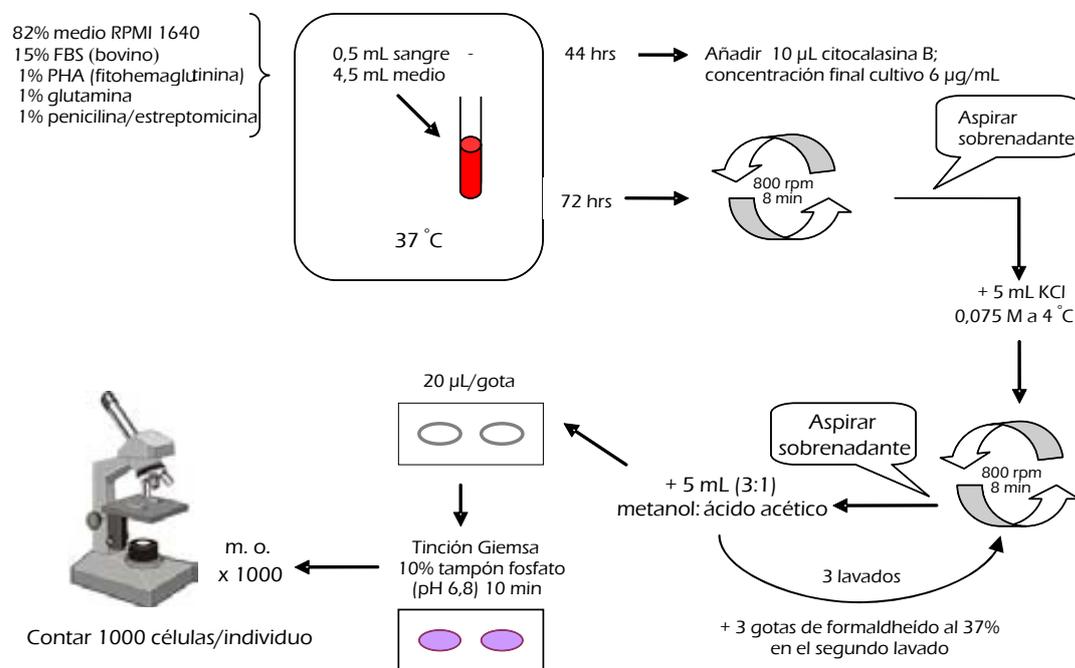


Figura 11. Protocolo del ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica.

3.3.1 Criterios para la determinación de los MN

Como ya se ha mencionado, ésta es una de las partes que representa la mayor variabilidad en la obtención de resultados ya que depende mucho del criterio utilizado por la persona que va a contar. Es por esto que se han descrito criterios de selección para reconocer tanto las células en las que se

debe realizar el recuento, como criterios para seleccionar los MN que presenten las características necesarias para ser reconocidos como tales y que el recuento realizado sea fiable y objetivo (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2003).

Se han utilizado los criterios de selección de las células binucleadas (BN) y de los MN definidos por el proyecto HUMN (Bonassi *et al.*, 2001) y se describen de forma resumida en la **tabla 10**.

Tabla 10. Criterios definidos por el HUMN-project para la selección de células binucleadas y micronúcleos en células humanas.

Criterios para células binucleadas	Criterios para micronúcleos
El citoplasma debe distinguirse claramente	El diámetro oscila entre 1/16-13/3 de la medida del diámetro del núcleo principal
Las membranas citoplasmática y nuclear han de estar intactas	No refractarios
Los núcleos han de tener: - similar grado de condensación de la cromatina	Intensidad de tinción similar a los núcleos principales
- Igual tamaño, forma (ovalados) y patrón de tinción	Forma similar a los núcleos de la célula binucleada
- Pueden estar unidos por puentes nucleoplasmáticos	No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada
- Pueden tocarse pero no solaparse	Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada pero no solaparse con ellos
Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis	

Los linfocitos en cultivo no se dividen de forma sincronizada, de manera que se pueden encontrar en un mismo cultivo células mono, bi y multinucleadas, así como células en vías de apoptosis y necrosis. Por ello es necesario conocer también las características de las células en vías de apoptosis y necrosis para que sean eliminadas del recuento, ya que sólo deben incluirse las células viables. Las células en vías de apoptosis se caracterizan por presentar cromatina condensada, que en etapas tempranas de la apoptosis puede manifestarse como cromatina marginal y que más tarde, conforme avanza el proceso apoptótico, culmina en la fragmentación

del material nuclear, quedando éste disperso en el citoplasma y reflejándose en una tinción más oscura con respecto a la habitual.

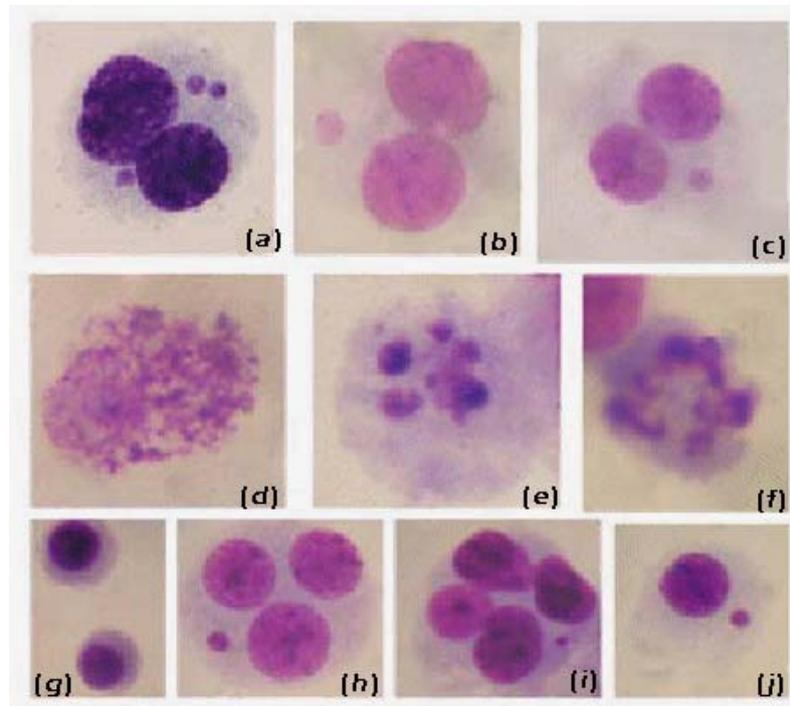


Figura 12. (a), (b), (c) células binucleadas portadoras de micronúcleos; tanto las células como los micronúcleos cumplen los criterios de selección definidos por el comité internacional de micronúcleos humanos; (d), (e) y (f) distintos estadios de células en vías de apoptosis; (g), (h) e (i) células con distintos índices de división nuclear; (g) células mononucleadas; (h) célula trinucleada portadora de micronúcleos; (i) célula tetranucleada portadora de micronúcleos. (j) célula mononucleada con micronúcleos.

En el caso de fenómenos necróticos, las células que los sufren muestran citoplasmas pálidos, presencia de vacuolas que se localizan principalmente en el citoplasma, daño evidente en la membrana citoplasmática con núcleos intactos en etapas tempranas de necrosis; en cambio las células en estados avanzados del proceso necrótico muestran pérdida del citoplasma y daño irregular en la membrana nuclear, con sólo una parte de la estructura nuclear intacta (Fenech, 2000). En la **figura 12** podemos ver fotografías con ejemplos de células que cumplen con los criterios definidos en la tabla anterior, células en vías de apoptosis y células con distintos índices de división celular.

3.4. Determinación de la radiosensibilidad

3.4.1. Irradiación de los cultivos de linfocitos

De las 4 réplicas por individuo que se prepararon de acuerdo al protocolo, se irradiaron dos réplicas, es decir 2 tubos de 5 mL con 0,5 mL de sangre completa y 4,5 mL de medio. La exposición a 0,5 Gy de radiación gamma se llevo a cabo mediante un irradiador modelo IBL 437 C de *Shering CIS Bio International*, (que utiliza el Cesio 137 como fuente de radiación) en la Unidad Técnica de Protección Radiológica de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se introdujo un cilindro giratorio cargado con la gradilla de muestras al irradiador, donde al iniciar el proceso el cilindro gira 180° a 18 rpm para proporcionar una dosis homogénea. El tiempo de exposición varía de acuerdo a la vida media del Cesio 137, por lo que se calcula cada vez que se realiza una exposición. Durante el periodo de nuestro muestreo, para una dosis de 0,5 Gy se requirió de aproximadamente 5 segundos de exposición. Posteriormente a la irradiación, se colocó el total de las muestras en incubación, para continuar con el protocolo de MN.

3.4.2. Parámetros de radiosensibilidad.

Al irradiar las muestras se obtienen dos parámetros que miden el efecto de la radiación:

- a) El incremento por la radiación: las BNMN generadas por efecto de la radiación.

$$\text{BNMN } 0,5 \text{ Gy} - \text{BNMN}$$

- b) El incremento relativo: el número de veces que ha incrementado la frecuencia de MN basal por los efectos de la radiación.

$$\text{BNMN } 0,5\text{Gy} - \text{BNMN} / \text{BNMN}$$

3.5. Análisis estadístico

- La descripción y el análisis estadístico de este estudio se realizaron empleando el programa SPSS, versión 17.0.
- Las pruebas de normalidad a las variables citogenéticas, se realizaron mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.
- La variable de BNMN se normalizó mediante el Log10.
- Se realizaron 2 análisis multifactoriales, modelo lineal general: univariante, con las variables citogenéticas de BNMN y con BNMN 0,5 Gy como variables dependientes.
- Se realizaron regresiones lineales de la variable citogenética con diversas variables continuas, como: los valores de creatinina, el FG, el tiempo en HD y la edad.
- Para las comparaciones entre poblaciones, entre grupos, y para muestras dependientes (antes y después de un año en HD) se realizaron pruebas *t* de *Student*.

Todas las comparaciones positivas se han basado en un nivel de significación estadística del 95%.

IV RESULTADOS

4.1. Estadística descriptiva de la población

La **tabla 11** muestra la descriptiva de las poblaciones que se han utilizado en este estudio, una población con IRC formada por 201 pacientes, y su correspondiente población control formada por 57 personas.

Ambas poblaciones tienen proporciones de género similares con un 58% de hombres en el grupo control y 61% en los pacientes, diferencias que son claramente no significativas ($P = 0,70$).

En cuanto a las medias de edad, éstas sí que son significativamente diferentes ($P < 0,001$), siendo más joven la población control ($\bar{X} = 52$ años) respecto a los pacientes ($\bar{X} = 65$ años). También existen diferencias de edad entre el grupo en HD respecto al que se encuentra en una fase menos avanzada de la patología ($P = 0,002$). Con respecto a la distribución de fumadores, desafortunadamente no existen datos para la población control, pero entre los subgrupos con IRC, éstas son similares ($P = 0,393$). En cuanto al índice de masa corporal la población control y la de IRC muestran valores equivalentes ($P = 0,147$), aunque al comparar los dos subgrupos con IRC, encontramos que la población de pacientes en HD tiene un IMC significativamente menor ($P = 0,015$).

Ambas poblaciones se han clasificado de acuerdo al estadio según el filtrado glomerular de sus miembros. La clasificación se hizo en 5 grupos donde el 1 y el 2 corresponde a los asintomáticos (normales) y el 5 corresponde a los pacientes en la fase terminal de la enfermedad. Hay que remarcar que el estadio 5 corresponde a tener un FG < 15 mL/min $1,73$ m² y en él se encuentran 110 pacientes, de los cuales 12 (11%) se preparan para la HD pero aún no la han iniciado, mientras que los 98 (89%) restantes han sufrido un mayor descenso en el FG (8-10 mL/min) y son los que corresponden al 100% de la población en tratamiento con HD. Otro aspecto importante respecto al estadio de la IRC, es que al analizar los resultados, nos

encontramos que entre los individuos reclutados como controles existe un 23% que presentan un grado 2 de IRC, lo cual se puede atribuir a la edad y es congruente con los datos epidemiológicos, que indican que gran parte de la población adulta padece inicios de IRC en la fase asintomática. Los estadios 3 y el 4 son los que predominan en los pacientes con IRC que aún no pasan a HD.

En cuanto al periodo de tiempo que llevan en HD los pacientes seleccionados, podemos ver que existe un rango muy amplio, ya que se cuenta con pacientes que llevan desde un mes hasta quienes llevan 21,5 años en HD. Sin embargo, cabe mencionar que el 50% de la población dializada está dentro de un rango de 2 a 5 años y que después de los 11 años sólo hay 3 pacientes (con 15, 21 y 21,5 años). Se asume que pocos pacientes llegan a cumplir tantos años de tratamiento debido a la alta mortalidad característica de esta población, o a que reciben un trasplante. Asimismo, podemos ver que el 28% de esta población ha recibido un trasplante y aún así requieren de la HD, dado que dicho trasplante no resultó eficaz.

En la **tabla 11** se indica también la incidencia y distribución de algunas patologías comunes como hipertensión, dislipemia, patologías cardiovasculares, diabetes y cáncer. Aunque en la población control se pueden detectar algunas de estas patologías, sus frecuencias son significativamente menores que en los pacientes con IRC, excepto para la diabetes que está presente en proporciones similares en ambas poblaciones ($P = 0,557$). Entre los subgrupos con IRC (sin HD y HD), la presencia de diabetes ($P = 0,779$), hipertensión ($P = 0,902$), dislipemia ($P = 0,471$) y cáncer ($P = 0,713$) es similar, aunque en el caso de la enfermedad cardiovascular, ésta es significativamente más frecuente en el subgrupo de HD ($P = 0,013$). Estas patologías están ampliamente ligadas; recordemos que la hipertensión y la diabetes se consideran factores de iniciación en la IRC y, junto con la dislipemia, son también las principales causas de la EVC.

Tabla 11. Descriptiva de las poblaciones estudiadas.

DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIONES ESTUDIADAS				
Características	Controles	Pacientes con IRC		
		Total	sin HD	HD
N	57	201	103	98
Hombres (%)	58	61	60	60
Mujeres (%)	42	39	40	38
Edad \pm S.E	52,11 \pm 1,97	65,06 \pm 0,94	67,66 \pm 1,11	62,33 \pm 1,49
Índice de masa corporal	27,29 \pm 0,93	25,94 \pm 0,34	26,78 \pm 0,45	25,14 \pm 0,49
Tabaquismo (%)	ND	55	52	58
% en c/estadio de IRC 1/2/3/4/5	77/23/0/0/0	0/2,5/23,4/19,4/54,7	0/4,9/45,6/37,9/11,7	0/0/0/0/100
Meses en HD \pm S.E (min-máx)	N/A	N/A	N/A	42,05 \pm 4,80 (1-259)
Transplantados (%)	N/A	13	0	28
PATOLOGIAS (%)				
Hipertensión	28	89	89	89
Dislipemia	9	60	62	57
ECV	0	51	43	60
Diabetes	16	25	26	24
Cáncer	0	21	23	21
Suplementos (%)				
Vitamina D	0	38	31	45
Ácido fólico	0	24	6	44
L-carnitina (Carnicor)	0	25	0	52
Vitaminas B y C	0	17	1	35
Hierro (Venofer)	0	54	93	12
Medicamentos (%)				
Eritropoyetina	0	55	16	96
*IECA ; ARA -II	7	64	84	43
*Estatina	5	61	66	55
*Sevelamer (Renagel)	0	31	0	63

N/A: no aplica; **ND:** no disponible; **IMC:** índice de masa corporal; **IECA:** inhibidor de la enzima de conversión, bloquea la conversión de angiotensina a una forma más activa. Se utiliza en el tratamiento de la hipertensión, la insuficiencia cardíaca congestiva y para frenar la progresión de la insuficiencia renal crónica, sobretodo cuando se asocia a proteinuria. **ARA-II:** antagonistas del receptor de la angiotensina II, fármaco que también actúa inhibiendo el sistema renina-angiotensina; **Estatina:** fármaco usado para disminuir el colesterol; **Sevelamer:** fármaco secuestrador de fosfato, usado para el control de la hiperfosfatemia.

La dislipemia (alteración del metabolismo de lípidos) está vinculada a la diabetes, al hipotiroidismo y a la obesidad patológica. Hay que resaltar que la patología cancerosa está presente en un 21% de la población con IRC, lo que

es congruente con la bibliografía, ya que los pacientes con IRC tienen un mayor riesgo de cáncer que la población general.

Recordemos que como parte del tratamiento de la IRC los pacientes reciben suplementos nutritivos. Aparte del hierro, que se suministra fundamentalmente al grupo prediálisis, el resto de suplementos se suministra a la población bajo HD, la vitamina D, ácido fólico, así como las vitaminas B y C y la L-carnitina, son suplementos que toman exclusivamente los pacientes en HD. Este último, es un nutriente responsable del transporte de ácidos grasos al interior de las mitocondrias, su fuente principal son las carnes rojas y su deficiencia disminuye la producción de energía y aumento de la masa del tejido adiposo. Según los cuestionarios, los individuos de la población control no toman ningún suplemento.

Aparte de los suplementos nutritivos, que compensan las deficiencias causadas por la IRC, los pacientes reciben tratamientos crónicos con distintos fármacos. En la tabla se indican aquellos más usuales como son la eritropoyetina, los inhibidores del sistema renina-angiotensina, la estatina y los controladores de la hiperfosfatemia. Todos estos fármacos se aplican a prácticamente todos los pacientes, aunque hay algún individuo control que recibe tratamientos con algunos de ellos.

La eritropoyetina (EPO) se usa como parte del tratamiento de la anemia y contribuye a mejorar la calidad de vida de los pacientes bajo HD, y es precisamente en este grupo en el que se encuentra mayormente subministrada. Cabe mencionar que la dosis de EPO aplicada a cada paciente puede variar significativamente desde los 20 hasta los 120.000 mg/mes.

Los inhibidores del sistema renina-angiotensina: el IECA (inhibidor de la enzima de conversión angiotensina) y los ARA-II (antagonistas del receptor de la angiotensina II), se administran fundamentalmente a la población que aún no empieza la HD. Éstos se utilizan en el tratamiento de la hipertensión, la insuficiencia cardíaca congestiva, así como para frenar la progresión de la insuficiencia renal crónica, sobretodo cuando ésta se asocia con proteinuria.

La estatina, que es un fármaco usado para disminuir el colesterol, se administra en un porcentaje elevado de pacientes con IRC, aunque con una frecuencia similar entre ambos subgrupos.

Finalmente, el sevelamer (principio activo del fármaco Renagel), es un compuesto que previene la absorción del fosfato y se utiliza para el control de la hiperfosfatemia. Hasta el momento el sevelamer no está indicado en pre-diálisis puesto que puede producir acidosis metabólica y es por esto que lo vemos administrado exclusivamente al grupo de HD (a un 63% de ellos).

Las causas que originan la IRC pueden ser muy variadas y en la **tabla 12** se indican aquellas que afectan a los pacientes de nuestra población. Como podemos ver existe un elevado porcentaje que corresponde a causas no filiadas, con un 25% en el total de la población.

Tabla 12. Etiología de la población con IRC estudiada

Causas (%)	Insuficiencia renal crónica		
	Total	sin HD	HD
N	201	103	98
No filiada	24,9	23,3	26,5
Nefroangioesclerosis	19,9	24,3	15,3
Glomerulopatías	14,9	9,7	20,4
Diabetes	12,9	12,6	13,3
Nefritis intersticial crónica	10,0	16,5	3,1
Poliquistosis renal	7,5	7,8	7,1
Enfermedad vasculorrenal	5,0	3,9	6,1
Otras	5,0	2,0	8,0

De las causas atribuibles, tenemos en primer lugar la nefroangioesclerosis con un 20%. Ésta se refiere a la necrosis de las arteriolas renales, como consecuencia de las complicaciones de la hipertensión. A menudo se asocia con otros factores de riesgo cardiovascular como el

aumento del colesterol y triglicéridos, y el aumento del ácido úrico o la glucosa en la sangre.

Como segundo lugar tenemos las glomerulopatías, con una incidencia mayor en el subgrupo de HD (21%). Se refiere a las enfermedades renales que afectan fundamental o inicialmente a los glomérulos. Posteriormente pueden verse implicadas las demás estructuras de la nefrona, es decir, tubos e intersticio.

La diabetes se encuentra en tercer lugar de las causas atribuibles, con un 13%. La nefritis intersticial crónica es un grupo de enfermedades que afectan los túbulos renales y el intersticio con una relativa conservación de las estructuras glomerulares y vasculares, en esta población su incidencia representa un 10% de las causas de la IRC. La poliquistosis renal (7%) es una enfermedad hereditaria generalmente autosómica dominante, en la que se forman quistes en los riñones, haciendo que éstos se agranden. El 10% restante se atribuye a otras enfermedades diversas, incluyendo la enfermedad vasculorrenal (5%).

En la **tabla 13** se exponen los parámetros analíticos medidos en las poblaciones estudiadas.

Los parámetros analíticos sanguíneos son una herramienta muy importante, tanto para el diagnóstico como para el control de la progresión de la IRC y el efecto de los fármacos empleados para tratar las complicaciones asociadas; además, se utilizan para verificar la eficiencia del tratamiento con HD y asimismo, asignar la frecuencia de sesiones de HD. En general todos los valores caen dentro del rango considerado como normal con la excepción de los valores de proteína C reactiva, homosisteína y folato que se encuentran elevados en los pacientes con IRC. Hay que recordar que estos pacientes reciben tratamientos para regular aquellos desequilibrios causados por la patología.

Tabla 13. Analítica sanguínea de las poblaciones estudiadas.

Parámetros	Rangos ideales	Controles MEDIA ± E.T.	Insuficiencia renal crónica			
			Total MEDIA ± E.T.	sin HD		HD MEDIA ± E.T.
				MEDIA ± E.T.	MEDIA ± E.T.	
Hemoglobina (g/L)	M:120-160; H:140-180	143,8 ± 1,99	129,4 ± 1,26	134,97 ± 1,78	123,13 ± 1,53	
Glucosa (mmol/L)	4,2 - 6,4	5,83 ± 0,23	5,81 ± 0,15	6,36 ± 0,17	5,19 ± 0,25	
*HbA1C (%)	< 6	4,48 ± 0,52	4,53 ± 0,15	4,85 ± 0,20	3,92 ± 0,2	
Colesterol (mmol/L)	3,0 - 5,7	4,96 ± 0,16	4,34 ± 0,08	4,74 ± 0,11	3,89 ± 0,10	
*LDL colesterol (mmol/L)	< 3,36	1,47 ± 0,08	1,27 ± 0,35	1,44 ± 0,05	1,09 ± 0,04	
*HDL colesterol (mmol/L)	> 1,55	2,58 ± 0,16	2,39 ± 0,60	2,64 ± 0,08	2,12 ± 0,08	
Triglicéridos (mmol/L)	0,5 - 2,0	1,37 ± 0,21	1,46 ± 0,05	1,45 ± 0,06	1,48 ± 0,09	
Albumina (g/L)	35 - 50	44,13 ± 0,63	40,92 ± 0,28	41,93 ± 0,43	39,83 ± 0,34	
Calcio (mmol/L)	2,2 - 2,6	2,35 ± 0,29	2,31 ± 0,01	2,33 ± 0,01	2,28 ± 0,02	
Fósforo (mmol/L)	1,0 - 1,5	1,08 ± 0,02	1,31 ± 0,03	1,15 ± 0,03	1,49 ± 0,05	
Producto calcio-fósforo (mmol ² /L ²)	< 4,44	2,5 ± 0,11	3,16 ± 0,09	2,70 ± 0,09	3,42 ± 0,12	
PTH (ng/L)	sin IRC: < 40 con IRC: 150-300	65,24 ± 6,81	186,6 ± 12,1	152,42 ± 10,17	223,56 ± 22,14	
Proteína C reactiva (mg/L)	< 10	1,68 ± 0,48	11,26 ± 1,63	7,07 ± 1,09	14,96 ± 2,88	
Homocisteína (µmol/L)	< 15	ND	26,79 ± 1,11	19,46 ± 0,74	31,58 ± 1,57	
Vitamina B12 (pmol/L)	148 - 433	ND	38,23 ± 15,21	329,55 ± 15,82	420,82 ± 23,06	
Folato (nmol/L)	160 - 700	ND	1034 ± 56,56	831,42 ± 65,72	1189,13 ± 82,41	
Hierro sérico (µmol/L)	9 - 27	ND	12,36 ± 0,49	14,37 ± 1,06	11,52 ± 0,49	

ANALÍTICA SANGUÍNEA DE LAS POBLACIONES (parte 2)					
Parámetros	Rangos ideales	Controles	Insuficiencia renal crónica		
			Total	sin HD	HD
		MEDIA ± E.T.	MEDIA ± E.T.	MEDIA ± E.T.	MEDIA ± E.T.
Ferritina (µg/L)	15 – 200	108,0 ± 40,7	266,1 ± 21,3	196,85 ± 34,98	306,18 ± 26,18
Capacidad total de fijación del hierro (µmol/L)	HD > 200 45 - 66	ND	41,67 ± 0,93	50,72 ± 1,59	37,85 ± 0,88
*IST (%)	> 20	ND	30,59 ± 1,18	28,69 ± 1,96	31,28 ± 1,43
Ácido úrico (µmol/L)	M: 90-360; H: 150-480	13,2 ± 5,49	397,06 ± 8,45	414,04 ± 9,62	359,13 ± 15,68
Urea (mmol/L)	2,5 - 6,5	5,99 ± 0,28	N/A	15,26 ± 0,65	N/A
*PRU (%)	> 70	ND	N/A	N/A	70 ± 0,70
*Flujo HD "KtV"	> 1,3	N/A	N/A	N/A	1,50 ± 0,29
*PAS (mmHg)	Sanos y HD < 140 pre-HD < 125	ND	137,15 ± 1,49	133,18 ± 2,15	139,78 ± 1,98
*PAD (mmHg)	Sanos y HD < 90 en pre-HD < 75	ND	77,58 ± 0,99	74,34 ± 1,45	79,41 ± 1,32
Proteinuria (mg/24hrs)	< 200	240 ± 120	N/A	940 ± 150	N/A
Fibrinógeno (mmol/L)	2,5 – 4,5	ND	4,53 ± 0,13	4,62 ± 0,14	4,26 ± 0,35

HbA1C: hemoglobina glucosilada; **LDL colesterol:** colesterol por lípidos de baja densidad; **HDL colesterol:** colesterol por lípidos de alta densidad; **IST:** índice de saturación de transferrina; **PRU:** porcentaje de reducción de urea; **Kt/V:** Aclaramiento de urea del dializador multiplicado por tiempo de diálisis dividido por el volumen de distribución de la urea [agua corporal total del paciente]; **PTH:** hormona paratiroidea; **PAS:** presión arterial sistólica; **PAD:** presión arterial diastólica; **Fibrinógeno:** glucoproteína involucrada en la coagulación, principal determinante de viscosidad y flujo sanguíneo.

Respecto a la hemoglobina, en la IRC se vigila especialmente sus niveles bajos ya que indican diversas patologías como: anemia, principalmente por un déficit en la síntesis de eritropoyetina debido a la enfermedad renal, desnutrición (deficiencia de hierro, folato, vitamina B6 y B12), sobrehidratación y destrucción de los glóbulos rojos, entre otras.

La glucosa y la hemoglobina glucosilada (HbA1C), indican los niveles medios de glucosa en sangre y se analizan periódicamente para detectar y controlar la diabetes *mellitus*.

Las alteraciones lipídicas (como la dislipemia) son muy comunes en la IRC, aumentando el riesgo coronario y de arteriosclerosis, por lo que es necesario analizar periódicamente el colesterol total, el colesterol por lípidos de baja densidad (LDL) conocido también como colesterol malo, el colesterol por lípidos de alta densidad (HDL) conocido como colesterol bueno y los triglicéridos.

La albúmina es la proteína de mayor concentración en la sangre y se analiza para evaluar la posible presencia de enfermedades del riñón o del hígado, o bien que el cuerpo no absorba bien suficientes proteínas. En los pacientes con IRC se determina para valorar el estado nutricional o déficits secundarios a la pérdida de proteínas en la orina.

La hormona paratiroidea interviene en la regulación del metabolismo del calcio y del fósforo. El déficit de esta hormona produce hipocalcemia (niveles bajos de calcio en sangre) que puede conducir a la tetania; el aumento de la secreción de paratohormona provoca hipercalcemia. El hiperparatiroidismo secundario (HPTS) es una de las complicaciones más graves asociadas a la insuficiencia renal crónica en sus fases avanzadas. Este trastorno metabólico se produce por un desequilibrio en los niveles de la hormona paratiroidea y en los niveles de calcio y fósforo en el organismo, por esto es importante el monitoreo de estos parámetros. En la población sana se observa que los valores de la HTA están ligeramente por encima de lo ideal en

una población sana, esto se puede atribuir a una deficiencia de vitamina D y/o aumento de lípidos en la sangre.

La proteína C reactiva se produce en el hígado y su nivel se eleva cuando hay inflamación en todo el cuerpo, también puede determinar el riesgo de cardiopatía. En la población bajo HD este parámetro se encuentra elevado debido a la inflamación crónica característica de estos pacientes.

El folato, también conocido como ácido fólico, es una vitamina B que es esencial para una buena salud. Específicamente, puede ayudar a reducir los riesgos de padecimientos del corazón y apoplejía al disminuir el nivel de homocisteína. Con niveles altos, la homocisteína puede dañar las arterias coronarias o facilitar que las células coagulantes de la sangre se agrupen y formen un coágulo. Esto puede aumentar sus riesgos de infarto o de derrame cerebral. El folato trabaja con las vitaminas B6 y B12 para ayudar a disminuir los niveles de homocisteína. La homocisteína se encuentra elevada en la población en HD y, por esta razón se administra folato a los pacientes como parte del tratamiento para disminuirla.

Perfil férrico: el hierro se analiza para advertir la presencia de anemia y controlar su tratamiento. La ferritina es una proteína que almacena hierro, así que mide indirectamente los depósitos de hierro en sangre. Se encuentra elevada en la población bajo HD, probablemente porque es un reactante de fase aguda que se eleva en la inflamación o debido a la administración de complementos de hierro. El hierro es transportado en la sangre adherido a la proteína llamada transferrina y el índice de saturación de transferrina (IST) y la capacidad total de fijación del hierro miden la capacidad de dicha proteína para transportar hierro en la sangre, generalmente cuando esta capacidad es más alta de lo normal, las reservas de hierro en el cuerpo están bajas.

El ácido úrico por encima de lo normal (hiperuricemia) puede deberse a diversos factores como: acidosis, diabetes, gota, hipoparatiroidismo, leucemia, alcoholismo. La urea (que se encuentra incrementada en la población que aún no pasa a HD) se analiza para valorar la función renal en los pacientes

con IRC. El Kt/V y el porcentaje de reducción de urea (PRU) se analizan para evaluar la eficacia de cada sesión de HD y así, determinar la frecuencia y duración de las sesiones semanales.

La presión arterial elevada (mal controlada) se ha asociado a una progresión más rápida de la enfermedad renal hasta el estadio 5 de la insuficiencia renal; por lo tanto, se debe controlar de forma intensiva (hasta valores $>125/75$ mmHg) para intentar frenar la progresión de la enfermedad renal.

Hay que distinguir la presión arterial sistólica, que corresponde al valor máximo de la tensión arterial en sístole (cuando el corazón se contrae) y se refiere al efecto de presión que ejerce la sangre eyectada del corazón sobre la pared de los vasos, de la presión arterial diastólica, que corresponde al valor mínimo de la tensión arterial cuando el corazón está en diástole o entre latidos cardíacos.

La proteinuria (que se encuentra elevada en la población que no está bajo tratamiento con HD) es otro parámetro importante que mide la cantidad de proteína excretada en la orina durante 24 hrs. Una proteinuria inferior a 150-200 mg/24hrs se considera fisiológica, pero la proteinuria superior puede corresponder a daño glomerular o tubular. En los pacientes con IRC la proteinuria elevada se asocia a una progresión más rápida de la enfermedad, por ello se administran fármacos inhibidores del sistema renina-angiotensina, que actúan a nivel de la hemodinámica renal para disminuir la proteinuria; un buen control de la presión arterial también ayuda a disminuir la pérdida de proteínas en orina.

Por último, los niveles elevados de fibrinógeno en plasma parecen asociarse con mayor riesgo de alteraciones cardiovasculares, porque podría promover estados protrombóticos o de hipercoagulación. En la **tabla 13** podemos ver que estos niveles están elevados en la población que no está bajo tratamiento con HD.

4.2. Daño genético medido con el ensayo de MN

Por lo que respecta a los niveles de daño genético observados en nuestro estudio, en la **tabla 14** se indican los valores citogenéticos globales obtenidos, clasificados tanto por el número total de MN, como por el de células binucleadas con MN (BNMN). Estos valores se indican para los controles y para los pacientes con IRC, separando a los pacientes que reciben tratamiento con HD de la población que no está en HD. Como se puede observar las frecuencias de MN y de BNMN son mayores en los pacientes que en los controles y ambas diferencias son estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Cuando la comparación se lleva a cabo entre pacientes, se observa que los mayores niveles de daño se encuentran en los pacientes sometidos a hemodiálisis pero estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas para ninguno de los valores citogenéticos evaluados.

Tabla 14. Variables citogenéticas para las poblaciones estudiadas

Variables citogenéticas	Controles		Pacientes con insuficiencia renal crónica					
	n	Media \pm E. T.	Total		sin HD		HD	
			n	Media \pm E. T.	n	Media \pm E. T.	n	Media \pm E. T.
MN								
Hombres	33	6,18 \pm 0,98	122	10,07 \pm 0,65	62	9,05 \pm 0,85	60	11,13 \pm 0,98
Mujeres	24	8,92 \pm 0,95**	79	14,71 \pm 1,42*	41	14,63 \pm 1,91*	38	14,79 \pm 2,14
Total	57	7,33 \pm 0,71	201	11,90 \pm 0,70***	103	11,27 \pm 0,95	98	12,55 \pm 1,04
BNMN								
Hombres	33	5,58 \pm 0,77	122	9,38 \pm 0,59	62	8,45 \pm 0,77	60	10,33 \pm 0,87
Mujeres	24	8,63 \pm 0,94**	79	13,38 \pm 1,24*	41	13,56 \pm 1,74*	38	13,18 \pm 1,78
Total	57	6,86 \pm 0,62	201	10,95 \pm 0,62***	103	10,49 \pm 0,86	98	11,44 \pm 0,88
CBPI								
Hombres	33	1,61 \pm 0,02	122	1,52 \pm 0,15	62	1,53 \pm 0,02	60	1,51 \pm 0,02
Mujeres	24	1,70 \pm 0,32	79	1,50 \pm 1,16	41	1,50 \pm 0,25	38	1,52 \pm 0,03
Total	57	1,65 \pm 0,30	201	1,51 \pm 0,01***	103	1,52 \pm 0,15	98	1,51 \pm 0,02

La *t* de *student* se ha realizado con las variables normalizadas mediante log10.

En cuanto al CBPI, que indica la capacidad proliferativa de los linfocitos, podemos ver que es significativamente menor ($P < 0,001$) en los pacientes que en los controles, y que entre los dos tipos de pacientes es similar.

En cuanto a las diferencias por género, podemos ver que las mujeres presentan valores significativamente más altos en los valores de MN y BNMN, y esto se observa tanto en la población control, como en la de IRC (global) y en el subgrupo de pacientes sin HD. Este es un resultado esperado, dado que es ya conocido que las mujeres presentan una incidencia mayor de MN, posiblemente debido a una mayor incidencia de problemas en la segregación cromosómica.

4.2.1 Pruebas de normalidad de las variables citogenéticas

Aunque algunos autores encuentran que la frecuencia de los MN sigue una distribución normal, en nuestro caso sólo la población control muestra una distribución normal en los parámetros de MN y BNMN, pero los pacientes no presentan una distribución normal para ambos parámetros. En la **tabla 15** podemos ver las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para los parámetros citogenéticos, donde podemos observar que las variables de MN y BNMN no cumplen los criterios de normalidad, y como con la transformación logarítmica de los valores se logra obtener una distribución normal.

Tabla 15. Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov

Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov				
Parámetros	Controles		Pacientes con IRC	
	MN	BNMN	MN	BNMN
Media	7,33	6,86	11,90	10,95
Desviación típica	5,36	4,70	9,95	8,75
Sig. asintot (bilateral)	0,200	0,146	0,0002	0,0004
Transformación con log10				
Media	0,730	0,711	0,949	0,920
Desviación típica	0,380	0,367	0,344	0,332
Sig. asintot (bilateral)	0,146	0,138	0,376	0,275

En las **figuras 13 y 14** se aprecian los efectos de la transformación en las distribuciones de MN y BNMN para controles y pacientes, respectivamente.

Aunque tanto la frecuencia de micronúcleos (MN) como la de células binucleadas con micronúcleos (BNMN) presentan un comportamiento similar, todos los análisis estadísticos se han llevado a cabo utilizando el parámetro BNMN, ya que consideramos que tiene una mayor relevancia biológica.

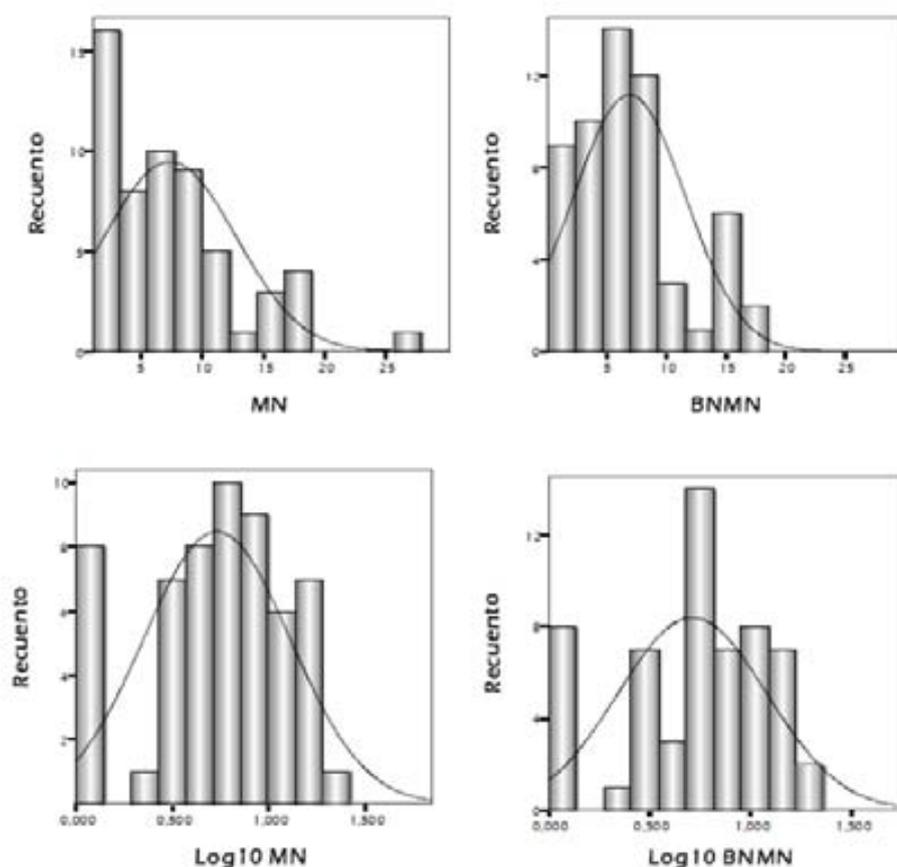


Figura 13. Distribución de los valores de MN y BNMN para la población control antes y después de la transformación con log10.

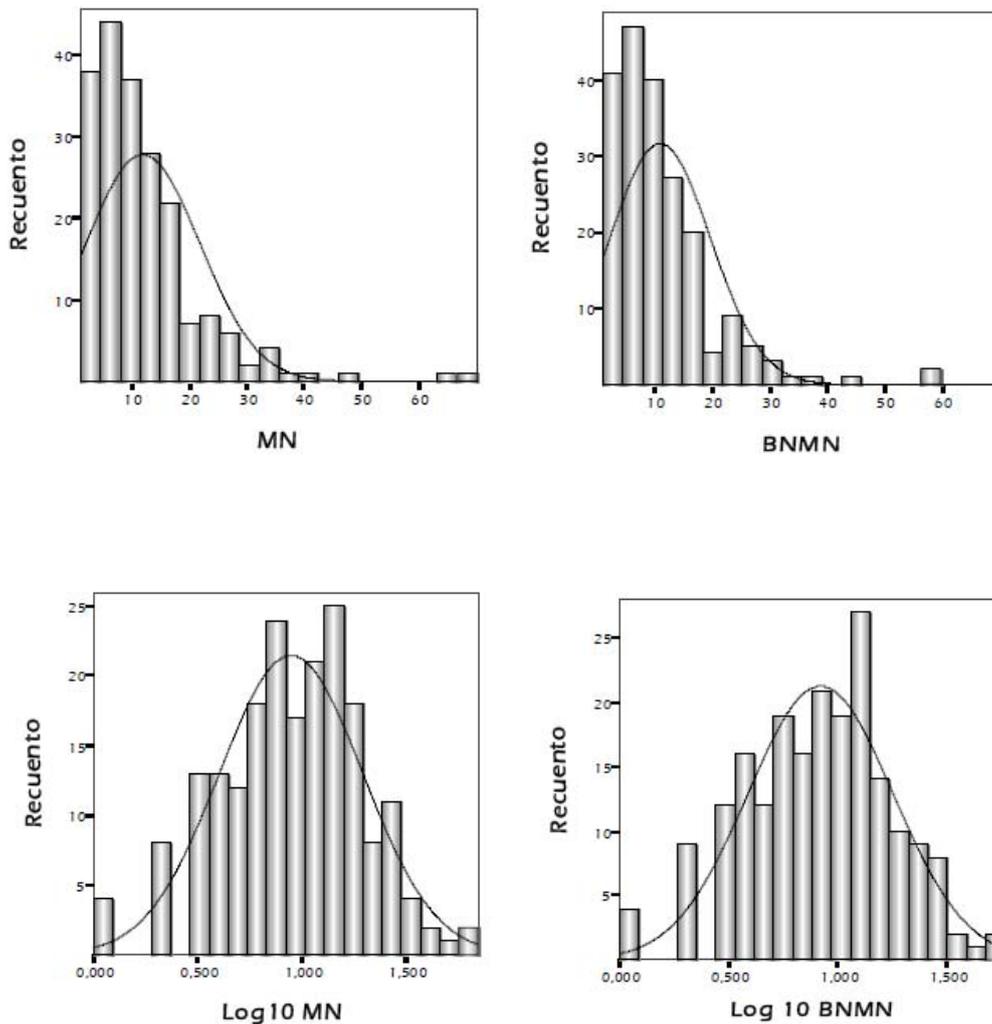


Figura 14. Distribución de los valores de MN y BNMN para la población de pacientes con IRC antes y después de la transformación con log10.

4.2.2 Análisis multifactorial.

Dado que el parámetro BNMN, como cualquier otro que mide daño genético, puede estar influenciado por distintos factores de confusión, el análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante un análisis univariante multifactorial, para detectar aquellos factores que modulan la expresión de la frecuencia de BNMN. Este análisis queda reflejado en la **tabla 16**, donde se aprecia que, además del estatus control / paciente y el género, que ya se habían detectado en los resultados generales, la incidencia de cáncer y la edad han mostrado ser también factores involucrados en la expresión de los MN.

Tabla 16. Modelo lineal general con Log10 BNMN como variable dependiente

Factores	F	Sig.
Modelo corregido	9,718	< 0,0001
Control o IRC	7,351	0,007
Género	14,552	0,0001
Edad	4,643	0,032
Cáncer	3,691	0,056
R ² = 0,135; R ² corregida = 0,121		

A continuación se evalúan estos factores junto a otros que, aunque no mostraron un efecto importante en el análisis univariante, son de interés general ya que distintos estudios han mostrado un posible papel en la expresión del daño genético.

4.3. Relación entre daño genético y la IRC

Respecto al efecto que tiene la patología en los niveles de daño, la **tabla 17** muestra las diferencias observadas en la frecuencia de BNMN entre pacientes y controles. Como se puede apreciar estas diferencias son altamente significativas.

Tabla 17. Diferencias en cuanto a BNMN entre controles e IRC.

Población	n	BNMN media ± E. T.	P
Control	57	6,86 ± 0,62	0,00005
IRC	201	10,95 ± 0,62	

Los niveles de creatinina por si solos, indican el grado de IRC, en la **figura 15** podemos ver la regresión entre el daño genético y los valores de creatinina (disponibles para controles y pacientes que no están bajo HD), donde se observa también una correlación significativa ($P < 0,05$).

Otra manera de visualizar la relación entre el daño genético y la IRC es utilizando el parámetro de FG para realizar una regresión entre ambos factores, para toda la población, y ésta la podemos ver en la **figura 16**, donde

se observa una correlación significativa ($P < 0,05$) con la progresión de la enfermedad; es decir, mientras menor es el FG, mayor es la frecuencia de BNMN.

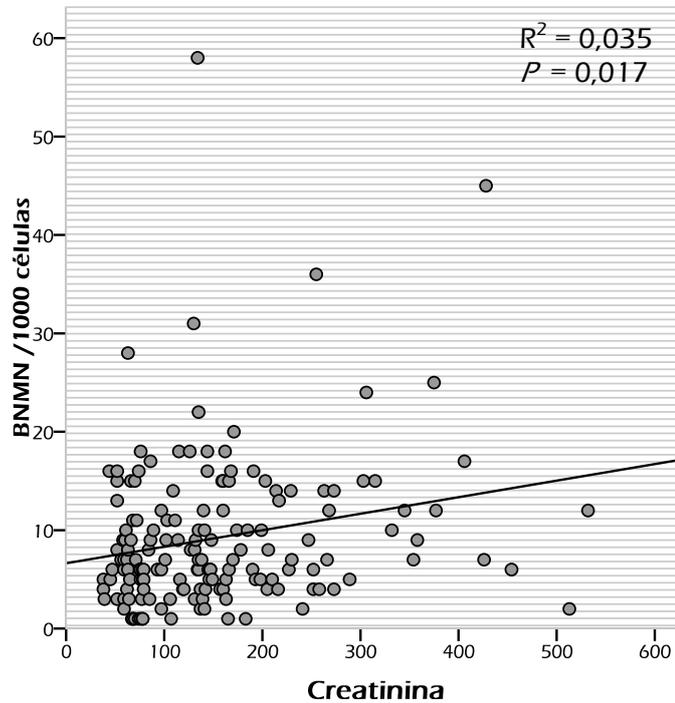


Figura15. Regresión entre las BNMN y la creatinina (controles e IRC sin HD).

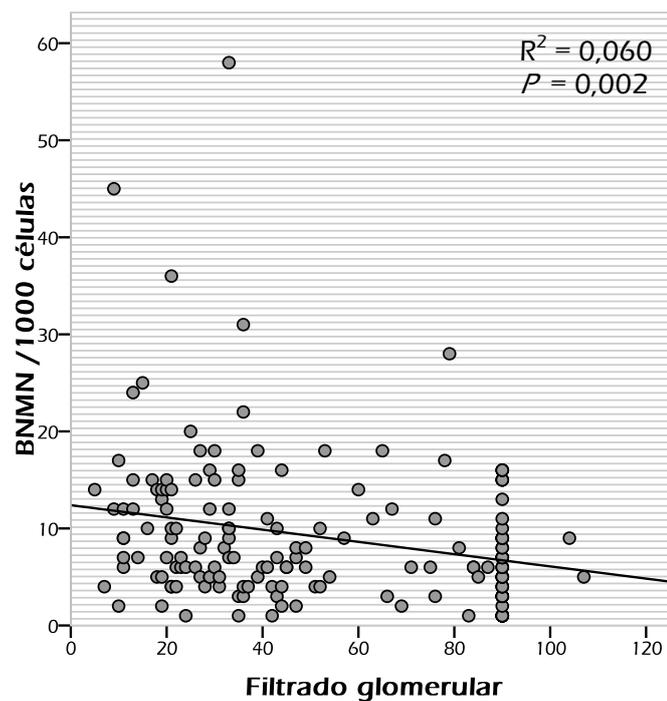
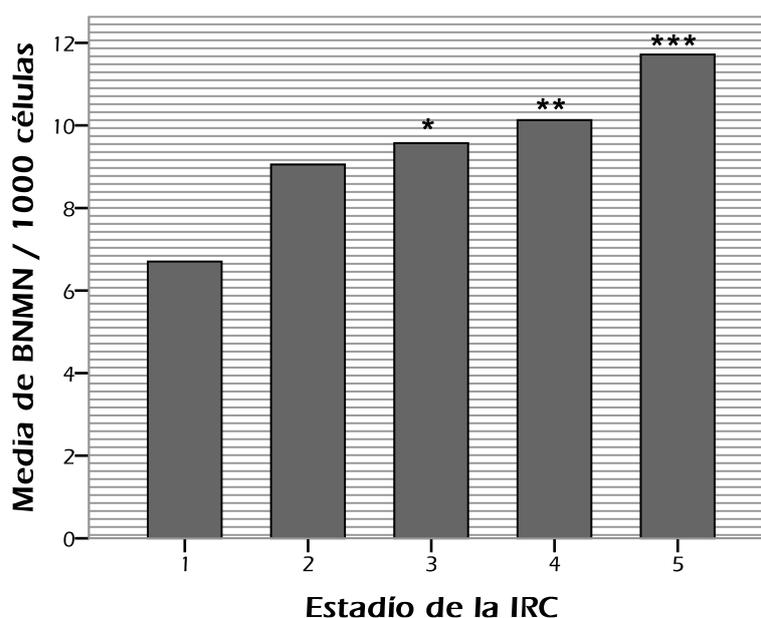


Figura16. Regresión entre daño genético y el FG (en la población total).

También se puede ver esta correlación estratificando el total de la población en función del estadio de la IRC. Así, en la **figura 17** podemos ver los niveles de daño genético (BNMN) en cada estadio donde, comparando el primer estadio con el resto, se encontraron diferencias significativas con los estadios 3 ($P=0,05$), 4 ($P<0,05$) y 5 ($P<0,05$).



$P < 0,05$ *, $< 0,001$ ** y $< 0,0001$ *** respecto al estadio 1

Figura 17. Gráfico de valores de BNMN en cada estadio de la IRC.

Dado que los estadios 1 y 2 ($FG > 60$ mL/min $1,73$ m²) se pueden considerar como normales ya que es una fase asintomática de la enfermedad, y en estos grupos se encuentran los controles, se optó por agruparlos, y como en el estadio 5 se encuentran tanto pacientes prediálisis como pacientes bajo HD, se separó al grupo bajo HD. Esto se puede apreciar en la **figura 18**.

Al hacer la comparación estadística no se encontró una diferencia significativa ($P = 0,126$) entre el estadio 3 y el grupo que comprende el 1 y 2; tampoco se encontró una diferencia significativa entre los pacientes en la fase terminal de la IRC, es decir el estadio 5 respecto a los tratados con HD ($P = 0,375$) a pesar de la aparente menor frecuencia de BNMN en los pacientes

bajo HD. Cabe mencionar que el grupo de estadio 5 que aún no pasa a HD está formado por sólo 12 pacientes, comparado con los 98 ya en HD, lo que podría explicar que la diferencia no sea significativa.

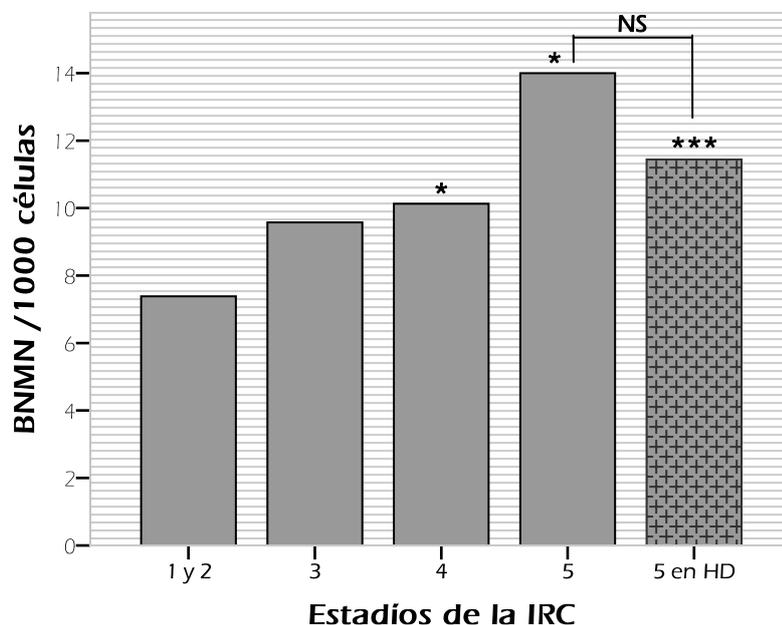


Figura 18. Daño genético de acuerdo al estadio de IRC, y la población en HD
 $P < 0,05$ * y $< 0,0001$ *** respecto al grupo 1 y 2; NS: no significativa.

4.4. Efectos del tratamiento con HD

Dado que los pacientes sometidos a HD muestran unos niveles de daño inferiores a los pacientes que también están en el último estadio de la IRC, pero que aún no están sometidos al tratamiento con HD, parece interesante analizar como el tratamiento de diálisis afecta la frecuencia de daño genotóxico. Para ello, se ha llevado a cabo un análisis de regresión entre el tiempo en HD y las frecuencias de BNMN.

Estos resultados se muestran en la **figura 19**, donde se observa que los niveles de daño tienden a disminuir a lo largo del tiempo en HD, aunque esta tendencia no es estadísticamente significativa ($P = 0,192$). Hemos de tener en cuenta que en nuestra población son pocos los pacientes con periodos de

tiempo mayores a 11 años en HD, y esto puede ser debido a que, o bien reciben un trasplante con éxito, o a la alta mortalidad de esta población.

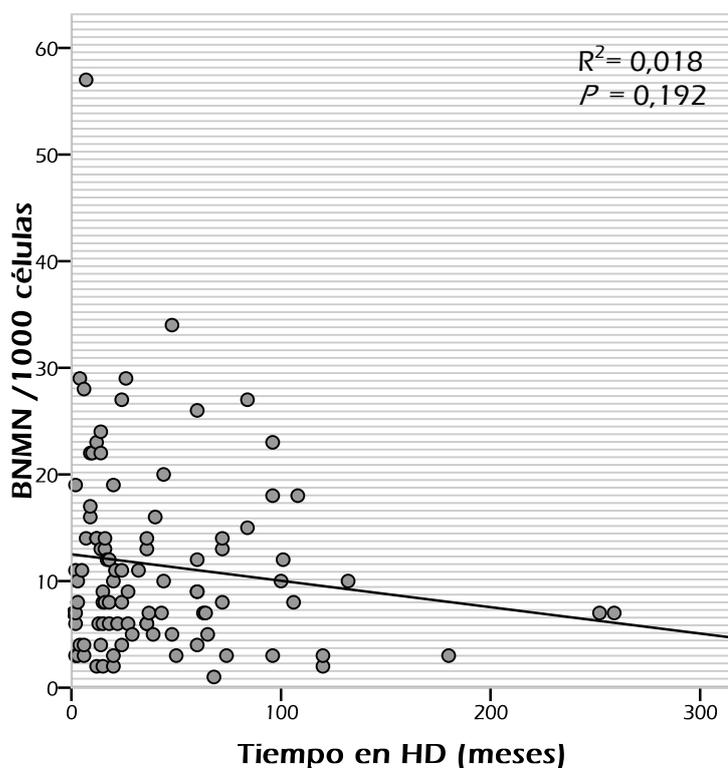


Figura 19. Daño genético de acuerdo al tiempo en HD.

4.4.1. Efecto de un año bajo HD

Otra manera de ver el efecto del tratamiento bajo HD consistió en hacer un segundo muestreo a 33 pacientes (de la población bajo HD) aproximadamente un año después. Como podemos ver en la **tabla 18** los valores de BNMN observados después de un año en HD son inferiores con respecto al primer muestreo.

Tabla 18. Prueba de *t* para muestras relacionadas: efecto de 1 año en HD

Prueba <i>t</i>			
Pacientes en HD	<i>n</i>	BNMN media ± E. T.	<i>P</i>
1er muestreo	33	10,88 ± 1,05	
2do muestreo (1 año después)	33	8,27 ± 1,08	0,060

Aunque estas diferencias no llegan a ser significativas ($P = 0,060$) si que ratifica la tendencia observada en el análisis de regresión.

Una manera gráfica de ver esta tendencia hacia la disminución del daño se observa en la **figura 20** donde podemos ver los resultados individualizados para los pacientes objeto de estudio. Los individuos se han colocado de acuerdo a los valores de BNMN en la primera muestra (color gris); como se ve, en sólo 9 de los 33 pacientes se encontraron valores de BNMN mayores en el segundo muestreo (en color negro), los otros 24 muestran que después de un año, sus niveles de BNMN disminuyeron.

Hay que señalar que en este segundo muestreo, también se les realizaron los análisis bioquímicos pertinentes, sin que se encontraran diferencias significativas entre estos parámetros.

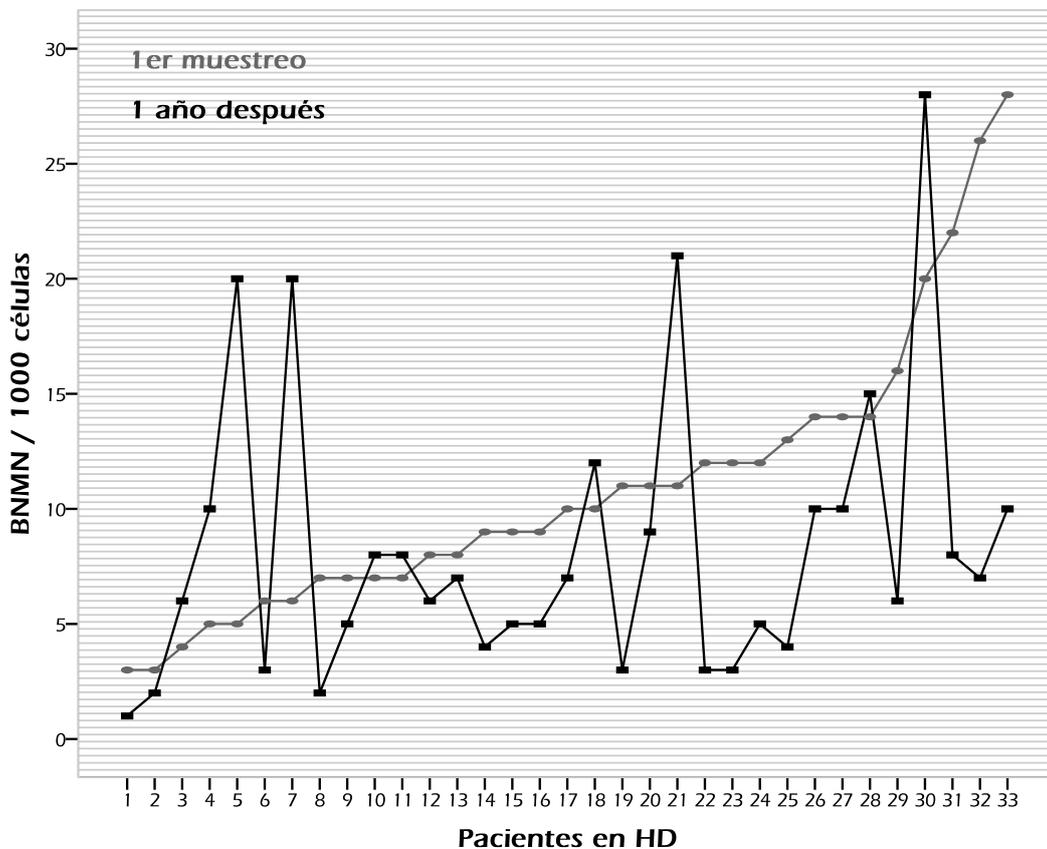


Figura 20. Gráfico del efecto individual de 1 año bajo HD en 33 pacientes.

4.5. Factores de confusión

4.5.1. Género

Por lo que respecta al género, éste es un factor de confusión para los MN ampliamente conocido y en nuestro estudio refleja lo establecido por la bibliografía, ya que las mujeres tienen una media significativamente mas alta de BNMN que los hombres; esto lo podemos ver tanto en la **tabla 14** desglosado para los distintos grupos de población, como en la **tabla 19** donde se analiza este efecto en la población total.

Tabla 19. Prueba de *t*: efecto del género sobre BNMN

Género	n	BNMN media ± E. T.	<i>P</i>
Hombres	155	8,57 ± 0,51	0,001
Mujeres	103	12,27 ± 0,99	

4.5.2. Edad

Otro de los factores de confusión para los MN es la edad y, aunque en nuestro estudio la población consta de poca variabilidad en cuanto a la edad, dado que los pacientes son comúnmente de edad avanzada, en el modelo lineal general resultó ser un factor significativo ($P = 0,032$) para las BNMN. Para analizar el efecto de la edad sobre la frecuencia de BNMN se realizó una regresión lineal en la población total (N=258) la cual se expresa en la **figura 21**. Según los valores de la regresión, la frecuencia de BNMN tiende a incrementar de manera significativa con la edad.

Para ver si la edad está correlacionada con la progresión de la IRC, se clasificó a la población de acuerdo a su estadio de IRC. En la **figura 22** podemos ver la gráfica que muestra la media de edad en cada estadio, observándose que hay una progresión en la edad, en función del estadio 1, 2, y 3, pero no en los últimos estadios, lo que podría indicar dos distintas progresiones entre los pacientes con IRC. Unos que desarrollan la patología

de manera rápida, alcanzando los niveles 4 y 5 a una edad relativamente temprana, respecto a otros pacientes que tendrían un desarrollo de la enfermedad más lento.

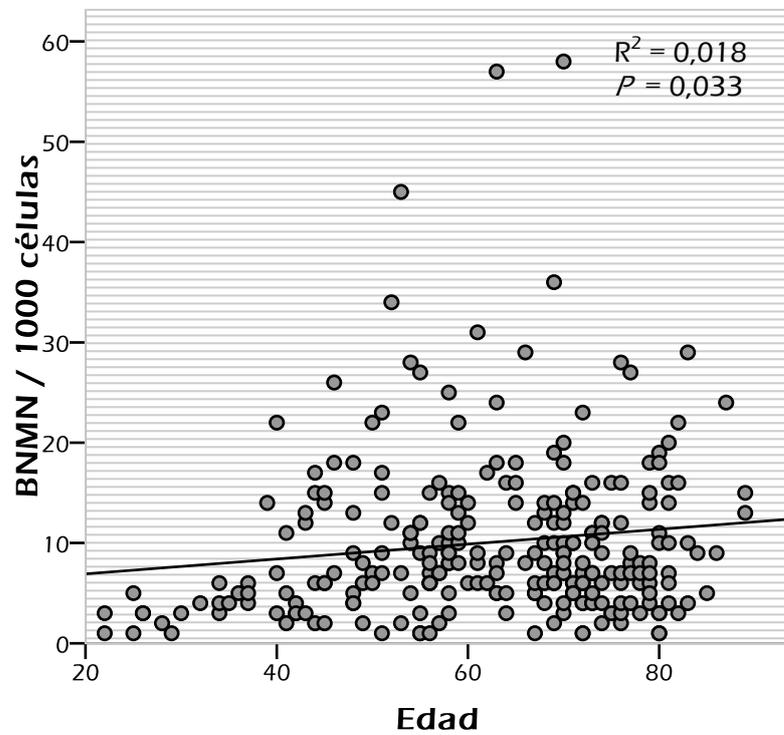


Figura 21. Regresión lineal entre la edad y el daño genético.

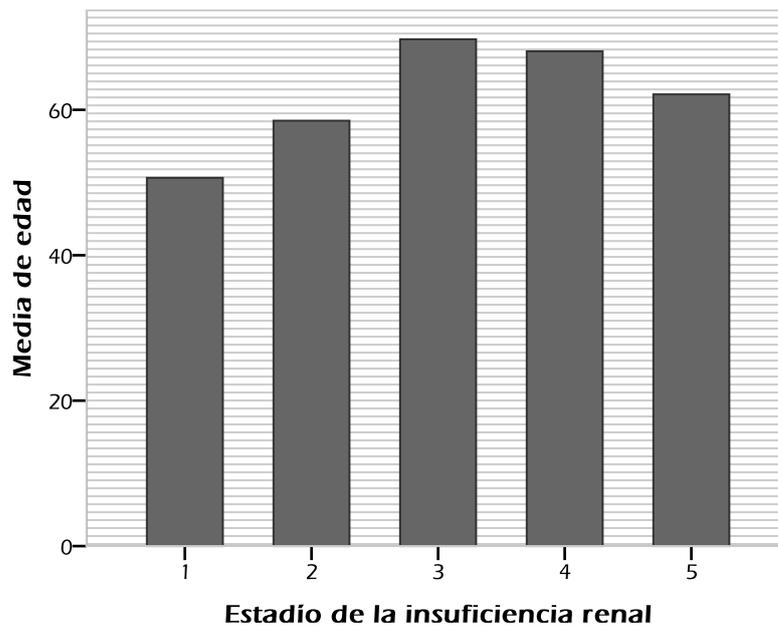


Figura 22. Gráfico de la media de edad en cada estadio de la IRC.

4.5.3. El índice de masa corporal (IMC)

El índice de masa corporal, es un parámetro que está recibiendo mucha atención tanto en relación con diversas patologías, como respecto a su posible papel en los niveles de daño genotóxico. Por lo tanto, hemos llevado a cabo un estudio de regresión de las BNMN con respecto a este factor, que resultó no ser significativa ($R^2 = 0,004$; $P > 0,05$). Para visualizar esta relación, se clasificó a la población en tres grupos: peso bajo, normal y sobrepeso, según su IMC y, en la **figura 23** podemos ver que apartarse del peso estándar implicaría frecuencias de daño menor, pero estas diferencias no tienen significación estadística de acuerdo con los valores de t calculados.

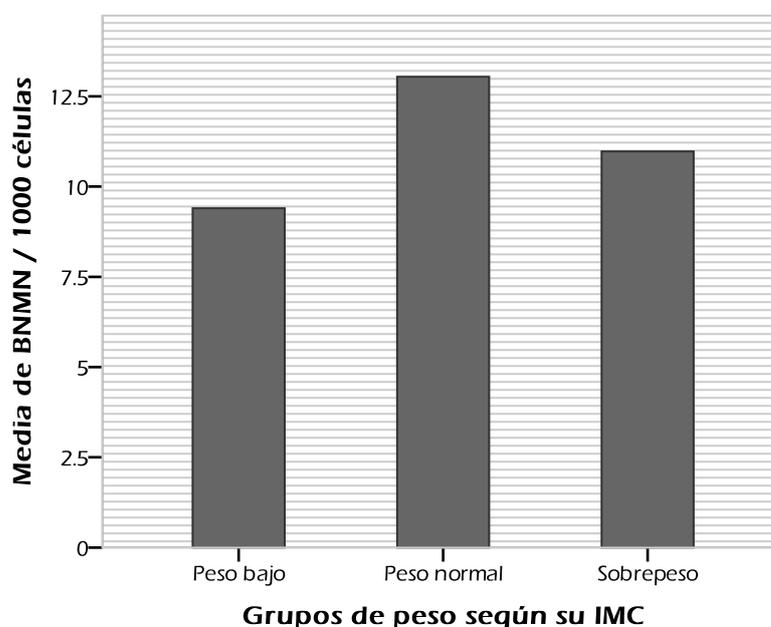


Figura 23. Daño genético en los grupos de peso, de acuerdo al IMC.

4.5.4. Presencia de otras patologías

Además de la IRC y el cáncer, que resultaron tener un efecto sobre el daño genético en el modelo lineal general, se analizó en la población total el posible efecto de la presencia de otras patologías, encontrándose que los pacientes con dislipemia muestran una frecuencia de BNMN

significativamente mayor que los que no padecen esta enfermedad ($P < 0,05$). En la **tabla 20** podemos ver la significación de los valores de t correspondientes al análisis de las diversas patologías consideradas en el total de la población.

En la **tabla 21** se describen las comparaciones según los distintos factores disponibles entre la población control y los pacientes con IRC, como tabaquismo, trasplante, patologías, suplementos y medicamentos. En cuanto a las patologías, una observación importante es que en la población con IRC no se aprecian diferencias significativas en los pacientes con cáncer ($P < 0,05$).

Tabla 20. Pruebas de t para factores de confusión en la población total.

Efecto de las patologías en el daño genético de la población (N=258)				
Patologías		n	BNMN media \pm E. T.	P
Hipertensión:	si	195	10,27 \pm 0,57	0,088
	no	63	9,35 \pm 1,16	
Dislipemia:	si	128	10,98 \pm 0,77	0,007
	no	130	9,13 \pm 0,67	
ECV:	si	103	10,18 \pm 0,80	0,359
	no	155	9,95 \pm 0,67	
Diabetes:	si	55	9,84 \pm 1,22	0,807
	no	203	10,10 \pm 0,56	
Cáncer:	si	43	13,77 \pm 1,82	0,016
	no	215	9,30 \pm 0,48	

Un análisis similar se llevó a cabo entre los pacientes con IRC, separando los que están bajo HD de los que no están bajo este tratamiento y los resultados se aprecian en la **tabla 22**, donde se observa una disminución significativa de las BNMN en los pacientes que padecen EVC dentro de la población de pacientes sin HD, y la presencia de cáncer entre los pacientes sometidos a HD se asocia con un incremento significativo en la frecuencia de daño genotóxico.

4.5.5. Tabaquismo

El análisis de este factor de confusión, que normalmente influye sobre las BNMN, sólo fue posible hacerlo en la población con IRC. En la **tabla 21** podemos observar las pruebas de t para este factor en la población con IRC, y en la **tabla 22** las pruebas entre la población de pacientes con IRC con y sin HD. En ambas podemos ver que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que no fuman y los pacientes fumadores.

4.5.6. Trasplante

Se ha analizado este factor ya que entre los pacientes bajo tratamiento con HD se encuentran casos de pacientes que han vuelto al tratamiento después de haber recibido un trasplante, debido a que ha sido rechazado el injerto o bien el nuevo órgano no funciona adecuadamente, posiblemente debido a que el órgano proviene de un donante anciano, por tanto, con una función disminuida. Esto indica que el paciente ha recibido una terapia de inmunosupresión y uno de los efectos secundarios, es que el riesgo a desarrollar cáncer aumenta. Sin embargo, ninguna de las pruebas de t realizadas (en las **tablas 21** y **22**) indica que los trasplantados tengan una frecuencia de daño significativamente diferente al resto de pacientes.

4.5.7. Suplementos con antioxidantes

Tanto en la **tabla 21**, donde se analiza a la población con IRC, como en la **tabla 22**, donde se analiza este factor en los pacientes bajo HD, se encontró que la frecuencia de BNMN de los pacientes que toman L-carnitina es mayor que en los pacientes que no toman este suplemento, sin que se tenga claro cual es el sentido de esta asociación.

Otra observación importante acerca de los suplementos analizados en las **tablas 21** y **22**, es que los pacientes que se suplementan con ácido fólico no mostraron una variación en la frecuencia de BNMN, a diferencia de lo que

indican distintos estudios, que asumen una relación inversa entre la suplementación de ácido fólico y el daño genético evaluado con el ensayo de MN.

4.5.8. Medicamentos

En cuanto a los medicamentos, no se encontraron diferencias significativas en las pruebas de t realizadas en los distintos grupos de población, para ninguno de los medicamentos administrados. La lista de fármacos administrados se obtuvo, según los historiales médicos y las entrevistas personalizadas que se llevaron a cabo tanto a los pacientes como a los controles.

Tabla 21. Pruebas de *t* para diversos factores en la población control y con IRC

Pruebas <i>t</i> para BNMN (<i>P</i> calculada con log10 BNMN)							
Factores	Controles			IRC			<i>P</i> (si)
	n	Media ± E. T.	<i>P</i>	n	Media ± E. T.	<i>P</i>	
Tabaquismo:	si	ND		110	11,90 ± 0,73		-
	no			91	10,16 ± 1,04		
Trasplante:	si	0	-	27	10,41 ± 1,52		-
	no	57	-	174	11,03 ± 0,67		
Patologías							
Hipertensión:	si	16	6,25 ± 0,98	179	10,63 ± 0,60		0,008
	no	41	7,10 ± 0,78	22	13,55 ± 2,80		
Dislipemia:	si	8	6,88 ± 0,81	120	11,25 ± 0,810		0,263
	no	49	6,86 ± 0,71	81	10,51 ± 0,957		
ECV:	si	0	-	103	10,18 ± 0,80		-
	no	57	-	98	11,76 ± 0,95		
Diabetes:	si	4	8,50 ± 3,07	51	9,94 ± 1,30		0,235
	no	53	6,74 ± 0,64	150	11,29 ± 0,70		
Cáncer:	si	0	-	43	13,77 ± 1,82		-
	no	57	-	158	10,18 ± 0,60		
Suplementos							
Vitamina D:	si	0	-	75	10,56 ± 0,95		-
	no	57	-	126	11,18 ± 0,81		
Acido fólico:	si	0	-	49	11,47 ± 1,42		-
	no	57	-	152	10,78 ± 0,68		
L-carnitina:	si	0	-	51	13,02 ± 1,37		-
	no	57	-	150	10,25 ± 0,68		
Vitaminas B y C:	si	0	-	35	12,20 ± 1,34		-
	no	57	-	166	10,69 ± 0,69		
Medicamentos							
Eritropoyetina:	si	0	-	111	11,81 ± 0,95		-
	no	57	-	90	9,89 ± 0,71		
IECA; ARA-II:	si	4	7,50 ± 1,56	127	10,16 ± 0,66		0,681
	no	53	6,81 ± 0,66	74	12,31 ± 1,23		
Estatina:	si	3	5,00 ± 0,58	121	10,55 ± 0,70		0,142
	no	54	6,96 ± 0,65	80	11,55 ± 1,13		
Sevelamer:	si	0	-	62	11,61 ± 1,24		-
	no	57	-	139	10,65 ± 0,70		

P (si): comparación de la población control con la que padece IRC. **IECA**: inhibidor de la enzima de conversión, **ARA-II**: antagonistas del receptor de la angiotensina II, **Estatina**: fármaco usado para disminuir el colesterol; **Sevelamer**: fármaco secuestrador de fosfato.

Tabla 22. Pruebas de *t* para diversos factores en los pacientes con IRC, con y sin HD

Pruebas <i>t</i> para BNMN (análisis de <i>P</i> con log10 BNMN)								
Factores		IRC sin HD			IRC en HD			<i>P</i> (si)
		n	Media ± E. T.	<i>P</i>	n	Media ± E. T.	<i>P</i>	
Tabaquismo:	si	53	9,91 ± 1,13	0,850	57	10,40 ± 0,94	0,554	0,528
	no	50	11,10 ± 1,33		41	12,88 ± 1,65		
Trasplante:	si	0	-	-	27	10,41 ± 1,52	0,999	-
	no	103	-	-	71	11,83 ± 1,07		
Patologías								
Hipertensión:	si	92	10,38 ± 0,92	0,758	87	10,90 ± 0,77	0,466	0,417
	no	11	11,36 ± 2,67		11	15,73 ± 5,00		
Dislipemia:	si	64	10,59 ± 1,21	0,386	56	12,00 ± 1,05	0,205	0,202
	no	39	10,31 ± 1,15		42	10,69 ± 1,52		
ECV:	si	44	8,34 ± 0,97	0,037	59	11,56 ± 1,17	0,583	0,024
	no	59	12,08 ± 1,29		39	11,26 ± 1,36		
Diabetes:	si	27	8,70 ± 2,00	0,088	24	11,33 ± 1,60	0,936	0,118
	no	76	11,12 ± 0,93		74	11,47 ± 1,05		
Cáncer:	si	23	12,04 ± 2,37	0,874	20	15,75 ± 2,82	0,027	0,125
	no	80	10,04 ± 0,89		78	10,33 ± 0,81		
Suplementos								
Vitamina D:	si	31	9,74 ± 1,10	0,880	44	11,14 ± 1,43	0,706	0,611
	no	72	10,81 ± 1,15		54	11,69 ± 1,11		
Acido fólico:	si	6	5,50 ± 0,85	0,168	43	12,30 ± 1,58	0,463	0,065
	no	97	10,79 ± 0,91		55	10,76 ± 0,98		
L-carnitina:	si	0	-	-	51	13,02 ± 1,37	0,056	-
	no	103	-	-	47	9,72 ± 1,04		
Vitaminas B y C:	si	1	-	-	34	12,38 ± 1,37	0,191	-
	no	102	-	-	64	10,94 ± 1,14		
Medicamentos								
Eritropoyetina:	si	17	13,82 ± 3,67	0,414	94	11,45 ± 0,92	0,542	0,821
	no	86	9,83 ± 0,74		4	11,25 ± 1,25		
IECA; ARA-II:	si	85	10,19 ± 0,87	0,708	42	10,10 ± 0,95	0,446	0,868
	no	18	11,89 ± 2,80		56	12,45 ± 1,36		
Estatina:	si	67	9,96 ± 1,00	0,775	54	11,30 ± 0,98	0,429	0,231
	no	36	11,47 ± 1,65		44	11,61 ± 1,57		
Sevelamer:	si	0	-	-	62	11,61 ± 1,24	0,536	-
	no	103	-	-	36	11,14 ± 1,14		

P (si): comparación del grupo sin HD con el que está en HD. **IECA**: inhibidor de la enzima de conversión, **ARA-II**: antagonistas del receptor de la angiotensina II, **Estatina**: fármaco usado para disminuir el colesterol; **Sevelamer**: fármaco secuestrador de fosfato.

4.6. Radiosensibilidad

Además de los valores basales de daño citogenético, es de interés valorar la existencia de una posible inestabilidad genómica en nuestros pacientes, inestabilidad que puede manifestarse como una sensibilidad frente a los efectos de la radiación (radiosensibilidad). En la **tabla 23** se presentan las variables citogenéticas resultantes de la inducción de daño con una dosis de radiación de 0,5 Gy, tanto para los controles como para la población total de pacientes con IRC, así como para los subgrupos de pacientes con y sin HD. Hay que señalar que en este estudio, el análisis de la radiosensibilidad sólo se ha podido realizar en una muestra de 53 controles y 124 pacientes con IRC. Podemos ver que existen diferencias estadísticamente significativas entre los controles y la población total de pacientes para las variables MN, BNMN y CBPI ($P < 0,001$) y que entre el subgrupo de pacientes no se encontraron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros, aunque los valores fueron más acusados para aquellos pacientes sometidos a HD. Estas variables solas no nos proporcionan mucha información, por lo que se procedió a tomar en cuenta sus respectivos valores de daño basal para calcular parámetros de relevancia biológica, que de alguna forma nos indican la radiosensibilidad individual.

Para los análisis de radiosensibilidad también se decidió utilizar las BNMN y según las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov la variable inducida por radiación sigue una distribución normal ($P = 0,147$). Con esta variable se han calculado los siguientes parámetros:

1. **El incremento** (inducido por la radiación), que es la diferencia obtenida al restar las BNMN basales, a las BNMN inducidas por la radiación.
2. **El incremento relativo**, que es el incremento dividido por las BNMN basales, lo cual podría tener un significado mejor, ya que nos indica el número de veces que cada individuo ha multiplicado su daño basal como consecuencia de la irradiación. La desventaja es que en cada población, este parámetro agrupa a los individuos en aproximadamente 10 grupos, es decir aquellos que han multiplicado

su daño desde 1 vez, 2 veces, etc., hasta 10 veces aproximadamente, por lo cual es difícil detectar diferencias entre poblaciones. Sin embargo este parámetro se utilizó para ver tendencias y para comparar casos individuales.

Tabla 23. Variables citogenéticas inducidas por radiación en cada población

Variables citogenéticas 0,5 Gy	Controles		Pacientes con insuficiencia renal crónica					
	n	Media ± E. T.	Total		sin HD		HD	
			n	Media ± E. T.	n	Media ± E. T.	n	Media ± E. T.
MN								
Hombres	33	30,10 ± 3,33	106	44,71 ± 2,27	62	42,79 ± 3,14	44	47,41 ± 3,22
Mujeres	24	37,22 ± 3,32	68	48,54 ± 3,17	41	45,66 ± 3,51	27	30,85 ± 5,94
Total	53	33,19 ± 2,40	174	46,21 ± 1,86 ^{***}	103	43,93 ± 2,34	71	49,51 ± 3,00
BNMN								
Hombres	30	27,93 ± 2,60	106	41,44 ± 1,96	62	39,74 ± 2,68	44	43,84 ± 2,84
Mujeres	23	34,61 ± 2,75	68	44,88 ± 2,77	41	42,51 ± 3,19	27	48,48 ± 5,04
Total	53	30,83 ± 1,93	174	42,79 ± 1,61 ^{***}	103	40,84 ± 2,05	71	45,61 ± 2,59
CBPI								
Hombres	30	1,56 ± 0,02	106	1,43 ± 0,13	62	1,53 ± 0,02	44	1,41 ± 0,02
Mujeres	23	1,58 ± 0,02	68	1,41 ± 0,18	41	1,50 ± 0,25	27	1,42 ± 0,03
Total	53	1,57 ± 0,17	174	1,43 ± 0,01 ^{***}	103	1,44 ± 0,14	71	1,41 ± 0,02
Incremento								
Hombres	30	22,53 ± 2,47	106	32,85 ± 1,71	62	19,02 ± 2,41	44	35,14 ± 2,34
Mujeres	23	26,26 ± 2,92	68	31,51 ± 2,31	41	18,06 ± 2,82	27	34,85 ± 3,90
Total	53	24,15 ± 1,88	174	32,33 ± 1,38 ^{**}	103	30,47 ± 1,83	71	35,03 ± 2,06
Inc. relativo								
Hombres	30	10,53 ± 2,41	106	6,43 ± 0,59	62	6,67 ± 0,90	44	6,11 ± 0,64
Mujeres	23	5,20 ± 0,56	68	5,88 ± 0,99	41	5,58 ± 1,18	27	6,33 ± 1,76
Total	53	8,22 ± 1,42	174	6,22 ± 0,53	103	6,24 ± 0,71	71	6,19 ± 0,77

Incremento: BNMN 0,5 Gy – BNMN; **incremento relativo:** BNMN 0,5 Gy – BNMN/ BNMN.

4.6.1. Análisis multifactorial para las BNMN inducidas por la radiación

El primer paso en nuestro estudio ha consistido en analizar cuales son las variables que influyen de manera significativa sobre los efectos genotóxicos de la radiación. Para ello se ha llevado a cabo un análisis multifactorial.

Al realizar el análisis multifactorial para la radiosensibilidad, lo que se ve reflejado en la **tabla 24**, podemos ver que la IRC parece ejercer una influencia en el daño inducido por la radiación; sin embargo, ésta se encuentra en el límite de la significación estadística. Podemos concluir que ni el género ni la edad parecen modular la radiosensibilidad en nuestro estudio y, por último, uno de los resultados esperados que encontramos es que la presencia de cáncer es un indicador de una alta susceptibilidad al daño genético, o de problemas en la reparación del mismo, modulando significativamente la expresión de la radiosensibilidad.

Tabla 24. Modelo lineal general con BNMN 0,5 Gy como variable dependiente

Factores	F	Sig.
Modelo corregido	6,343	0,000
Control o IRC	7,947	0,005
Género	3,559	0,061
Edad	0,147	0,702
Cáncer	7,423	0,007
R ² = 0,103; R ² corregida = 0,086		

4.6.2. Relación entre radiosensibilidad y la IRC

En concordancia con los resultados globales obtenidos en el análisis multifactorial, cuando comparamos el incremento de BNMN como medida de la radiosensibilidad, entre pacientes y controles, se observan diferencias claramente significativas, siendo los pacientes con IRC quienes muestran una mayor radiosensibilidad (**tabla 25**).

Tabla 25. Diferencias en cuanto al incremento por radiación.

Población	n	Incremento BNMN media ± E. T.	P
Control	53	24,15 ± 1,88	
IRC	174	32,33 ± 1,38	0,003

Para complementar la información acerca del papel de la patología se realizó una regresión lineal entre el incremento por radiación (BNMN 0,5 Gy – BNMN) y los valores de creatinina, con los pacientes sin tratamiento bajo HD y

los controles, encontrando que no tienen una correlación significativa con el daño inducido por la radiación (**figura 24**).

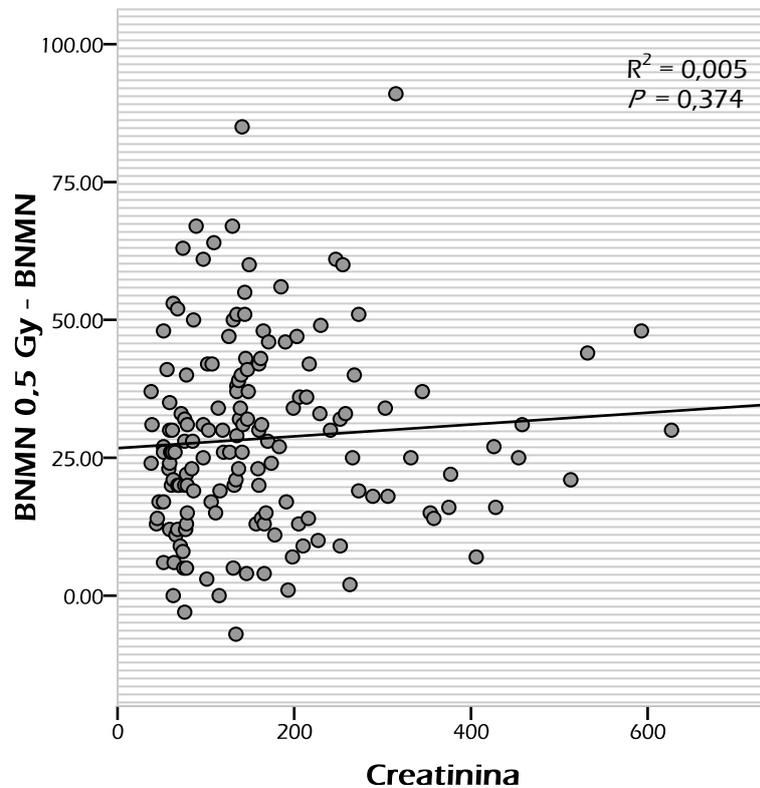


Figura 24. Regresión del incremento por la radiación y la creatinina.
(controles y pacientes IRC sin HD)

Se realizó también una regresión lineal entre el incremento inducido por la radiación y los valores de FG que, como se mencionó anteriormente, es un parámetro que indica el grado de la patología, es decir mientras menor sea el índice de filtrado en nuestros riñones mayor será el grado de la patología. Como se observa en el gráfico de la **figura 25**, no existe una correlación significativa, lo que nos indica que la radiosensibilidad no aumenta conforme la progresión de la patología. Lo cual difiere del resultado obtenido con el daño basal.

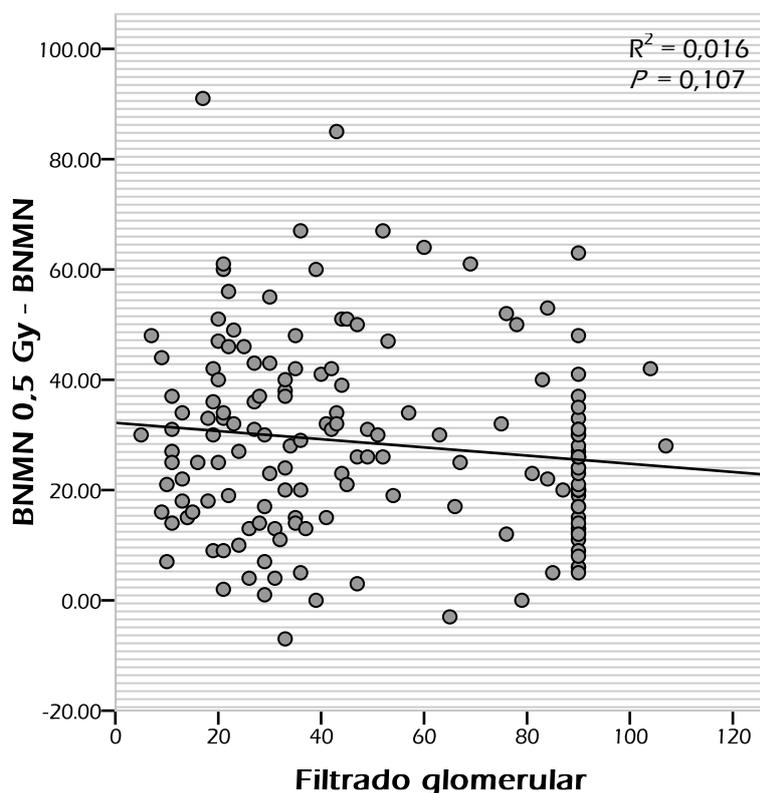


Figura 25. Regresión del incremento por radiación con el FG

Cuando se estratificó a la población de acuerdo a los distintos estadios de la enfermedad, separando a los pacientes bajo HD (figura 26), se observa que los pacientes en el estadio 5 presentan una disminución en el incremento de daño inducido por la radiación. No se encontraron diferencias significativas respecto al estadio 1, con el 2 ($P = 0,158$), ni con el 5 ($P = 0,099$). Las diferencias significativas encontradas fueron entre el estadio 1 y los estadios 3 ($P < 0,05$) y 4 ($P < 0,05$); encontrándose una diferencia altamente significativa con el grupo de pacientes bajo HD ($P < 0,005$); además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el estadio 5 y el 5 bajo HD ($P < 0,05$), ya que los pacientes bajo HD tienen un mayor nivel de daño inducido por radiación que los del estadio 5 sin tratamiento con HD.

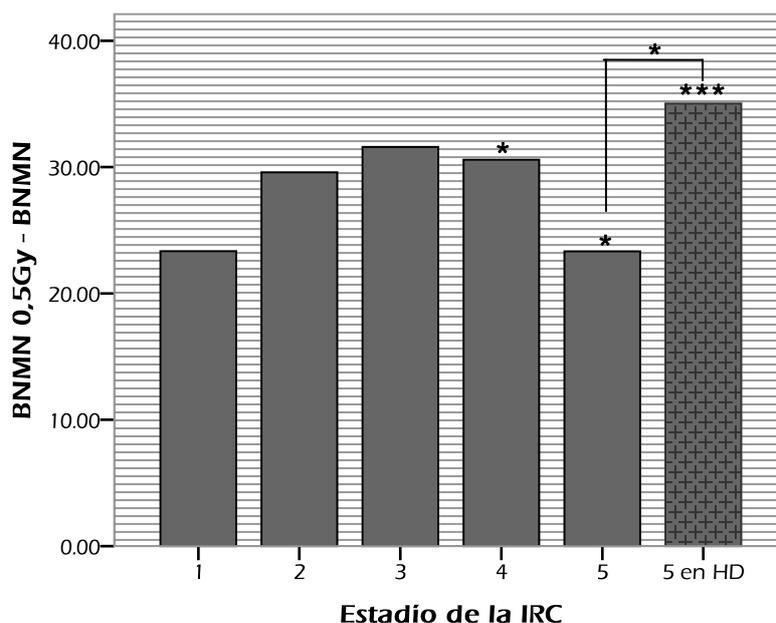


Figura 26. Gráfico del incremento por la radiación en cada estadio de la IRC.
 $P < 0,05$ * y $< 0,0001$ *** respecto al estadio 1; NS: no significativa.

En la **figura 27** podemos ver que no hay diferencias en cuanto al incremento de daño por la radiación, cuando se agrupó a los estadios 1 y 2, y se comparó con el estadio 3 ($P = 0,056$), el 4 ($P = 0,126$) y el 5 ($P = 0,693$); sólo encontramos diferencias significativas con el grupo de pacientes en estadio 5 bajo HD ($P = 0,005$). Al comparar los pacientes en el estadio 5 que no están bajo HD con los que sí, se encontró que el grupo de los pacientes bajo HD aumentó significativamente su respuesta a la radiación ($P = 0,027$).

En la **figura 28** podemos ver la tendencia que nos indica el parámetro de incremento relativo, y lo más destacable es que ésta es inversa a la observada para el incremento absoluto, es decir los individuos en el estadio 1 (con menor daño basal) incrementan una media de más de 8 veces su daño basal con la dosis de radiación, y esto va disminuyendo en cada estadio, hasta llegar al 5, donde tal vez por una saturación o por muerte celular su alto daño basal sólo se llega a multiplicar por 4, aproximadamente. Por último vemos que los pacientes que están bajo HD llegan a aumentar hasta 6 veces su daño basal, esto podría ser por la tendencia a mejorar con el tratamiento, que hasta ahora se ha manifestado en los distintos análisis de nuestro estudio.

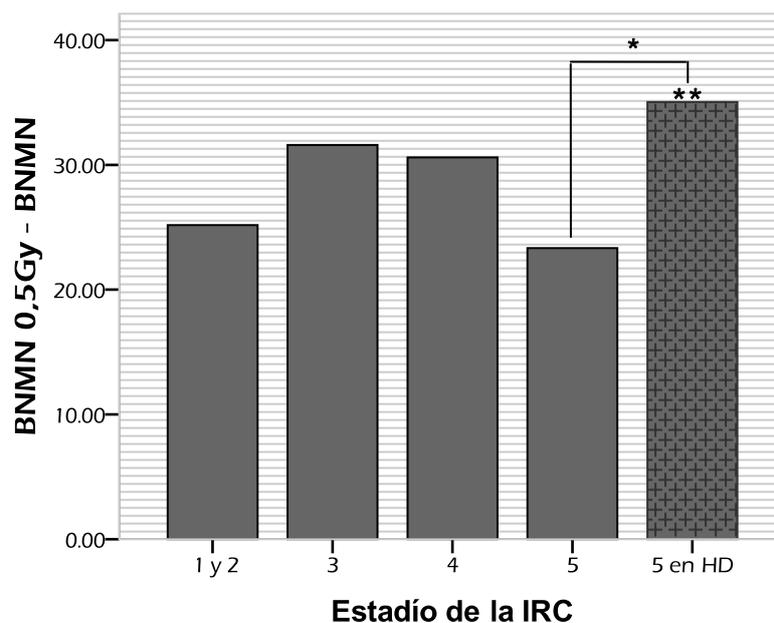


Figura 27. Gráfico del incremento por la radiación, agrupando los estadios 1 y 2 de la IRC. $P < 0,005$ ** respecto al grupo de estadios 1 y 2; $P < 0,05$ *entre el estadio 5 y 5 bajo HD.

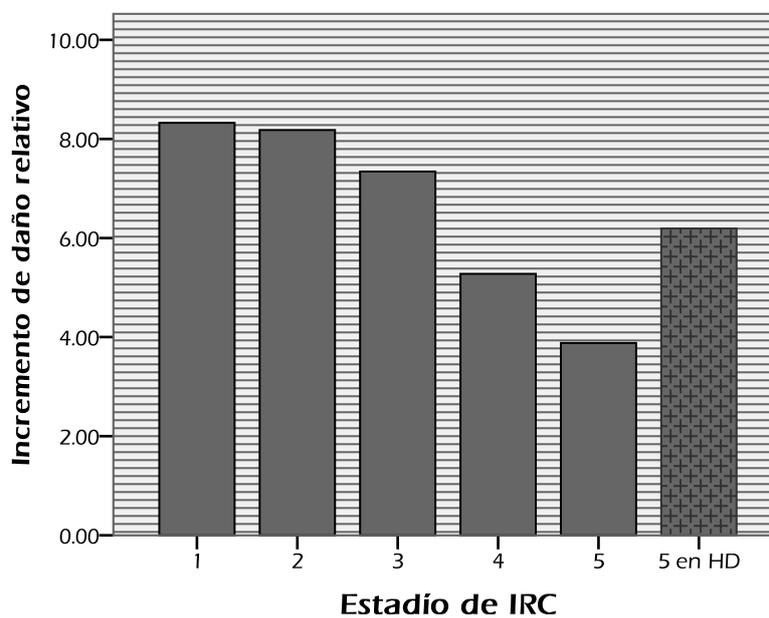


Figura 28. Gráfica del incremento relativo por radiación en cada estadio de la IRC

4.6.3. Relación entre la radiosensibilidad y la HD

En cuanto al efecto de la HD en la radiosensibilidad se hicieron los mismos análisis que con las BNMN basales, empezando por una regresión de las BNMN inducidas por la radiación con el tiempo en HD y, como se puede observar en la **figura 29**, aunque se observa una ligera tendencia contraria a la encontrada con las BNMN basales, es decir que los individuos con más tiempo en HD tienen un incremento mayor, esta tendencia no es significativa.

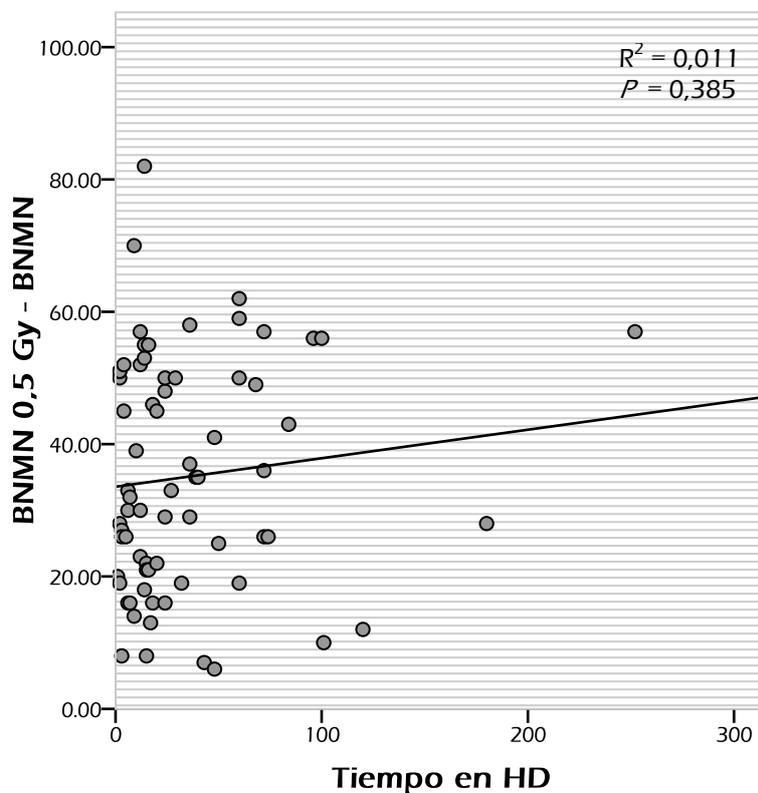


Figura 29. Gráfico del incremento por radiación y el tiempo en HD

4.6.3.1. Radiosensibilidad después de un año en HD

Otra forma de enfocar el estudio de los efectos de la HD fue por medio del seguimiento de un grupo de pacientes después de un año bajo HD, y así verificar si este periodo de tiempo transcurrido genera algún tipo de modificación en el patrón de respuesta a la radiación en los pacientes. Así, de los 33 pacientes que se muestrearon por segunda vez después de una año de

tratamiento bajo HD, tan sólo pudimos incluir a 20 pacientes, ya que el resto no fueron sometidos a radiación en el primer muestreo. En la **tabla 26** podemos ver los resultados de las pruebas de t para muestras relacionadas, donde hay una disminución significativa ($P < 0,05$) de las BNMN a una dosis de 0,5 Gy después de un año bajo HD, y que el incremento por radiación también ha disminuido significativamente ($P < 0,05$).

Tabla 26. Prueba de t para muestras relacionadas: efecto de un año en HD

Prueba t			
Pacientes en HD	n	BNMN 0,5 Gy media \pm E. T.	P
BNMN 0,5 Gy	20	46,80 \pm 4,05	
2do muestreo (1 año después)		28,75 \pm 5,19	0,012
BNMN 0,5Gy – BNMN	20	35,35 \pm 3,77	
2do muestreo (1 año después)		21,15 \pm 4,30	0,021

En la **Figura 30** podemos ver la evolución de cada uno, de los 20 pacientes en cuanto a su radiosensibilidad después de 1 año de tratamiento con HD. Podemos observar que los resultados del primer muestreo se encuentran deliberadamente en orden ascendente según sus niveles de daño, y que sólo en 5 pacientes el incremento por radiación ha aumentado en el segundo muestreo, disminuyendo en los 15 casos restantes.

Otra forma de ver la evolución, es realizando el mismo gráfico con el incremento basal. En la **figura 31** podemos visualizar el número de veces que ha incrementado el daño basal de cada individuo después de un año bajo tratamiento con HD. Este parámetro nos da una visión mas completa del efecto de la radiación en cada individuo. Por ejemplo, si observamos en el gráfico de la **figura 30** al individuo 4, podemos ver que éste ha pasado de un valor equivalente a 20 BNMN, a uno de 60 BNMN, pero en el gráfico de la **figura 31** vemos que su incremento relativo de BNMN es el mismo antes y después de un año bajo HD.

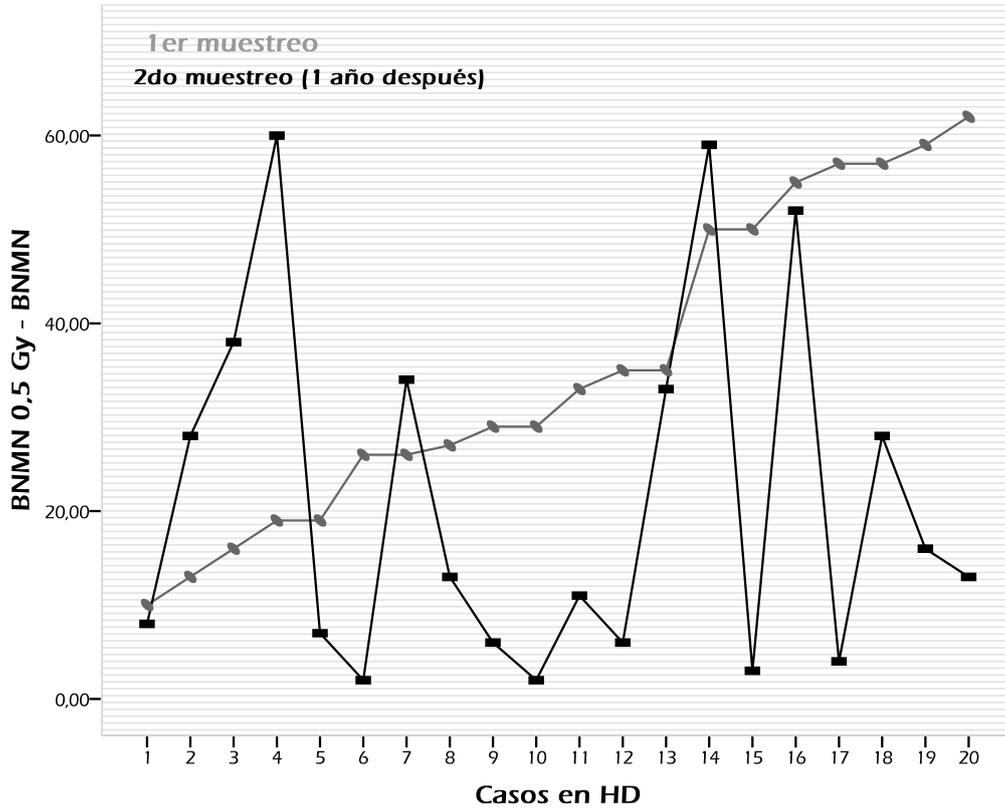


Figura 30. Gráfico de la radiosensibilidad individual, tras un año bajo HD

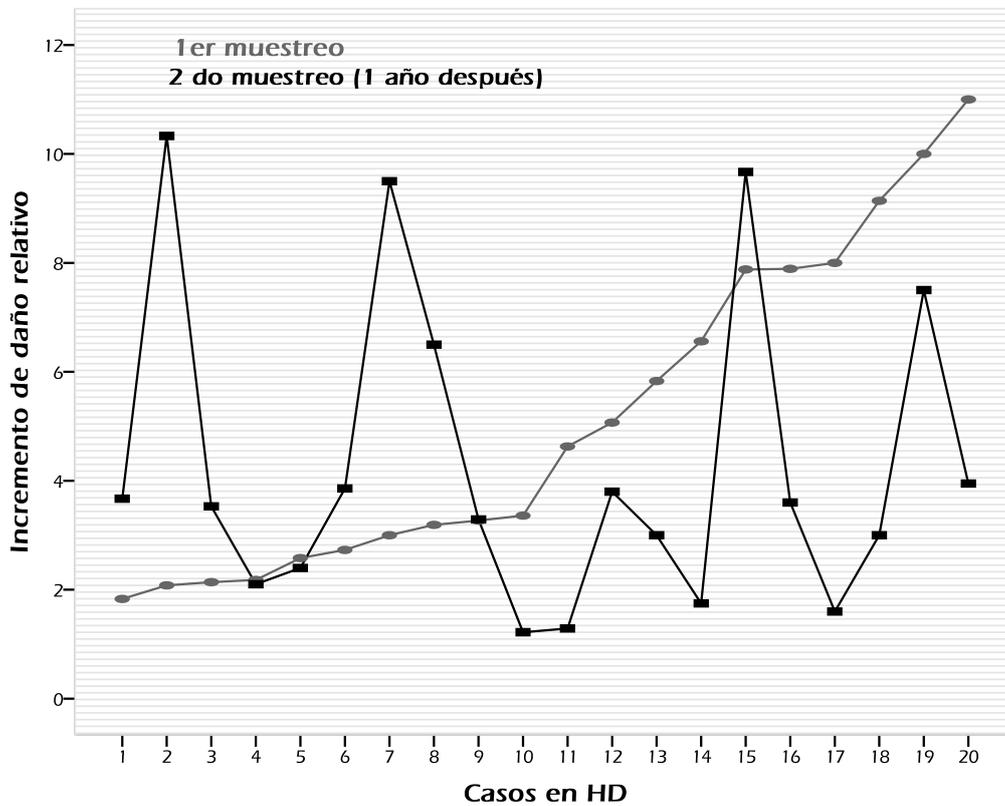


Figura 31. Gráfico del incremento basal individual por radiación, tras un año bajo HD

4.7. Factores de confusión para el incremento por la radiación

4.7.1. Género

Como se mencionó anteriormente, el género no parece influir significativamente sobre el incremento de BNMN inducidas por la radiación. En la **tabla 27** podemos ver las pruebas de *t* para la población total, donde se puede ver que la inducción de daño no se ve influenciada por el género, a pesar de los resultados expuestos en la **tablas 16 y 19**, donde vemos que el género modula los niveles basales de daño genético medidos como BNMN.

Tabla 27. Prueba de *t*: efecto del género sobre el daño inducido con la radiación

Género	n	BNMN 0,5 Gy - BNMN media ± E. T.	<i>P</i>
Hombres	136	30,57 ± 1,49	
Mujeres	91	30,19 ± 1,88	0,871

4.7.2. Edad

Una situación similar a la anterior se encuentra cuando se tiene en cuenta el efecto de la edad sobre la radiosensibilidad. Así, al realizar una regresión entre la edad y los efectos inducidos por la radiación no se observó ninguna tendencia significativa, lo cual se visualiza en la **figura 32**.

4.7.3. El índice de masa corporal (IMC)

En la **figura 33** podemos ver las tendencias para ambos factores, el incremento de BNMN y el incremento relativo por radiación, en función del IMC. Aunque ninguna de las pruebas de *t* entre grupos mostró diferencias estadísticamente significativas con ninguno de los dos parámetros, podemos ver que el incremento relativo muestra una tendencia proporcional al peso.

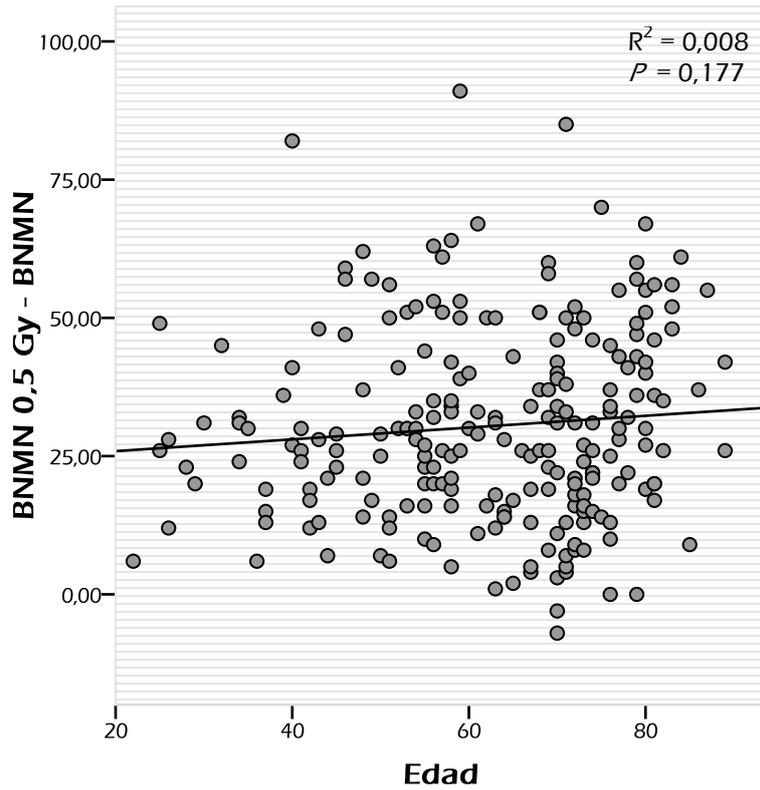


Figura 32. Regresión entre el incremento de BNMN por la radiación y la edad.

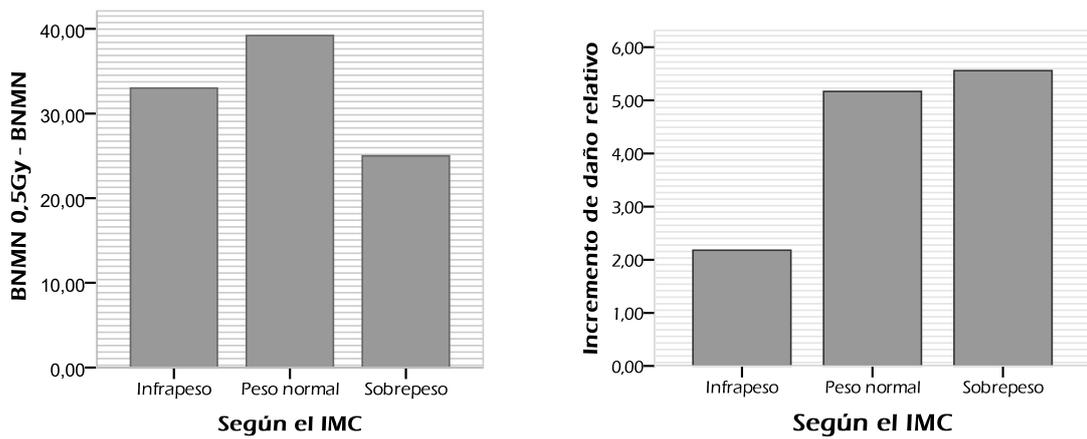


Figura 33. Gráficos de las variables de radiosensibilidad y el IMC

4.7.4. Presencia de otras patologías

Se ha analizado el efecto de la presencia de otras patologías en la población total sobre el incremento de BNMN por la radiación, encontrándose que los valores de este parámetro en los pacientes que, además de IRC, padecen hipertensión es significativamente mayor ($P = 0,05$), que en los que no la padecen; asimismo, también presentan frecuencias significativamente mayores aquellos que padecen ECV ($P < 0,05$) y, como se reflejó en el análisis multifactorial, los pacientes con patología cancerosa también muestran una clara radiosensibilidad ($P < 0,05$). Los resultados de estos análisis los podemos consultar en la **tabla 28**.

Tabla 28. Pruebas de t para distintos factores de confusión en la población total.

Efecto de las patologías en la radiosensibilidad de la población (N=227)				
Patologías		n	BNMN 0,5 Gy - BNMN media \pm E. T.	P
Hipertensión:	si	171	31,72 \pm 1,40	0,050
	no	56	26,43 \pm 1,92	
Dislipemia:	si	114	32,34 \pm 1,79	0,097
	no	113	28,48 \pm 1,47	
ECV:	si	86	35,14 \pm 1,93	0,001
	no	141	27,54 \pm 1,41	
Diabetes:	si	47	29,49 \pm 2,52	0,685
	no	180	30,66 \pm 1,32	
Cáncer:	si	39	38,92 \pm 2,71	0,001
	no	188	28,65 \pm 1,25	

También se analizaron estos efectos según los distintos grupos de la población indicados en la **tabla 29** (pruebas de t para controles y pacientes con IRC). Podemos ver que la presencia de dislipemia en los controles supone una frecuencia de BNMN inducidas por la radiación estadísticamente mayor ($P < 0,05$) que aquellos que no la padecen. Asimismo, los pacientes que además de IRC padecen ECV también presentan una frecuencia significativamente mayor de daño inducido por radiación ($P < 0,05$) para el grupo total de IRC. La patología cancerosa se asocia con una radiosensibilidad

significativamente mayor en la población con IRC sin HD ($P < 0,05$); sin embargo, en la población bajo HD ésta no fue estadísticamente significativa. Estos análisis se presentan en la **tabla 30** (pruebas de t para pacientes sometidos o no a HD).

4.7.5. Tabaquismo

Este factor no presentó ningún efecto sobre las frecuencias de daño genético inducidas por la radiación en el presente estudio, ni teniendo en cuenta a la población con IRC total (que es para quienes tenemos disponible este parámetro), ni clasificando a los pacientes en función de si estaban sometidos o no a HD. Estos resultados se encuentran en las **tablas 29 y 30**.

4.7.6. Trasplante

Al igual que se observó para la variable citogenética basal, el hecho de haber recibido un trasplante, tampoco parece ejercer efectos sobre la radiosensibilidad, detectables en nuestra población bajo estudio. Los valores obtenidos en los distintos análisis estadísticos se indican en las **tablas 29 y 30**.

4.7.7. Suplementos nutritivos

De los distintos suplementos que se les suministran a nuestros pacientes, la l-carnitina es el único que parece ejercer un efecto sobre el daño genético inducido por la radiación, presentando una frecuencia estadísticamente mayor en los pacientes que toman este suplemento ($P < 0,05$), comparada con los que no lo toman en la población de pacientes bajo HD. Este efecto se aprecia en los análisis mostrados en las **tablas 29 y 30**.

4.7.8. Medicamentos

Finalmente, el efecto de los distintos medicamentos administrados a nuestros pacientes, se ha analizado con respecto a sus efectos sobre la

radiosensibilidad individual. Así, de todos los medicamentos analizados, tan sólo la IECA en la población control parece aumentar significativamente la frecuencia de daño inducido por la radiación ($P < 0,05$). Hay que señalar que en este grupo el número de individuos que toman este medicamento, es relativamente pequeño (4), comparado con los que no lo toman.

Tabla 29. Análisis de la radiosensibilidad para la población control y con IRC

Pruebas <i>t</i> para el incremento por radiación (BNMN 0,5 Gy – BNMN)							
Factores	Controles			IRC			<i>P</i> (si)
	n	Media ± E. T.	<i>P</i>	n	Media ± E. T.	<i>P</i>	
Tabaquismo:	si	ND		97	17,13 ± 1,74		
	no			77	19,18 ± 2,19	0,082	-
Trasplante:	si	0	-	20	36,85 ± 3,88		
	no	53	-	153	31,99 ± 1,46	0,257	-
Patologías							
Hipertensión:	si	15	26,33 ± 4,40	156	32,24 ± 1,47		
	no	38	23,29 ± 2,00	18	33,06 ± 3,85	0,858	0,234
Dislipemia:	si	7	34,00 ± 5,74	107	32,23 ± 1,88		
	no	46	22,65 ± 1,92	67	32,47 ± 1,96	0,932	0,814
ECV:	si	0	-	86	35,14 ± 1,93		
	no	53	-	88	29,58 ± 1,93	0,043	-
Diabetes:	si	4	17,25 ± 4,31	43	30,63 ± 2,67		
	no	49	24,71 ± 1,99	131	32,88 ± 1,61	0,481	0,141
Cáncer:	si	0	-	39	38,92 ± 2,71		
	no	53	-	135	30,42 ± 1,56	0,010	-
Suplementos							
Vitamina D:	si	0	-	58	34,15 ± 2,05		
	no	53	-	115	31,55 ± 1,80	0,375	-
Acido fólico:	si	0	-	39	36,18 ± 2,37		
	no	53	-	135	31,21 ± 1,63	0,133	-
L-carnitina:	si	0	-	32	39,50 ± 3,17		
	no	53	-	142	30,71 ± 1,50	0,013	-
Vitaminas B y C:	si	0	-	21	37,29 ± 3,94		
	no	53	-	153	31,65 ± 1,46	0,183	-
Medicamentos							
Eritropoyetina:	si	0	-	85	34,07 ± 1,88		
	no	53	-	89	30,66 ± 2,00	0,217	-
IECA; ARA-II:	si	4	44,50 ± 5,14	120	31,01 ± 1,67		
	no	49	22,49 ± 1,81	54	35,25 ± 2,40	0,154	0,147
Estatina:	si	3	33,00 ± 5,13	105	31,48 ± 1,94		
	no	50	23,62 ± 1,90	69	33,61 ± 1,84	0,453	0,897
Sevelamer:	si	0	-	42	36,21 ± 2,62		
	no	53	-	132	31,09 ± 1,60	0,112	-

P (si): comparación de la población control con la que padece IRC. **IECA**: inhibidor de la enzima de conversión, **ARA-II**: antagonistas del receptor de la angiotensina II, **Estatina**: fármaco usado para disminuir el colesterol; **Sevelamer**: fármaco secuestrador de fosfato.

Tabla 30. Análisis de la radiosensibilidad en los pacientes con y sin HD

Pruebas <i>t</i> para el incremento por radiación (BNMN 0,5 Gy- BNMN)								
Factores		IRC sin HD			IRC en HD			<i>P</i> (si)
		n	Media ± E. T.	<i>P</i>	n	Media ± E. T.	<i>P</i>	
Tabaquismo:	si	53	33,30 ± 2,54	0,111	44	35,86 ± 2,33	0,608	0,466
	no	50	27,46 ± 2,60		27	33,66 ± 3,90		
Trasplante:	si	103	-	-	20	36,85 ± 3,88	0,583	-
	no	0	-	-	51	34,31 ± 2,44		
Patologías								
Hipertensión:	si	92	30,23 ± 1,94	0,709	64	35,14 ± 2,24	0,870	0,101
	no	11	32,45 ± 5,86		7	34,00 ± 4,25		
Dislipemia:	si	64	30,80 ± 2,57	0,818	43	34,37 ± 2,69	0,696	0,353
	no	39	29,92 ± 2,41		28	36,04 ± 3,22		
ECV:	si	44	32,75 ± 2,93	0,284	42	37,64 ± 2,47	0,127	0,208
	no	59	28,76 ± 2,33		29	31,24 ± 3,48		
Diabetes:	si	27	31,51 ± 3,84	0,734	16	29,12 ± 3,23	0,122	0,670
	no	76	30,09 ± 2,09		55	36,74 ± 2,45		
Cáncer:	si	23	37,61 ± 3,74	0,036	16	40,81 ± 3,94	0,130	0,568
	no	80	28,41 ± 2,05		55	33,34 ± 2,36		
Suplementos								
Vitamina D:	si	31	30,93 ± 2,80	0,867	27	37,85 ± 2,89	0,285	0,092
	no	72	30,26 ± 2,33		44	33,29 ± 2,80		
Acido fólico:	si	6	32,67 ± 5,52	0,767	33	36,82 ± 2,63	0,421	0,534
	no	97	30,33 ± 1,92		38	33,47 ± 3,10		
L-carnitina:	si	0	-	-	32	39,50 ± 3,17	0,048	-
	no	103	-	-	39	31,36 ± 2,58		
Vitaminas B y C:	si	1	32,00	-	20	37,55 ± 4,13	0,447	-
	no	102	30,45 ± 1,84	0,934	51	34,04 ± 2,37		
Medicamentos								
Eritropoyetina:	si	17	29,35 ± 4,11	0,788	68	35,25 ± 2,10	0,611	0,211
	no	86	30,69 ± 2,05		3	30,00 ± 11,54		
IECA; ARA-II:	si	85	29,81 ± 1,99	0,440	35	33,91 ± 3,10	0,597	0,267
	no	18	33,55 ± 4,73		36	36,11 ± 2,75		
Estatina:	si	67	29,27 ± 2,40	0,375	38	35,39 ± 3,23	0,850	0,129
	no	36	32,69 ± 2,75		33	34,61 ± 2,44		
Sevelamer:	si	0	-	-	42	36,21 ± 2,62	0,492	-
	no	103	-	-	29	33,31 ± 3,33		

P (si): comparación de la población control con la que padece IRC. **IECA**: inhibidor de la enzima de conversión, **ARA-II**: antagonistas del receptor de la angiotensina II, **Estatina**: fármaco usado para disminuir el colesterol; **Sevelamer**: fármaco secuestrador de fosfato.

V. DISCUSIÓN

La insuficiencia renal crónica es una patología que tiene un amplio impacto sobre la salud a nivel mundial; además, el hecho de estar estrechamente ligada a patologías consideradas como epidemias del siglo XXI, como la diabetes tipo II, la ECV, la hipertensión y la obesidad, la hace objeto de numerosos estudios epidemiológicos ya que existe una gran necesidad de prevención de esta patología crónica, que consume un gran porcentaje del presupuesto destinado a salud pública. Sin embargo, por lo que respecta a estudios que tengan por objeto analizar el daño genotóxico presente en la población con IRC, así como sus causas y consecuencias, la cantidad de publicaciones encontradas en la literatura se reduce enormemente. Así, para el presente estudio se han encontrado sólo 29 publicaciones que versen sobre estos temas (**tablas 31 y 32**). Además, encontramos que la gran mayoría de ellos se han realizado con muestras poblacionales muy pequeñas, por lo que sus resultados a menudo quedan en entredicho. Si nos limitamos a estudios que analicen el daño genético mediante el ensayo de MN, que es el que utilizamos en nuestro estudio, entonces la cantidad de artículos referenciados encontrados se reduce, ya que tan sólo se han publicado 9 artículos sobre este tema hasta la fecha, los cuales podemos encontrar referenciados en la **tabla 32**. Al analizarlos volvemos a encontrar pequeños tamaños poblacionales, dado que la mayor población estudiada fue de 40 pacientes (Roth *et al.*, 2008).

Resulta interesante analizar a una población que padece una deficiencia en la eliminación de toxinas y, en general xenobióticos ya que esta incapacidad podría amplificar los efectos de la exposición crónica que normalmente sufrimos frente a una gran cantidad de genotoxinas, originadas fundamentalmente por exposiciones ambientales. Además, esta incapacidad podría generar situaciones sinérgicas en casos de personas crónicamente expuestas a elevadas concentraciones de compuestos xenobióticos potencialmente peligrosos. Estos pacientes acumulan gran cantidad de toxinas y éstas pueden terminar causando un desequilibrio en todo el organismo, lo que se podría reflejar de muchas formas, entre las que

podríamos destacar los incrementos en los niveles de daño basal en el DNA. Así, el presente estudio pretende contribuir a incrementar la información existente sobre los niveles de daño genético en los pacientes con insuficiencia renal crónica, tratando de encontrar razones para explicar el origen de este daño. Nuestro trabajo se ha llevado a cabo con una población relativamente grande, con un total de 201 pacientes lo que le da una potencia que no se encuentra en ninguno de los trabajos realizados hasta la fecha por otros autores. Además, se ha incluido el seguimiento de 33 pacientes después de un año bajo HD para poder determinar los efectos de este tratamiento sobre los niveles de daño genético. Finalmente, se ha llevado a cabo un análisis de la radiosensibilidad en 174 pacientes, ya que este parámetro nos puede aportar información valiosa sobre la cuestión de si el daño genético observado es una consecuencia de la patología o es una inestabilidad genómica inherente, lo que da lugar a la patología.

La alta incidencia de cáncer (Port *et al.*, 1989; Inamoto *et al.*, 1991; Iseki *et al.*, 1993; Pope *et al.*, 1994; Buccianti *et al.*, 1996; Cuckovic *et al.*, 1996; Maissonneuve *et al.*, 1999) en la población con IRC y los diferentes estudios que muestran una disminución en la capacidad de reparación presente en estos pacientes (**tablas 31 y 32**), nos han llevado a incluir en nuestro estudio, una evaluación de la capacidad de reparación del daño genético inducido en cada uno de los pacientes estudiados. Entre los distintos agentes que se pueden utilizar para inducir el daño en el DNA destaca la radiación ionizante, ya que al ser un agente físico su exposición evita las complejas reacciones que se producen en la célula cuando es tratada con mutágenos químicos. Así pues, hemos medido la susceptibilidad a los efectos de la radiación, parámetro que se asocia, fundamentalmente, con alteraciones en la capacidad de reconocer y/o reparar las lesiones inducidas por este agente.

Resumiendo, en este estudio de biomonitorio, hemos detectado tanto el daño basal, como el inducido por la radiación ionizante en los pacientes con IRC. Los efectos observados se han correlacionado con la progresión de la misma y se ha investigado la relación entre los niveles de daño genético y los efectos del tratamiento de la patología con HD convencional.

5.1 La población estudiada

En la descripción estadística de la población analizada, se encontró que los pacientes con IRC bajo HD tienen un IMC significativamente menor que aquellos pacientes que aún no inician este tratamiento, lo cual puede deberse a la anemia y malnutrición ampliamente conocidos como efectos negativos consecuencia de la diálisis (Douthat *et al.*, 2003; Tolkoff-Rubin y Goes, 2004). Otra de las similitudes de nuestro estudio con los grandes estudios epidemiológicos es la predominancia del sexo masculino en la población con IRC, ya que es ampliamente conocido que los hombres tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad renal, al tiempo que tienden a desarrollarla a una edad más temprana que las mujeres (Shankar *et al.*, 2008). En nuestra población bajo tratamiento con HD el 28% de los pacientes ha recibido un trasplante, lo cual es un suceso común. Se ha documentado que cada año, entre el 4-5% de los pacientes pierden su injerto (principalmente por nefropatía crónica) y vuelven a diálisis al año de ser trasplantados (CIHI, 2006). Otros estudios indican que, a pesar del trasplante, estos pacientes continúan presentando las características de los pacientes con IRC; así, el porcentaje de pacientes trasplantados en el estadio 4 y 5 de la IRC oscila entre el 14 y el 20 % (Karthikeyan *et al.*, 2004).

Existe una relación directa entre la progresión de la enfermedad y la edad, encontrándose una correlación positiva entre el índice de FG y la edad. Sin embargo, los pacientes con fallo renal (estadio 5) y pacientes en tratamiento con HD presentan una edad inferior a la de los pacientes que se encuentran en estadio 4. Esto contradeciría la propuesta de que existe una relación directa entre el empeoramiento de la patología y la edad, sugiriendo que existen dos tipos de pacientes, unos de desarrollo lento y otros que pronto empeoran requiriendo ser incluidos en el programa de tratamiento con HD.

Las distintas patologías que padece nuestra población están ampliamente ligadas a la IRC, siendo comúnmente consideradas como factores de riesgo o de iniciación de la IRC (Levey *et al.*, 2003; 2005). Así, cabe

destacar que en nuestra población, la hipertensión es la patología con mayor incidencia, lo cual no difiere en cuanto a la epidemiología normal de la IRC (Toto, 2005). Asimismo, cabe señalar que la alta incidencia de la patología cancerosa normalmente asociada a la IRC (Matas *et al.*, 1975; Giacchino *et al.*, 1985; Port *et al.*, 1989; Inamoto *et al.*, 1991; Iseki *et al.*, 1993; Teschner *et al.*, 2002) coincide con lo observado en nuestra población. Esta alta incidencia de cáncer es lo que nos hace proponer la existencia de inestabilidad genómica y de radiosensibilidad asociada a la patología, lo que constituye una de las razones subyacentes a la realización del presente trabajo.

Otro aspecto particular de nuestra población lo constituye el tratamiento nutricional incluido en el protocolo de tratamiento para la IRC, y esto se traduce en seguir una dieta con una reducción de la ingesta proteica. Ésta previene la aparición de la acidosis metabólica, y reduce la hiperfosfatemia e hiperpotasemia; pero, como las restricciones en la dieta pueden reducir también la ingesta de vitaminas, es necesario que los pacientes tomen un complejo multi-vitamínico que contenga vitaminas hidrosolubles. Los requerimientos nutricionales de los pacientes aumentan notablemente al iniciar el tratamiento sustitutivo de diálisis, ya que existen pérdidas durante las sesiones y, por esta razón, es normal que en nuestra población sean los pacientes bajo HD los que mayoritariamente toman los suplementos. La administración de vitaminas A y E es innecesaria, mientras que la vitamina D, en forma de 1,25- di hidroxivitamina D (calcitrol) o sus análogos, se deben administrar de acuerdo con las concentraciones de HPT (hormona paratiroidea) y de fosfatos. Además, para el tratamiento de las complicaciones adyacentes a la IRC, la población está bajo tratamiento médico y, entre los fármacos más comúnmente administrados a nuestros pacientes se encuentra, la eritropoyetina, que como ya se ha mencionado mejora notablemente la calidad de vida del paciente en cuanto a síntomas de malestar y cansancio, los inhibidores del sistema renina-angiotensina, la estatina para el control del colesterol y los controladores de la hiperfosfatemia (NAC-SEN, 2009).

En cuanto a las patologías que se consideran causas de la IRC, en nuestra población cabe destacar la hipertensión, las glomerulopatias y la diabetes como las principales. Estos resultados observados en nuestra población, coinciden con lo citado a nivel global (Luke, 2004; Bakris y Ritz, 2009).

A nuestra población se le realizan rutinariamente los análisis químicos sanguíneos como parte del seguimiento de la IRC, por lo que se dispone de una descripción detallada de los parámetros químicos en cada grupo de población. Los tres parámetros que se salen de los rangos ideales en la población con IRC, son la proteína C reactiva, la homosisteína y el folato, lo que no supone una diferencia importante con lo observado en otras poblaciones de pacientes con IRC.

5.2 Daño genético y la IRC

El primer estudio referente a la asociación entre daño genético y la IRC fue publicado en 1988 y se realizó mediante la técnica de intercambios entre cromátidas hermanas (SCE: *sister chromatid exchange*), este ensayo consiste en la manifestación citológica de la rotura de doble cadena del DNA y la reunión en sitios aparentemente homólogos entre cromátidas de un mismo cromosoma. Aunque no se conoce con exactitud, parece ser que el mecanismo de formación de los SCE es consecuencia de errores en la replicación del DNA y, aunque no tiene consecuencias biológicas, ni ejercen efectos letales a nivel celular se toman como indicadores de la presencia de aductos voluminosos y/o de la interferencia con los mecanismos replicativos. (Natarajan *et al.*, 1994).

Tabla 31. Relación de estudios sobre el daño genético con otros ensayos en pacientes con IRC (parte 1)

	Autor	Año	P	tipo	C	Método	Conclusiones en cuanto a los niveles de daño genético
1	Cengiz <i>et al</i>	1988	44	IRC	24	SCE	Se correlacionan positivamente con los de creatinina y negativamente con el aclaramiento de creatinina.
2	Friedman <i>et al</i>	1988	21	IRC:10 HD:11	12	UDS	Son mayores (menor reparación) en pacientes con IRC y con IRC bajo HD, que en los controles. Daño inducido por radiación UV.
3	Zevin <i>et al</i>	1991	32	IRC:10 HD:11 DP:11	12	UDS	Son mayores (menor reparación) en pacientes con IRC sin HD que en los controles, y en los pacientes bajo HD son similares a los controles. Daño inducido por radiación UV).
4	Malachi <i>et al</i>	1993	21	IRC:11 HD:10	16	UDS	Son mayores (menor reparación) en pacientes con IRC sin HD que en los controles, y en los pacientes bajo HD son similares a los controles. Daño inducido por radiación UV y gama.
5	Vamvakas <i>et al</i>	1996	60	HD	13	UDS	Son mayores en pacientes con IRC que en controles. Se relacionan inversamente con el tiempo en HD, y son mayores en los pacientes trasplantados que en controles
6	Lim <i>et al</i>	2000	22	IRC	22	Deleciones mitocondriales en DNA	Son mayores en pacientes con IRC que en controles.
7	Tarng <i>et al</i>	2000	131	IRC:22 HD:109	35	8-OHdG	Son mayores en pacientes con IRC (sin y con HD) que en controles. Teniendo mayor daño los pacientes bajo HD, y entre los pacientes HD fue mayor en los que usan las membranas de celulosa que aquellos que usan las de polimetilmetacrilato (PMMA) y polosulfonato (PS).
8	Stopper <i>et al</i>	2001	64	IRC:23 HD:26 HDF:15	21	EC	Son mayores en pacientes con IRC que en controles, tendencia a ser mayores en pacientes bajo HD, los niveles de daño se correlacionan positivamente con los de creatinina y el tiempo bajo HD.
9	Tarng <i>et al</i>	2001	112	HD	112	8-OHdG	Son mayores en pacientes bajo HD que en controles, asimismo son mayores en los pacientes que usan las membranas de celulosa que los que usan las de PMMC, PS o recubiertas con vitamina E.
10	Tarng <i>et al</i>	2002	64	IRC: 22 DP:42	24	8-OHdG	Se correlacionan negativamente con aclaramiento de creatinina y son mayores en los pacientes bajo DP, seguidos de los IRC y finalmente los controles.
11	Liu <i>et al</i>	2001	162	IRC	236	Deleciones mitocondriales en DNA	Son mayores (mayor inestabilidad genética) en pacientes con IRC sin encontrar diferencias entre los pacientes bajo HD y DP.
12	Kan <i>et al</i>	2002	36	HD	36	EC	Son mayores en pacientes con IRC bajo HD que en controles y disminuyen después de 14 semanas de suplementación con vitamina E. No se encontró asociación con el tiempo bajo HD.

Tabla 31. Relación de estudios sobre el daño genético con otros ensayos en pacientes con IRC (parte 2)

	Autor	Año	P	tipo	C	Método	Conclusiones en cuanto a los niveles de daño genético
13	Muller <i>et al</i>	2004	21	HD	12	EC	Se encontraron mayores en los pacientes con IRC bajo HD que en controles, siendo mayores en los que usan membranas de celulosa y en los que reciben infusiones de hierro durante la HD. No se encontraron diferencias entre membranas PS y recubiertas con vitamina E.
14	Domenici <i>et al</i>	2005	51	DP:22 HD:29	9	8-OHdG y EC	Son mayores en los pacientes con IRC bajo HD o DP que en controles, y disminuyen después de 4 semanas de suplementación con vitamina E.
15	Boxall <i>et al</i>	2006	38	HD	20	Longitud telomérica	Aumentan (longitud telomérica disminuye) con el tiempo en HD. No se encontraron diferencias de entre pacientes y controles.
16	Buemi <i>et al</i>	2006	30	HDF	25	SCE	Son mayores en los pacientes bajo HDF que en los controles.
17	Kobras <i>et al</i>	2006	12	HD:5 HDF:7	4	EC	Mayores en pacientes con y sin tratamiento con HD que en los controles. No se encontró diferencia entre pacientes sólo tendencia a disminuir con la HD. Estos disminuyen al cambiar de HD a HDF. Se encontraron mayores niveles de AGE en pacientes que en controles sin ser influenciados por la HD o la HDF.
18	Schupp <i>et al</i>	2006	13	HD:5 HDF:7	12	EC	Son mayores en pacientes con IRC que en los controles, y la iniciación de HD no supone ningún cambio, solo la tendencia a disminuirlos y el cambio de HD a HDD tampoco influye los niveles de daño.
19	Pernice <i>et al</i>	2006	30	HD	25	SCE	Son mayores en los pacientes bajo HDF que en los controles y estos niveles aumentan inmediatamente después de la sesión de HDF y alcanzan los mayores niveles 24 hrs después de la sesión.
20	Kuo <i>et al</i>	2008	110	HD	0	8-OHdG	Entre pacientes bajo HD se encontraron mayores en aquellos que reciben infusiones de hierro, con un efecto dependiente de la dosis (20-500 mg) y del tiempo después de la infusión (0-4 hrs).
21	Herman <i>et al</i>	2008	17	HD	0	USD	Incrementan (disminuye la reparación) por estrés oxidativo inmediatamente después de una sesión de HD.
22	Bagatini <i>et al</i>	2008	25	HD con T2DM	20	EC	Son mayores en los pacientes con IRC y diabetes T2 bajo HD que en controles, aumentan inmediatamente después de una sesión de HD y disminuyen 48 hrs después de la sesión.
23	Stoyanova <i>et al</i>	2009	141	CRF:64 HD:77	61	EC	Son mayores en pacientes HD, seguidos de los IRC y controles. Se asocian con la progresión de la patología (creatinina y ferritina) y disminuyen con el tiempo en HD

P: número de pacientes; **C:** número de controles; **EP:** en prensa; **HD:** hemodiálisis; **DHD:** hemodiálisis diaria; **HDF:** hemodiafiltración; **DP:** diálisis peritoneal; **T2DM:** diabetes *mellitus* tipo II; **EC:** ensayo del cometa; **SCE:** *sister chromatid exchange*/ intercambios entre cromátidas hermanas; **UDS:** *unscheduled DNA synthesis*/ síntesis del DNA no programada

Tabla 32. Relación de estudios sobre el daño genético medido con el ensayo de MN en pacientes con IRC

	Autor	Año	P	Tipo	C	Método	Conclusiones en cuanto a los niveles de daño genético
1	Stopper <i>et al</i>	1999	35	IRC:19 HD:16	23	MN	Mayores en pacientes con y sin HD que en los controles. No se encontró asociación con las concentraciones de creatinina
2	Fragedaki <i>et al</i>	2005	25	HDD:13 HD:12	12	MN	Son mayores en los pacientes bajo HD que en los que están bajo HDD (HD diaria), y esto se atribuye a que también son mayores los niveles de AGEs en los HD.
3	Kobras <i>et al</i>	2006	12	HD:5 HDF:7	4	MN	Mayores en pacientes con y sin tratamiento con HD que en los controles. No se encontró diferencia entre pacientes, sólo tendencia a disminuir con la HD. Estos siguen igual al cambiar de HD a HDF en cuanto a MN. Se encontraron mayores niveles de AGEs en pacientes que en controles sin ser influenciados por la HD o la HDF.
4	Schupp <i>et al</i>	2006	13	HD:5 HDF:7	12	MN	Son mayores en pacientes con IRC que en los controles, y la iniciación de HD no supone ningún cambio, sólo la tendencia a disminuirlos y el cambio de HD a HDD tampoco influye los niveles de daño.
5	Schupp <i>et al</i>	2008 a	28	DHD:15 HD:13	ND	MN	Son mayores en los pacientes bajo HD que en los controles y los pacientes bajo HDD. No se encontraron diferencias entre pacientes bajo HDD y los controles. El daño disminuye al cambiar el medicamento angiotensina II por candesartan, y con la suplementación de vitamina B1 durante 3 - 4,5 meses.
6	Schupp <i>et al</i>	2008 b	38	HD	0	MN	Disminuyen con la suplementación (durante 6 semanas) con vitamina B1 (benofitiamine).
7	Stopper <i>et al</i>	2008	27	IRC	0	MN	Disminuyen con la suplementación (durante 12 semanas) con ácido fólico y vitamina B12, y aún más con ambas.
8	Roth <i>et al</i>	2008	40	HD:20 DP:20	40	MN (mucosa bucal)	Mayores en pacientes bajo HD que en controles, con una correlación con el tiempo en HD (mayores en aquellos con 7 años, que con 6). No se encontraron diferencias entre pacientes bajo DP y controles.

P: número de pacientes; **C:** número de controles; **HD:** hemodiálisis; **DHD:** hemodiálisis diaria; **HDF:** hemodiafiltración; **DP:** diálisis peritoneal; **EC:** ensayo del cometa; **SCE:** *sister chromatid exchange*/ intercambios entre cromátidas hermanas

En este primer estudio Cengiz *et al.* (1988) analizaron a una población de 44 pacientes con IRC encontrando que la uremia incrementa la frecuencia de daño, al mostrar una correlación proporcional entre la incidencia de SCE y los valores de creatinina, e inversamente proporcional al aclaramiento de creatinina. Más adelante Buemi *et al.* (2006) analizaron a una población de 30 pacientes con IRC bajo tratamiento con hemodiafiltración (HDF), encontrando que los pacientes bajo HDF tenían una mayor frecuencia de SCE respecto a los controles; otro estudio con este ensayo fue el de Pernice *et al.* (2006) realizado con una población de 30 pacientes bajo HD donde se encontró que la frecuencia de SCE era mayor en los pacientes que en los controles y que este parámetro aumentaba después de una sesión de HD, encontrándose los mayores niveles después de 24 horas de la sesión de HD.

Una forma indirecta de analizar los niveles de daño genético, es midiendo la capacidad de reparación mediante el denominado ensayo UDS (*unscheduled DNA síntesis/síntesis del DNA no programada*), El ensayo se basa en la incorporación de ^3H -timidina, fuera de la fases donde se asume que si hay incorporación de timidina tritiada es porque existe daño que se está reparando por el mecanismo de reparación por escisión. Se han encontrado 5 estudios en la literatura que evalúan la reparación en poblaciones de pacientes con IRC con este método, el primero es de 1988 por Friedman *et al.* donde se analizó a una población de 21 pacientes con IRC de los cuales 11 estaban bajo HD, encontrándose un índice de reparación del DNA menor en los pacientes que en la población control. Posteriormente, Zevin *et al.* (1991), estudiaron una población de 32 pacientes, 10 de ellos con IRC, 11 bajo HD y 11 bajo diálisis peritoneal (DP), encontrando que hay un menor índice de reparación en los pacientes sin HD, y que en los pacientes bajo tratamiento de diálisis, la reparación es similar a la encontrada en los controles. En el estudio de Malachi *et al.* (1993) se llegó a las mismas conclusiones que en el de Zevin *et al.*, en una población de 21 pacientes con IRC de los cuales 10 se encontraban bajo HD. Vamvakas *et al.* (1996) estudiaron a una población de 60 pacientes en HD, analizando principalmente las diferencias entre tres grupos, de acuerdo al tiempo en HD, donde se mostró una disminuida reparación del DNA en los pacientes con poco tiempo (< 3 meses) de haber

iniciado HD, comparados con los que tienen más de 120 meses bajo HD. Así mismo, se analizó el efecto de los inmunosupresores administrados a los pacientes trasplantados. Por último, recientemente se ha publicado el último estudio que encontramos con esta técnica (Herman *et al.*, 2008), donde se analizó a una población de 17 pacientes antes y después de una sesión de HD, encontrando que los niveles de reparación del DNA disminuyen inmediatamente después de una sesión de tratamiento con HD.

Otra forma indirecta en la que se midió daño genético en pacientes con IRC, fue evaluando la presencia de la 8-OHdG en DNA de leucocitos, un producto de la oxidación del DNA. Tarn *et al.* han publicado tres estudios con esta técnica; en su trabajo de 2000 estudiaron una población de 131 pacientes con IRC, de los cuales 109 estaban bajo HD, encontrando mayores niveles de 8-OHdG en los pacientes que en la población control; así mismo los pacientes que se encuentran bajo HD, tienen también mayores niveles de guanina oxidada. En el estudio del 2001, obtuvieron resultados similares en una población de 112 pacientes bajo HD, encontrando una vez más que los pacientes bajo HD tienen mayores niveles de 8-OHdG que los controles. Finalmente en el estudio del 2002, llevado a cabo con una población de 64 pacientes, de los cuales 42 estaban en DP, encontraron que los niveles de 8-OHdG se correlacionan negativamente con el aclaramiento de creatinina siendo mayores en los pacientes bajo DP que en los pacientes sin HD, seguido de los controles. Domenici *et al.* (2005) estudiaron una población de 51 pacientes, 22 en diálisis peritoneal (DP) y 20 en HD convencional, observando que los niveles de 8-OHdG en pacientes bajo DP o HD son mayores que los de la población control y que éstos disminuyen con la suplementación de vitamina E. Por último, Kuo *et al.* (2008) han estudiado a 110 pacientes bajo HD en los cuales se evaluó principalmente el efecto de las infusiones de hierro que reciben algunos pacientes durante su sesión de HD, encontrando que en estos pacientes los niveles de 8-OHdG son dependientes de la dosis de hierro administrada.

Otro tipo de estudios que se han llevado a cabo con pacientes con IRC son los que estudian la inducción de daño genético primario usando el

ensayo del cometa (EC). Este ensayo detecta fundamentalmente, roturas de simple y doble cadena y sitios alcali-lábiles, (Singh *et al.*, 1988; Collins, 2004) y, debido a su simplicidad y sensibilidad, su uso se está extendiendo en los estudios encaminados a detectar genotoxicidad. El primer estudio llevado a cabo con el EC en pacientes con IRC lo realizaron Stopper *et al.* (2001), analizando una población de 64 pacientes de los cuales 26 estaban bajo HD y 15 en HDF. Encontraron una tendencia en los pacientes a tener mayores niveles de daño genético que los controles, así como que el daño se correlaciona positivamente con los niveles de creatinina y con el tiempo en HD. En el trabajo de Kan *et al.* (2002) se observaron mayores niveles de daño genético en 36 pacientes con IRC bajo HD que en una población control, demostrando que el daño disminuye con la suplementación con vitamina E pero, al estudiar la asociación entre daño y el tiempo en HD, no encontraron ninguna correlación significativa. Muller *et al.* (2004) estudiaron una población formada exclusivamente por pacientes bajo HD, encontrando que los niveles de daño son mayores en los que reciben infusiones de hierro y, al comparar el uso de diferentes membranas, mostraron que los niveles de daño fueron mayores en los pacientes que usaban las de celulosa. En el estudio de Schupp *et al.* (2006) se estudió una población pequeña (de 11 pacientes bajo HD) analizando principalmente los niveles de daño genético al iniciar la HD, donde sólo se encontró una tendencia a disminuir el daño; sin embargo, no encontraron ninguna diferencia al cambiar de HD convencional a HD diaria. Kobras *et al.* (2006), también estudiaron una población pequeña (de 12 pacientes bajo HD y HDF) en la que no encontraron diferencias al cambiar de técnica de HD a HDF. Bagatini *et al.* (2008) analizaron a una población de 25 pacientes que, además de IRC también padecían diabetes, mostrando que los niveles de daño aumentan después de una sesión de HD y que estos niveles disminuyen después de 48 hrs posteriores a la sesión. Por último, un estudio realizado recientemente en nuestro grupo de investigación, Stoyanova *et al.* (2009) y utilizando el EC en el análisis de una población de 141 pacientes con IRC, de los cuales 77 estaban bajo HD, ha mostrado una correlación significativa entre los niveles de daño genético y la progresión de la enfermedad. El trabajo muestra que los niveles de daño son mayores en los

pacientes bajo HD y estos se correlacionan negativamente con el tiempo bajo HD.

Otra categoría de estudios sobre el tema, la componen dos estudios que miden roturas en el DNA no genómico, evaluando el daño inducido en el DNA mitocondrial. Así, el estudio de Lim *et al.* (2000) incluyendo a 22 pacientes con IRC, mostró que hay una mayor inestabilidad genética en los pacientes que la observada en una población control. El estudio de Liu *et al.* (2001) se llevo a cabo con una población de mayor tamaño (162 pacientes) mostrando también que hay una mayor inestabilidad genética en los pacientes que en controles; sin embargo, no detectaron diferencias entre los pacientes bajo HD y los pacientes sometidos a DP.

Por último, se ha encontrado un estudio que evalúa variaciones en la longitud telomérica, que se considera un parámetro que más que daño indica inestabilidad genómica. Así, su disminución está relacionada con la edad y la muerte celular por lo que supone un índice de inestabilidad genómica Boxall *et al.* (2006) analizaron la longitud telomérica de 38 pacientes con IRC bajo HD, sin encontrar diferencias entre estos y los controles; tan sólo se observó una correlación entre el acortamiento telomérico y el tiempo en HD.

5.3. El ensayo de micronúcleos como biomarcador de daño genético fijado

Como se ha visto en el apartado anterior, prácticamente todos los estudios citados son indicadores de daño genómico primario, sin mucha relevancia, para la integridad de la célula y el organismo que la porta, dado que se pueden separar fácilmente. Una manera de medir el daño genómico con relevancia en salud humana, en términos de riesgo, es utilizar indicadores de efecto genotóxico fijado, como pueden ser las aberraciones cromosómicas y los micronúcleos. No se ha encontrado ningún trabajo que haya utilizado la detección de aberraciones cromosómicas en pacientes con IRC, pero si los micronúcleos que, como se ha visto a lo largo del texto, son resultado de dos mecanismos importantes en toxicología genética, como la clastogénesis y la

aneuploidía, y se han revelado como buenos indicadores de riesgo de cáncer (Bonassi *et al.*, 2005; 2007).

El ensayo de MN, debido a su precisión, forma parte de la batería de ensayos de genotoxicidad reconocida por la OECD (1997). La gran cantidad de ventajas que ofrece, que se pueden reducir a fiabilidad y bajo coste, han contribuido a su éxito y adopción internacional como biomarcador para estudios sobre daño genético. Especialmente relevante, resulta el hecho de que se considera un biomarcador capaz de predecir el riesgo de cáncer como ya se ha indicado (Bonassi *et al.*, 2005; 2007). El ensayo de MN, está sustituyendo al de aberraciones cromosómicas siendo también utilizado para detectar el daño genético inducido por la radiación ionizante (Mozdarani *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2004; 2008). Dada su relevancia en la detección de daño genético, no es extraño que el ensayo de MN se haya utilizado también en estudios con pacientes con IRC.

La mayoría de estudios publicados hasta la fecha con el ensayo de micronúcleos, respecto a daño genético en pacientes con IRC, se dedican a analizar los efectos del tratamiento con HD y otras técnicas alternativas como la HDD (HD diaria), la HDF (hemodiafiltración) y la DP (diálisis peritoneal). El primer estudio encontrado, que utilizó el ensayo de MN fue publicado en 1999 por Stopper *et al.* donde se analizó a una población de 35 pacientes con IRC de los cuales 16 se encontraban bajo tratamiento con HD, los resultados de este estudio mostraron un mayor daño en los pacientes que en los controles pero, al realizar una regresión entre la frecuencia de MN y los valores de creatinina, no se encontró ninguna asociación. Posteriormente en 2005 Fragedaki *et al.* realizaron un estudio donde compararon 13 pacientes bajo HDD con 12 pacientes bajo HD convencional, complementando su estudio con la medición de los niveles de AGE en los pacientes; sus resultados mostraron que los pacientes bajo HDD tienen una frecuencia de MN mas baja que los que están bajo HD convencional, atribuyendo los resultados a que los niveles de AGE eran más altos en los pacientes bajo HD convencional. Kobras *et al.* (2006) publicaron un estudio realizado en una población pequeña, comparando sólo 5 pacientes bajo HD con 7 bajo HDF, encontrando que

éstos tienen mayores frecuencias de MN que los 4 controles analizados y, aunque sus resultados reflejaron una tendencia a disminuir con la HD y que el cambio de técnica de HD a HDF no supone alteraciones en los MN, se puede considerar que el número de pacientes analizados es demasiado pequeño para dar valor a cualquier tendencia encontrada. Schupp *et al.* (2006), también analizaron una población similar (de 5 pacientes bajo HD y 7 bajo HDF), encontrando que los pacientes presentan una frecuencia de MN mayor que los controles, y que la iniciación en HD, o el cambio de HD a HDF no supone ninguna variación en los niveles de MN. El mismo grupo publicó dos estudios en 2008, en el primero se analizó una población de 28 pacientes, 15 en HDD y 13 en HD convencional, observando que los valores de MN son mayores en los pacientes bajo HD convencional que en los pacientes bajo HDD, y que en los controles; además, encontraron que el daño disminuye con la suplementación con vitamina B así como al cambiar el medicamento angiotensina II por el cadesatran. En el segundo trabajo estudiaron a una población de 38 pacientes bajo HD analizando los efectos de la suplementación con vitamina B, mostrando que la frecuencia de MN disminuye con la administración de vitamina B en los pacientes bajo HD.

Dos de los estudios encontrados, se enfocan a estudiar el daño oxidativo, (Schupp *et al.*, 2008 a y b), donde se analiza el efecto de la suplementación con vitamina B1 en 38 pacientes bajo HD, encontrando que la frecuencia de MN disminuye después de 3-6 meses de suplementación de este antioxidante. Lo mismo sucede con la suplementación con ácido fólico y vitamina B12, durante 12 semanas que también disminuye la frecuencia de MN (Stopper *et al.*, 2008).

Finalmente, se ha encontrado un estudio que utiliza el ensayo de MN, pero no en linfocitos de sangre periférica, sino en células de la mucosa bucal, Roth *et al.* (2008). En este trabajo se estudió a 40 pacientes (20 bajo HD y 20 bajo DP), observándose un mayor daño genético en pacientes que en controles. Al hacer una comparación entre un grupo de pacientes que lleva 6 años bajo HD y otro con 7 años, se concluye que el daño genético se correlaciona positivamente con el tiempo en HD.

De los estudios anteriores, podemos decir que en casi todos los que incluyen una población control, se encontraron resultados similares a los nuestros, es decir que los pacientes con IRC (bajo HD o no), tienen mayor frecuencia de MN. Sin embargo, debemos recalcar que el número de pacientes analizados en estos estudios, es muy bajo ya que el mayor fue de 40, y no se llevó a cabo en linfocitos, sino en células de la mucosa bucal.

Aunque existen trabajos que relacionan la patología de la IRC con un incremento en el daño genético, el tamaño de los grupos de pacientes estudiados no les permitió encontrar ninguna asociación con la progresión de la enfermedad. Gracias al tamaño de nuestra población ha sido posible llevar a cabo la estratificación de los pacientes en grupos, de acuerdo a su filtrado glomerular, observando una asociación positiva con la progresión de la enfermedad. Esto nos permite concluir que el empeoramiento de la patología se asocia con un incremento del daño genético. Se han propuesto diversas hipótesis para explicar esta asociación, ligando los niveles de daño con la presencia de distintos productos del metabolismo como son los compuestos carbonilo reactivos (RCO), los productos finales de la glicación avanzada (AGE), y los productos de la lipoxidación avanzada (ALE), que poseen la capacidad de interactuar con el DNA formando aductos (Fragedaki *et al.*, 2005; Sebekova *et al.*, 2007). Otra posible fuente de daño genético asociado a la patología podría ser el daño oxidativo, resultado de un desequilibrio entre factores pro y antioxidantes, que se ha encontrado en los pacientes con IRC (Panzetta *et al.*, 1995; Hashimoto *et al.*, 1996; Ong-Ajyooth *et al.*, 1996; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 1997; Annuk *et al.*, 2001; Zorrilla *et al.*, 2004). Esto ha sido recientemente observado por nosotros utilizando el ensayo del cometa complementado con enzimas FPG y endo III, que reconocen lesiones específicas (de tipo oxidativo) en las bases del DNA (Stoyanova *et al.*, 2009). La existencia de factores genotóxicos en el plasma de los pacientes con IRC vendría avalada por la disminución observada en el índice de proliferación celular (CBPI), lo que se considera como una medida indirecta de citotoxicidad (Surrallés *et al.*, 1995). Estos resultados confirmarían el efecto de la acumulación de toxinas en los pacientes con IRC, ya que el CBPI de los linfocitos de los pacientes es significativamente menor ($P < 0,001$) que el

observado en los controles, y que entre los pacientes, tratados o no con HD, no existen diferencias.

La correlación entre el daño genético y la progresión de la enfermedad encontrada en nuestro estudio, viene modulada por los niveles de creatinina y el FG, lo que está de acuerdo con lo encontrado por Cengiz *et al.* (1988), Stopper *et al.* (2001) y Tarn *et al.* (2002). Aunque, existe un estudio en el que no se encontró ninguna correlación con las concentraciones de creatinina (Stopper *et al.*, 1999), esto podría atribuirse al bajo número de pacientes (35) incluidos en el estudio. Cabe mencionar que en estos estudios sólo se analizó la creatinina y en ninguno de ellos se ha tomado en cuenta el parámetro de filtrado glomerular (FG), que es el que se utiliza en la evaluación clínica de la función renal y en la clasificación por estadios de la IRC (K/DOQI, 2002).

Los estadios de la IRC van desde un FG que se considera normal o ligeramente bajo, donde la mayoría de personas que los padece aún no presentan síntomas, hasta la fase terminal (estadio 5), donde el paciente se encuentra en un estado de uremia. Para analizar que sucede con los niveles de daño en las etapas iniciales se han agrupando los estadios 1 y 2, y se han comparado con los pacientes en estadio 3 de IRC, sin que se hayan encontrado diferencias significativas en la frecuencia de BNMN; cosa que si sucede al compararse con el estadio 4 y con el 5. Esto podría indicar que las diferencias en la frecuencia de daño se empiezan a manifestar a partir de que los pacientes empiezan a sufrir las complicaciones de la patología, es decir a partir de la uremia crónica, porque supone un incrementado en el estrés oxidativo, aumento en los productos carbonilo reactivos (RCO) por peroxidación de lípidos o auto-oxidación de glucosa, que generalmente se están presentes en las fases avanzadas de la patología (Panzetta *et al.*, 1995; Ongajooth *et al.*, 1996; Ong-awyoorth *et al.*, 1997; Peuchant *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 1998; Miyata *et al.*, 1999; Annuk *et al.*, 2001).

A pesar de que hemos encontrado una asociación directa entre el daño genómico y el desarrollo de la patología, es necesario conocer si los pacientes ya poseen una cierta inestabilidad genética, que sería consecuencia del

desarrollo de la patología. Esta propuesta explicaría la elevada incidencia de cáncer observada entre los pacientes con IRC (Port *et al.*, 1989; Levine, 1992; Marple y MacDougall, 1993; Ishikawa, 1993; Vamvakas *et al.*, 1998; Maissonneuve *et al.*, 1999). Por lo tanto, es imprescindible conocer si los pacientes con IRC presentan un grado de inestabilidad genómica mayor que el de la población control, así como determinar si esta inestabilidad aumenta con el desarrollo de la patología.

5.4. Inestabilidad genómica en los pacientes con IRC

Existen múltiples maneras de evaluar la inestabilidad genómica de un determinado individuo pero, sin duda alguna, la respuesta frente a una dosis definida de un agente genotóxico es una de las más utilizadas. Esta respuesta frente a una dosis estimuladora de la respuesta nos permite clasificar a un individuo como resistente, normal, o sensible, en función del grado de respuesta. Aunque en principio cualquier agente genotóxico puede ser utilizado, el empleo de radiación ionizante ofrece algunas ventajas dado que es un mutágeno potente y "limpio" en el sentido de evitar las complejas reacciones que un agente químico puede tener con los distintos blancos celulares, fuera del DNA.

Como era de esperar, la dosis de radiación aplicada incrementó significativamente los niveles de daño (MN), tanto en los controles como en los pacientes. Sin embargo, los resultados observados en nuestro estudio muestran que los incrementos obtenidos entre los pacientes con IRC son mayores que los obtenidos en la población control. Por tanto, nuestros resultados muestran, por primera vez, que los pacientes con IRC presentan inestabilidad genómica manifestada como radiosensibilidad frente a la radiación ionizante.

Es interesante remarcar que al realizar un análisis multifactorial tomando en cuenta diversos factores de confusión encontramos que, sólo la patología influye de manera significativa en el daño genotóxico inducido por la radiación. Otros factores de confusión como el género y la edad, que en

nuestro caso influyen significativamente en la frecuencia basal de BNMN, como se ha citado por diversos autores (Migliore *et al.*, 1991; Bonassi *et al.*, 2001; Bukvic *et al.*, 2001), no afectan a la radiosensibilidad individual. Por el contrario, la incidencia de cáncer, que es un factor ligado a la inestabilidad genómica, es un factor con un peso significativo en la radiosensibilidad observada entre los pacientes analizados

Para tratar de determinar si existía algún factor que modulase la radiosensibilidad individual, se procedió a analizar el comportamiento de aquellos factores que habían mostrado un papel significativo sobre los niveles basales de BNMN, sin embargo, cuando se analizó el papel de la creatinina o del filtrado glomerular, no se encontró que la radiosensibilidad se asociará a estos parámetros. Algo similar sucede al relacionar la radiosensibilidad con la progresión de la patología, ya que aunque los valores de radiosensibilidad aumentan en el estadio 3, disminuye en los estadios 4 y 5, lo cual se puede atribuir a una saturación del daño o muerte celular. En el análisis del incremento relativo se encontró que éste sigue una tendencia opuesta al incremento, ya que en los estadios donde los niveles daño basal son bajos, éstos podrán multiplicar sus niveles basales más veces, que los estadios con niveles de daño basal elevados.

5.5. Papel de la HD en los niveles de daño y la radiosensibilidad

En la mayoría de estudios en pacientes con IRC, uno de los factores que se analiza con más énfasis es el papel que juega la HD en los efectos secundarios de la patología, incluidos los efectos genotóxicos. Sin embargo, estos estudios sólo incluyen en su población pacientes bajo tratamiento con HD, por lo cual, no se comparan con pacientes que aún no inician la HD. Entre ellos podemos destacar los de Vamvakas *et al.* (1996), Tarn *et al.* (2001), Kan *et al.* (2002), Muller *et al.* (2004), Domenici *et al.* (2005), Boxall *et al.* (2006), Buemi *et al.* (2006), Pernice *et al.* (2006), Kuo *et al.* (2008), Herman *et al.* (2008) Bagatini *et al.* (2008), Kobras *et al.* (2006), Scupp *et al.* (2006; 2008) y Roth *et al.* (2008). En algunos estudios se mide el daño antes y después de la HD como sucede en los de Buemi *et al.* (2006), Pernice *et al.* (2006) Herman *et*

al. (2008) y Bagatini *et al.* (2008), demostrando que gran parte del daño es reparable, como se demuestra claramente en el trabajo de Bagatini *et al.* (2008), donde se observó que el daño incrementa inmediatamente después de la sesión de HD, lo que se considera consecuencia de efectos prooxidantes generados por la HD; pero, lo más interesante del estudio es que el daño disminuye significativamente después de 48 horas de la sesión de HD. Esto se explicaría asumiendo que el daño inducido es oxidativo, dado que se repara rápidamente (Gaivão *et al.*, 2009). Basándose en la propuesta de que gran parte del daño es oxidativo, otros estudios enfocan el análisis del daño genético en pacientes bajo HD, utilizando la suplementación con antioxidantes para reducir los efectos. Realmente esta reducción se consigue, confirmando que el daño producido por la HD es verdaderamente oxidativo (Kat *et al.*, 2002; Domenici *et al.*, 2005; Scupp *et al.*, 2008 a y b; Stopper *et al.*, 2008).

En nuestro estudio hemos analizado este efecto, de tres formas distintas, la primera aproximación la hemos hecho comparando al grupo de pacientes bajo HD con aquellos pacientes que se encuentran en el mismo estadio de la IRC, pero que no reciben tratamiento con HD. De esta forma vemos el efecto del tratamiento (no el efecto acumulativo de lo que conlleva ser paciente y estar bajo HD comparado con una persona sana) y, aunque no encontramos diferencias significativas entre estos grupos, se refleja una clara tendencia a disminuir la frecuencia de BNMN con el tratamiento. Este resultado es similar a los observados por Zevin *et al.* (1991) y Malachi *et al.* (1993) con el ensayo de UDS, y por Kobras *et al.* (2006) y Scupp *et al.* (2006) con el ensayo de MN.

La segunda forma de ver el efecto de la HD, fue analizando en toda la población bajo HD, la relación entre la frecuencia de BNMN basales o el incremento por radiación y el periodo de tiempo que llevan los pacientes bajo este tratamiento. No se encontró una correlación significativa con ninguno de los dos parámetros, y esto puede deberse a que contamos con pocos pacientes que lleven periodos largos bajo HD, ya sea por la alta mortalidad en esta población o porque reciben un trasplante. Sin embargo, como en el caso

anterior también se pudo apreciar la tendencia de la frecuencia de BNMN a disminuir con el tiempo en HD. Por el contrario, el incremento de daño por la radiación tiende a aumentar con el tiempo en HD. Estudios respecto al tiempo bajo HD y los niveles de daño basales se han llevado a cabo por Vamvakas *et al.* (1996) midiendo el daño genético indirectamente (UDS), al analizar 3 grupos de pacientes con distintos tiempos bajo HD (< 3, 3-12 y >120 meses) donde se encontró que los pacientes con menos de 3 meses bajo tratamiento tienen una reparación del DNA disminuida, comparados con los que tienen más de 120 meses. Entre los estudios que evaluaron los efectos del tiempo en HD respecto al daño genético está el de Stopper *et al.* (2001), quienes encontraron una tendencia contradictoria a la nuestra, es decir que el daño genético incrementaba con el tiempo bajo HD en un grupo de 8 pacientes con 10 años en HD; sin embargo, el bajo tamaño de la muestra poco valor a estos resultados. Bagatini *et al.* (2008) mostraron que los niveles de daño aumentan después de una sesión de HD, pero que éstos disminuyen en 48 hrs. Sin embargo estos estudios se han hecho con el ensayo del cometa, que mide daños distintos al evaluado por los MN. El trabajo de Boxall *et al.* (2006) muestra, como medida de inestabilidad genómica, que la longitud telomérica aumenta con el tiempo en HD, pero esto puede atribuirse al hecho de que la longitud telomérica está correlacionada con la edad como han encontrado algunos autores (Aubert y Lansdorp, 2008; Oeseburg *et al.*, 2009). Otro estudio que debe tenerse en consideración es el de Roth *et al.* (2008) quienes encontraron mayores frecuencias de MN en la mucosa bucal de un grupo de pacientes con 7 años bajo HD, al compararlo con otro de 6 años. Sin embargo, ninguno de estos trabajos citados incluye un número tan elevado de pacientes como el nuestro, lo que les imposibilita el buscar asociaciones daño/tiempo en HD. En este contexto de tamaño de poblaciones se debería contemplar la relevancia de nuestros resultados.

La tercera forma de analizar el efecto del tiempo bajo HD, consistió en analizar nuevamente a 33 pacientes en HD después de un año; teniendo así la oportunidad de hacer comparaciones de un mismo grupo de población a lo largo del tiempo. En este estudio se encontró que la frecuencia de BNMN disminuye después de un año, aunque la diferencia no llega a ser significativa.

Esto estaría de acuerdo con la tendencia general antes indicada. Analizando los resultados individuales, encontramos que en la mayoría de los pacientes (en 24) los niveles de daño disminuyen después de un año pero, al analizar detenidamente a los 9 pacientes en los que el daño aumentó, encontramos que cuatro de ellos son pacientes con patología cancerosa y el resto son pacientes muy afectados por las patologías adicionales a la IRC, ya que padecen 2 ó 3 de ellas a la vez. Esto confirmaría que el proceso de HD lleva a una reducción progresiva del daño, posiblemente por la eliminación de aquellos factores genotóxicos involucrados en el daño medido en los pacientes con IRC.

En cuanto a los incrementos de inestabilidad genómica observados mediante la radiosensibilidad de los pacientes bajo HD, de los 33 pacientes en los que se llevó a cabo el seguimiento a lo largo de un año, sólo fue posible analizar la radiosensibilidad en 20 pacientes encontrando una disminución significativa de los efectos de la radiación después de un año bajo HD, lo que estaría de acuerdo con la tendencia general observada. Al analizar a los pacientes individualmente se encontró que el incremento por radiación disminuyó en 15 pacientes y aumentó en 5 pacientes, al analizarlos detenidamente descubrimos que 4 de ellos tienen más de 70 años, donde 3 padecen cáncer y uno padece de diabetes, dislipemia e hipertensión; el otro paciente que mostró un incremento por radiación, se trata de un hombre de 43 años que hasta el momento del muestreo sólo padecía hipertensión, por lo cual sólo se puede deducir que al ser un individuo con tal aumento en su radiosensibilidad desarrollado en un año, probablemente es más susceptible a desarrollar un cáncer.

5.6. Posibles factores moduladores del daño observado en los pacientes con IRC

La edad, es uno de los factores que se sabe que influye en la expresión del daño genético medido como BNMN (Migliore *et al.*, 1991; Bonassi *et al.*, 2001; Bukvic *et al.*, 2001), y esto se vio reflejado en nuestro estudio. Aunque nuestra población se encuentra dentro de un rango de edad avanzada, en el

análisis multifactorial llevado a cabo, mostró tener una influencia significativa sobre los BNMN, lo que se confirmó al realizar una regresión lineal entre la edad y la frecuencia de BNMN. Sorprendentemente la edad no ha mostrado ser un factor que incremente los niveles de daño ocasionados por la radiación, ya que en ninguno de los análisis esta radiosensibilidad mostró estar influenciada por la edad, ni en el análisis multifactorial, ni realizando la regresión entre el incremento de daño y la edad. Nuestros resultados son interesantes, desde el punto de vista de que parecen corroborar la hipótesis lanzada por algunos grupos, de que la capacidad de reparación disminuye con la edad y eso se reflejaría en incrementos del daño en pacientes con edades más avanzadas; pero, si la causa principal fuera la disminución en la capacidad de reparar, deberíamos haber observado un incremento de la radiosensibilidad, cosa que no hemos detectado. Por lo tanto, al menos en los pacientes con IRC, la edad no parece modificar la radiosensibilidad de los mismos.

La edad podría ser un factor que influyese en el incremento del daño en función del grado de la IRC, por lo que se analizó su influencia en cada estadio, observándose que hasta el estadio 3 la media de edad incrementa con la progresión de la enfermedad, pero en el estadio 4 y el 5, la media de edad disminuye dejando en evidencia que además de la edad debe haber otros factores que influyen en la progresión de la patología. Recordemos que aparte de los factores de iniciación de la IRC, se encuentran los factores de progresión, que causan un descenso más rápido de la función renal después de iniciado el daño renal. Algunos de estos factores son el nivel alto de proteinuria, mayor presión arterial, poco control glicémico en diabetes y el tabaquismo, entre otros (Levey *et al.*, 2003).

El IMC es un parámetro al que últimamente se le está prestando atención debido a la creciente epidemia de obesidad, ya que ésta es un factor de riesgo para enfermedades crónicas (además de la IRC) como la ECV, la diabetes y algunos tipos de cáncer como el de endometrio, de mama y de colon (OMS, 2006). Al clasificar a la población en grupos de infrapeso, peso normal o sobrepeso, de acuerdo a los valores de IMC señalados por la

Organización Mundial de la Salud, no se encontró ninguna asociación con la frecuencia de BNMN y, aunque el incremento por la radiación reflejó una cierta asociación con el peso, no se encontraron efectos significativos. No podemos contrastar nuestros resultados con datos bibliográficos ya que no se han encontrado estudios sobre los efectos a nivel de daño genético respecto al IMC.

Los pacientes con IRC generalmente, presentan diversas patologías asociadas que podrían ser parte de la causa del daño genético observado en estos pacientes, por lo que un estudio de biomonitoreo debería tenerlas en cuenta. En nuestro estudio, las patologías que han mostrado tener una incidencia sobre la frecuencia de BNMN han sido la dislipemia y el cáncer. Si bien el cáncer es fácilmente atribuible a un incremento en el daño genético, más complejo es explicar el papel de la dislipemia. La dislipemia, es un trastorno en el metabolismo de lípidos, que lleva al paciente a tener elevados niveles de lípidos, y esto podría ocasionar una mayor producción de compuestos carbonilo reactivos (RCO), formados por la oxidación de lípidos y carbohidratos, conduciendo indirectamente a una glicación o lipoxidación avanzada de proteínas, llegando a los productos finales AGE/ALE, los cuales están asociados a los niveles de daño genético (Fragedaki *et al.*, 2005). La IRC causa en el paciente una disminuida capacidad de aclaramiento o de desintoxicación de estos compuestos (Miyata *et al.*, 1999). Hay que recordar que la dislipemia está claramente asociada con la aterosclerosis (Ridker *et al.*, 2001) y que las enfermedades cardiovasculares están asociadas a la IRC y al daño oxidativo. Por lo tanto, los AGE circulantes en pacientes con IRC pueden promover la formación de LDL oxidativo (Bucala *et al.*, 1993) y la peroxidación lipídica se conoce que está ligada al incremento de daño en el DNA (Hadley y Draper, 1990; Chen *et al.*, 2000). De esta manera se podría explicar la asociación observada entre dislipemia y daño genético medido como incremento de la frecuencia de MN.

La relación entre cáncer y daño genético, en nuestros pacientes mostró ser clara; ya sea mediante el análisis multifactorial o como resultado de las pruebas de *t* realizadas tanto en el total de la población como las realizadas

con la población bajo HD. Como se ha comentado, éste es un resultado esperado, que se supone asociado con una baja capacidad de reparación de los pacientes con cáncer, con respecto a los individuos sanos. Una inestabilidad genómica subyacente, puede ser, entre otros factores, la responsable del desarrollo del cáncer en los pacientes con IRC, y de la mayor incidencia de BNMN. En el estudio de Bonassi *et al.* (2005) se concluye que la frecuencia de MN es un biomarcador capaz de predecir el riesgo de cáncer, o lo que es lo mismo, que los pacientes con cáncer se identifican por su elevada frecuencia de MN.

Un dato remarcable que se encontró en el análisis de asociación de la IRC con diversas patologías fue que en los pacientes con IRC que no están bajo HD, aquellos que padecen ECV tienen una frecuencia de BNMN menor. Lo cual se podría explicar por la presencia de menos niveles de agentes prooxidantes en el plasma. De acuerdo con la presencia de factores prooxidantes en los pacientes con IRC, esperábamos que los suplementos con antioxidantes disminuyeran la frecuencia de BNMN, o que actuaran como agentes protectores, en cuanto al incremento de daño inducido por la radiación. Sin embargo, los tratamientos con ácido fólico, con las vitaminas B, C y D no mostraron efectos significativos. En el caso de los suplementos hidrosolubles (vitaminas B y C) podría ser debido a que la mayoría de pacientes que las toma se encuentra bajo HD y, como es el caso del ácido ascórbico, éstos se filtran libremente y se pierden en el dializado. Así, los niveles en plasma de ácido ascórbico se reducen en un 33-50% durante la HD (Wang *et al.*, 2008; Du Plessis *et al.*, 2002) sumando una pérdida estimada de hasta 200 mg por semana; por lo cual, estos suplementos no se pueden considerar como una ingesta adicional, ya que son pacientes que tienen un déficit de estos suplementos, y que además, los pierden en cada sesión de HD. Por lo tanto, el concepto de suplemento, no tiene por objetivo incrementar los niveles de antioxidantes en plasma (por encima de los considerados normales en individuos control), si no tratar de mantener unos niveles mínimos de tales agentes para minimizar la pérdida generada por la HD. Desde este punto de vista, no es de extrañar la falta de asociación encontrada entre los niveles de daño genético y los suplementos con agentes antioxidantes.

Un resultado que requiere explicación es la alta frecuencia de BNMN y los elevados valores en el incremento del daño inducido por la radiación ionizante que se observaron en los pacientes que toman L-carnitina. La L-carnitina juega un papel importante en la transferencia de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial, permitiendo así la oxidación de las grasas. Participa asimismo en la regulación de la oxidación de la glucosa y, al remover el exceso de grupos acil que inhiben algunas enzimas clave mitocondriales, como la piruvato deshidrogenasa, confiere protección a la estructura de las membranas y participa en los mecanismos de control del ciclo vital de la célula (Matera *et al.*, 2003). En los individuos sanos su síntesis es intrarrenal a partir de los aminoácidos metionina y lisina, obtenidos principalmente de carnes rojas y la IRC reduce su síntesis; la IRC además, afecta la eliminación de la acilcarnitina, incrementándose esta fracción en sangre, con niveles normales o elevados cuando realmente la contenida en los músculos está disminuida. Las restricciones dietéticas disminuyen su consumo, y la HD promueve pérdidas excesivas de carnitina, puesto que el dializador no permite la reabsorción de esta sustancia, por lo que es necesaria la suplementación (Vernez *et al.*, 2006; Fornasini *et al.*, 2007). Es por eso que la L-carnitina se utiliza en el paciente renal con la finalidad de mejorar varios aspectos de la enfermedad como, la anemia, la hipotensión, los calambres musculares, las anormalidades en el perfil de lipídico y la disfunción cardíaca. En la biosíntesis de carnitina participan la vitamina C, la niacina, la piridoxina, el hierro y los folatos (Matera *et al.*, 2003); así, algunos estudios han mostrado que la suplementación con L-carnitina, incrementa el hematocrito, disminuye la dosis de eritropoyetina, mejora la tolerancia al ejercicio, disminuye la presencia de calambres y mejora las anormalidades de los lípidos (disminuye triglicéridos y colesterol). Además, su uso se ha asociado con la disminución de la inflamación (disminución de la proteína C reactiva) y mejoría del estado nutricional en pacientes en hemodiálisis (Savica *et al.*, 2005; Sakurabayashi *et al.*, 2008). Aunque no se ha encontrado ningún estudio que relacione los niveles de L-carnitina con el daño a nivel genómico, su papel en la oxidación lipídica podría explicar la asociación encontrada en nuestro estudio.

En algunos casos, los tratamientos farmacológicos pueden tener efectos secundarios, manifestados como incrementos en los niveles de daño genético. No parece ser este nuestro caso ya que ninguno de los fármacos estudiados ha mostrado influenciar los niveles de daño genético. Entre los medicamentos analizados se encuentran a) la eritropoyetina, que se utiliza para mejorar la calidad de vida del paciente bajo HD mejorando el apetito, la capacidad de trabajo, la tolerancia al ejercicio, la función cardiaca, la función cognitiva, la depresión y el ritmo de sueño; b) los inhibidores del sistema renina-angiotensina, utilizados como tratamiento de la hipertensión y para frenar la progresión de la IRC; c) la estatina, subministrada para disminuir del colesterol y el sevelamer, indicado en el control de la hiperfosfatemia. Como se ha comentado, ninguno de ellos mostró una influencia sobre la frecuencia de BNMN en ninguno de los grupos de población estudiados. Sin embargo, aquellos individuos de la población control que toma inhibidores del sistema renina-angiotensina reflejaron incrementos significativos de la radiosensibilidad, lo cual se puede atribuir a que se trata de la población que sufre de hipertensión, por lo que podría deberse a la enfermedad, mas que al tratamiento farmacológico per se.

El tabaquismo es un factor clásicamente incluido en los estudios de biomonitorización por lo que también se ha considerado en nuestro trabajo. No se ha comprobado que el hábito tabáquico afecte significativamente a la frecuencia de MN, habiéndose llegado a la conclusión de que sólo se observan diferencias en los fumadores habituales que consumen 30 ó más cigarrillos/día (Bonassi *et al.*, 2003). En nuestro estudio sólo contamos con información acerca del estatus de fumador o no fumador, en la población de pacientes con IRC y, al analizar el efecto de este parámetro en los niveles de daño genético, al igual que sucede en la mayoría de estudios no se han encontrado diferencias significativas en la frecuencia de BNMN basales ni con el parámetro de incremento por la radiación.

Otra característica asociada a los pacientes con IRC, es la existencia de individuos sometidos a un trasplante renal, que han vuelto a la HD. Entre los trasplantados existe un elevado riesgo de generar tumores secundarios entre

los que destacan los tumores cutáneos, y los trastornos linfoproliferativos postransplante (TLPT) que afectan entre un 1-10% de los trasplantados y son la causa más frecuente de muerte debida al cáncer después de un trasplante, con una mortalidad global superior al 50%. La inmunosupresión farmacológica, sobre todo con ciclosporina, y determinados virus como el de Epstein-Barr (VEB), están implicados en su patogénesis. Así, la inmunidad gravemente deprimida por la acción de los inmunosupresores incapacita al organismo para eliminar las células transformadas en malignas por la acción de diversos carcinógenos; los mismos inmunosupresores también pueden dañar directamente al DNA o incluso potenciar el efecto de otros agentes cancerígenos (Penn., 1994; Libertiny *et al.*, 2001; Opelz y Dohler., 2004; Messa *et al.*, 2008). Algunos de los fármacos inmunosupresores utilizados en los pacientes con trasplante renal que han mostrado como efecto secundario una incidencia aumentada de neoplasias son, los esteroides, la azatioprina, la ciclosporina y los anticuerpos poli o monoclonales (NAC-SEN, 2009). Sin embargo, estos efectos descritos no se han podido confirmar en nuestro estudio, ya que al comparar los pacientes que han vuelto a HD tras un trasplante fallido, con el resto de los pacientes bajo HD, no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de BNMN, lo que podría ser explicado porque al perder el injerto, estos pacientes no han estado sometidos a tratamientos con inmunosupresores durante mucho tiempo.

VI. CONCLUSIONES

En respuesta a los objetivos planteados, y como fruto de la discusión de los resultados obtenidos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La población con insuficiencia renal crónica estudiada muestra niveles de daño genómico, medidos como frecuencia de BNMN, significativamente mayores que los observados en la población control.
2. La frecuencia de daño genético (BNMN) en los pacientes con IRC, se correlaciona con la progresión de la patología (filtrado glomerular).
3. No se han encontrado diferencias en cuanto al daño genómico (BNMN), entre los individuos de la población que tienen un FG normal (estadios 1 y 2 de IRC) y aquellos que se encuentran en el estadio 3 de la patología. Las diferencias se manifiestan al compararse con los estadios avanzados (4 y 5); por lo que el desarrollo de la patología (estado urémico) es el principal responsable del incremento en la frecuencia de BNMN.
4. Los pacientes con IRC, bajo tratamiento con hemodiálisis convencional, muestran una disminución en la frecuencia de BNMN, respecto a los pacientes con estadio 5 no sometidos a diálisis.
5. En los pacientes con IRC sometidos a diálisis (HD), se encontró una correlación inversa entre la frecuencia de BNMN y el tiempo en HD.
6. La tendencia anterior se confirma en aquellos pacientes que se muestrearon después de un año bajo HD y mostraron una

tendencia a disminuir los niveles de daño genético (BNMN) después de dicho periodo.

7. Los pacientes con IRC estudiados son más radiosensibles que los individuos de la población control.
8. No se encontró una correlación entre la radiosensibilidad de los pacientes con IRC y la progresión de la patología.
9. El tratamiento con HD en nuestra población, no supone cambios en la radiosensibilidad de los pacientes con IRC.

VII BIBLIOGRAFÍA

- Albertini R.J., Nicklas J. A., O'Neill J. P. (1996) Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ. Health Perspect.* 104: 503-510.
- Alebiosu C. O; Ayodele O. E. (2005) The global burden of chronic kidney disease and the way forward. *Ethn. Dis.*15: 418-423.
- Alsbeih G., Malone S., Lochrin C., Girard A., Fertil B., y Raaphorst G. P. (2000) Correlation between normal tissue complications and in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts derived from radiotherapy patients treated for variety of tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 46: 143-152.
- Andersen M., Regueira T., Leighton F. (2006) Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Revista Médica de Chile.* 134: 649-656.
- Annuk M., Fellstrom B., Akerblom O., Zilmer K., Vihalemm T., Zilmer M. (2001) Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin. Nephrol.* 56: 308-314.
- Anraku M., Kitamura K., Shinohara A., Adachi M., Suenaga A., Maruyama T., Miyanaka K., Miyoshi T., Shiraishi N., Nonoguchi H., Otagiri M., Tomita K. (2004) Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int.*, 66: 841-884
- Atkins R. C. (2005) The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* 94: S14-S18.
- Aubert G., Lansdorp P. M. (2008) Telomeres and aging. *Physiol. Rev.* 88: 557-79.

- Baeyens A., Thierens H., Claes K., Poppe B., Messiaen L., De R. L., Vral A. (2002) Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. *Br. J. Cancer.* 87: 1379-1385.
- Bagatini P. B., Palazzo R. P., Rodrigues M. T., Costa C. H., Maluf S. W. (2008) Induction and removal of DNA damage in blood leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *Mutat. Res.* 657: 111-115.
- Baigent C., Burbury K., Wheeler D. (2000) Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet.* 356:147-152.
- Bakris G. L., Ritz E. (2009) Hypertension and kidney disease: a marriage that should be prevented. *Kidney International.* 75: 449-452
- Ban S., Konomi C., Iwakawa M., Yamada S., Ohno T., Tsuji H., Noda S., Matui Y., Harada Y., Cologne J.B., Imai T. (2004) Radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes obtained from patients with cancers of the breast, head and neck or cervix as determined with a micronucleus assay. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 45: 535-541.
- Barale R., Chelotti L., Davini T., Del Ry S., Andreassi M.G., Ballardini M., Bulleri M., He J., Baldacci S., Di Pede F., Gemignani F., Landi S. (1998) Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ. Mol. Mutagen.* 31: 228-242.

-
- Baverstock K. F., Will S. (1989) Evidence for the dominance of direct excitation of DNA in the formation of strand breaks in cells following irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 55: 563-568.
- Becker B. N., Himmelfarb J., Henrich W. L., Hakim R. M. (1997) Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 475-486.
- Bethesda M. (2007) U. S. Renal Data Systems. *USRD 2006 Annual Data Report.*
- Bierhaus A., Hofmann M. A., Ziegler R., Nawroth P. P. (1998) AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc. Res.* 37: 586-600.
- Bolognesi C., Perrone E., Landini E. (2002) Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis.* 17: 391-397.
- Bonassi S., Fenech M., Lando C., Lin Y. P., Ceppi M., Chang W.P. (2001) Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 37: 31-45.
- Bonassi S., Neri M., Lando C., Ceppi M., Lin Y. P., Chang W. P (2003) Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res.* 543: 155-166.

Bonassi S., Ugolini D., Kirsch-Volders M., Stromberg U., Vermeulen R., Tucker J.D. (2005) Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ. Mol. Mutagen.* 45: 258-270.

Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M.P., Bolognesi C., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M.R., Zijno A., Norppa H., Fenech M. (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 28: 625-631.

Bonnefont-Rousselot D., Jaudon M. C., Issad B., Cacoub P., Congy F., Jardel C., Delattre J., Jacobs C. (1997) Antioxidant status of elderly chronic renal patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12:1399-1405.

Bourguignon M. H., Gisone P. A., Perez M. R., Michelin S., Dubner D., Giorgio M. D., Carosella E. D. (2005a) Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity Part I: cell signalling in radiation response. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 32: 229-246.

Bourguignon M. H., Gisone P. A., Perez M. R., Michelin S., Dubner D., Giorgio M. D., Carosella E. D. (2005b) Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity. Part II: implications for clinical practice and radiation protection. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 32: 351-368.

-
- Boxall M.C., Goodship T. H., Brown A. L., Ward M. C., Von Z. T. (2006)
Telomere shortening and haemodialysis. *Blood Purif.* 24:185-189
- Brownlee M. (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging.
Annu Rev. Med. 46: 223-234.
- Bucala R., Makita Z., Vega G., Grundy S., Koschinsky T., Cerami A., Vlassara H.
(1994) Modification of low density lipoprotein by advanced glycation
end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal
insufficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9441-9445.
- Buccianti G., Maisonneuve P., Ravasi B., Cresseri D., Locatelli F., Boyle P. (1996)
Cancer among patients on renal replacement therapy: a population-
based survey in Lombardy, Italy. *Int. J. Cancer.* 66: 591-593.
- Buemi M., Floccari F., Costa C., Caccamo C., Belghity N., Campo S., Pernice F.,
Bonvissuto G., Coppolino G., Barillà A., Criseo M., Crascì E., Nostro L.,
Arena A. (2006) Dialysis-related genotoxicity: sister chromatid exchanges
and DNA lesions in T and B lymphocytes of uremic patients. *Genomic
damage in patients on hemodiafiltration. Blood Purif.* 24: 569-574.
- Bukvic N., Gentile M., Susca F., Fanelli M., Serio G., Buonadonna L., Capurso A.,
Guanti G. (2001) Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid
exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat. Res.* 498:
159-167.

- Cengiz K., Block A. M., Hossfeld D. K., Anthonie R., Anthonie S., Sandberg A. A. (1988) Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients. *Cancer Genet. Cytogenet.* 36: 55-67.
- CIHI. (2006) Canadian Institute for Health Information, 7th Annual Report on Canada's Health Care System.
- Chen K., Suh J., Carr A. C., Morrow J. D., Zeind J., Frei B. (2000) Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E1406-E1412.
- Cheung A. K., Sarnak M. J., Yan G., Dwyer J. T., Heyka R. J., Rocco M. V., Teehan B. P., Levey A. S. (2000) Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 58: 353-362.
- Cheung A. K., Sarnak M. J., Yan G., Berkoben M., Heyka R., Kaufman A., Lewis J., Rocco M., Toto R., Windus D., Ornt D., Levey A. S. (2004) Cardiac diseases in maintenance hemodialysis patients: results of the HEMO Study. *Kidney Int.* 65: 2380-2389.
- Clemens M. R. (1991) Free radicals in chemical carcinogenesis. *Klin. Wochenschr.* 69:1123-1134.
- Collins A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26: 249-261.
- Culotta E., Koshland D. E. Jr. (1994) DNA repair works its way to the top. *Science.* 266:1926-1929.

- Cusumano A. M., Gonzalez Bedat M. C. (2008) Chronic kidney disease in Latin America: time to improve screening and detection. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3: 594-600.
- Cusumano A., Garcia G. G., Gonzalez Bedat M. C. (2009) The Latin American Dialysis and Transplantation Registry Report 2006. *Ethn. Dis.* 19: s1-6.
- Dawnay A., Millar D. J. (1998) The pathogenesis and consequences of AGE formation in uraemia and its treatment. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 44:1081-1094.
- De la Chica R. A., Ribas I., Giraldo J., Egozcue J., Fuster C. (2005) Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA*, 293: 1212-1222.
- Domenici F. A., Vannucchi M. T., Jordao A. A. Jr., Meirelles M. S., Vannucchi H. (2005) DNA oxidative damage in patients with dialysis treatment. *Ren. Fail.* 27: 689-694.
- Douthat W. G., Alles A., Marinovich S., Tirado S., Penalba A., Prudkin S. (2003) Importance of the "adequate blood phosphorus" concept as a risk factor for hyperphosphatemia. *Nefrologia.* 23: 95-99.
- Du Plessis A. S., Randall H., Escreet E., Holl M., Conradie M., Moosa M. R., Labadarios D., Herselman M. G. (2002) Nutritional status of renal transplant patients. *S. Afr. Med. J.* 92: 68-74.

- Dubner D., Gisone P., Jaitovich I., Perez M. (1995) Free radicals production and estimation of oxidative stress related to gamma irradiation. *Biol. Trace Elem. Res.* 47: 265-270.
- Dunne A. L., Price M. E., Mothersill C., McKeown S. R., Robson T., Hirst D. G. (2003) Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells. *Br. J. Cancer.* 89: 2277-2283.
- Edelstein C. L., Ling H., Wangsiripaisan A., Schrier R. W. (1997) Emerging therapies for acute renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* 30: S89-S95.
- ERA-EDTA (2006) European Renal Association- European Dialysis and Transplant Association Registry Annual Report 2006. Disponible en: www.era-edta-reg.org
- Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 81-128.
- Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ. Health Perspect.* 101: 101-107.
- Fenech M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 20: 81-95.
- Fenech M. (2002) Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov. Today.* 22: 1128-1137.

- Fenech M., Crott J. W. (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504: 131-136.
- Fenech M., Neville S. (1992) Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 19: 27-36.
- Foley R. N., Parfrey P. S., Sarnak M. J. (1998) Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: S16-S23.
- Fornasini G., Upton RN., Evans A. M. (2007) A pharmacokinetic model for L-carnitine in patients receiving haemodialysis. *Br J. Clin. Pharmacol.* 64: 335-345.
- Fragedaki E., Nebel M., Schupp N., Sebekova K., Völkel W., Klassen A., Pischetsrieder M., Frischmann M., Niwa T., Vienken J., Heidland A., Stopper H. (2005) Genomic damage and circulating AGE levels in patients undergoing daily versus standard haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20: 1936-1943.
- Friedman J., Levi J., Malachi T., Slor H. (1988) Pronounced depressed ability of DNA repair in uremic human lymphocytes. *Transplantation.* 45: 665-666.
- Gaivão I., Piasek A., Brevik A., Shaposhnikov S., Collins A. R. (2009) Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol. Toxicol.* 25: 45-52.

- García F. (2004) El amenazante futuro del crecimiento de la insuficiencia renal crónica. *Nefrología Extrahospitalaria*. 12: 2004.
- Giacchino F., Formica M., Quarello F., Bonello F., Piccoli G. (1985) High incidence of cancer in uremic patients. *Clin. Nephrol.* 23: 265-266.
- Gugliucci A., Bendayan M., (1996) Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia*. 39:149-160.
- Gutiérrez V., Justo R. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31:126-133.
- Hashimoto H., Mio T., Sumino K. (1996) Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta*. 252:137-145.
- Draper H. H., Hadley M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186: 421-31
- Haugen E., Nath K. A. (1999) The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif.* 17: 58-65.
- Heidland A., Bahner U., Vamvakas S. (2000) Incidence and spectrum of dialysis-associated cancer in three continents. *Am. J. Kidney Dis.* 35: 347-351.

-
- Herman M., Ori Y., Chagnac A., Korzets A., Weinstein T, Malachi T., Gafter U., (2008) Spontaneous DNA repair increases during hemodialysis: *Nephron Clin. Pract.* 108: c188-c193.
- Himmelfarb J., Stenvinkel P., A. Ikizler T., Hakim R. M. (2002) The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* 62: 1524-1538.
- ICPEMC. (1983). Screening strategy for chemicals that are potential germ-cell mutagens in mammals. *Mutat. Res*, 144: 117-177.
- Inamoto H., Ozaki R., Matsuzaki T., Wakui M., Saruta T., Osawa A. (1991) Incidence and mortality patterns of malignancy and factors affecting the risk of malignancy in dialysis patients. *Nephron.* 59: 611-617.
- Iseki K., Osawa A., Fukiyama K. (1993) Evidence for increased cancer deaths in chronic dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 22: 308-313.
- Ishikawa I. (1993) Renal cell carcinoma in chronic hemodialysis patients—a 1990 questionnaire study in Japan. *Kidney Int. Suppl.* 41: S167-S169.
- Jacobson S. H., Moldeus P. (1994) Whole blood-, plasma- and red blood cell glutathione and cysteine in patients with kidney disease and during hemodialysis. *Clin. Nephrol.* 42:189-192.
- Jagetia G. C., Jayakrishnan A., Fernandes D., Vidyasagar M. S. (2001) Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat. Res.* 491: 9-16.

- Jaruga P., Dizdaroglu M. (1996) Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.* 24: 1389-1394.
- Jensen L. J., Ostergaard J., Flyvbjerg A. (2005) AGE-RAGE and AGE Cross-link interaction: important players in the pathogenesis of diabetic kidney disease. *Horm. Metab Res.* 37: s26-34.
- K/DOQI (2002) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* 39: S1-266.
- Kan E., Undeger U., Bali M., Basaran N. (2002) Assessment of DNA strand breakage by the alkaline COMET assay in dialysis patients and the role of Vitamin E supplementation. *Mutat. Res.* 520:151-159
- Karthikeyan V., Karpinski J., Nair R., Knoll G. (2004) The burden of chronic kidney disease in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 4: 262-269
- Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari E., Van H. P. (1997) The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* 392:19-30.
- Kizilian-Martel N., Wilkins R. C., Mclean J. R., Malone S., Raaphorst G. P. (2003) Prediction of radiosensitivity by measurement of X-ray induced apoptosis in human blood using the comet assay. *Anticancer Res.* 23: 3847-3854.
- Kobras K., Schupp N., Nehrlich K., Adelhardt M., Bahner U, Vienken J., Heidland A., Sebekova K., Stopper H. (2006) Relation between different

- treatment modalities and genomic damage of end-stage renal failure patients. *Kidney Blood Press Res.*2:10-17.
- Kuo K. L., Hung S. C., Wei Y. H., Tarng D. C. (2008) Intravenous iron exacerbates oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes in chronic hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 1817-1826.
- Landi S., Iazzolino E., Barale R. (2000) Are baseline frequencies of SCEs, CAs, and MN in human lymphocytes related to hematological values? *Mutat. Res.* 469:159-166.
- Lee T. K., Allison R. R., O'Brien K. F., Naves J. L., Karlsson U. L., Wiley A. L. (2002) Persistence of micronuclei in lymphocytes of cancer patients after radiotherapy. *Radiat. Res.*157: 678-684.
- Lee T. K., Allison R. R., O'Brien K. F., Khazanie P. G., Johnke R. M., Brown R., Bloch R. M., Tate M. L., Dobbs L. J., Kragel P. J. (2004) Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. *Mutat. Res.* 557: 75-84.
- Leong T., Borg M., McKay M. (2004) Clinical and cellular radiosensitivity in inherited human syndromes. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 16: 206-209.
- Levey A. S., Coresh J., Balk E., Kausz A.T., Levin A., Steffes M. W., Hogg R.J., Perrone R. D., Lau J., Eknoyan G. (2003) National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann. Intern. Med.* 139: 137-147.

- Levey A., Eckardt K., Tsukamoto Y., Levin A., Coresh J., Rossert J., de Zeeuw D., Hostetter T., Lameire N., Eknoyan G. (2005) Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 67: 2089-2100.
- Levine E. (1992) Renal cell carcinoma in uremic acquired renal cystic disease: incidence, detection, and management. *Urol. Radiol.* 13: 203-210.
- Libertiny G., Watson C. J. E., Gray D. W. R., Welsh K. I., Morris P. J. (2001) Rising incidence of post-transplant lymphoproliferative disease in Kidney transplant recipients. *Br J Surg.* 88:1330-1334.
- Lim P. S., Cheng Y. M., Wei Y. H. (2000) Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radic. Biol. Med.* 29,454-463.
- Liu C. S., Ko L. Y., Lim P. S., Kao S. H., Wei Y. H. (2001) Biomarkers of DNA damage in patients with end-stage renal disease: mitochondrial DNA mutation in hair follicles. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 561-565
- Liu J. F., Hirsch M. S., Lee H., Matulonis U. A. (2009) Prognosis and hormone receptor status in older and younger patients with advanced-stage papillary serous ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.*
- Lo Y. Y., Wong J. M., Cruz T. F. (1996) Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J. Biol. Chem.* 271:15703-15707.

- Lou J. L., Jiliang H., Lifen J., Wei Z., Baohong W., Hongping D. (2004) Measuring the genetic damage in cancer patients during radiotherapy with three genetic end-points. *Mutagenesis*.19: 457-464.
- Lou J. L., Chen Z. J., Wei J., He J. L., Jin L. F., Chen S. J., Zheng W., Xu S. J. (2008) Response of lymphocytes to radiation in untreated breast cancer patients as detected with three different genetic assays. *Biomed. Environ. Sci.* 21: 499-508.
- Luke R. (2004) Chronic Renal Failure en *Cecil Textbook of Medicine*, 22nd Edition. W.B. Saunders Company (Cap. 117).
- Maduell F. (2004) Conceptos básicos y modalidades de la hemodiálisis. *Nefrología Extrahospitalaria*. 11: 25-28.
- Maffei F., Angelini S., Forti G. C., Lodi V., Violante F. S., Mattioli S., Hrelia P. (2002) Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. *Mutagenesis*.17: 405-409.
- Maisonneuve P., Agodoa L., Gellert R., Stewart J. H., Buccianti G., Lowenfels A. B., Wolfe R. A., Jones E., Disney A. P., Briggs D., McCredie M., Boyle P. (1999) Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet*. 354: 93-99.
- Malachi T., Zevin D., Gafter U., Chagnac A., Slor H., Levi J. (1993) DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients. *Kidney Int.* 44: 385-389.

- Marple J. T., MacDougall M. (1993) Development of malignancy in the end-stage renal disease patient. *Semin. Nephrol.* 13: 306-314.
- Marzin D. (1997) The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutat. Res.* 392: 175-181.
- Massry S. G. (1987) Parathyroid hormone: a uremic toxin. *Adv. Exp. Med Biol.* 223:1-17.
- Matas A. J., Simmons R. L., Kjellstrand C. M., Buselmeier T. J., Najarian J. S. (1975) Increased incidence of malignancy during chronic renal failure. *Lancet.* 19: 883-886.
- Matera M., Bellinghieri B., Costantino G., Santoro D., Calvani M., Savica V. (2003) History of L-Carnitine: implications for renal disease. *J. Ren. Nutr.* 13: 2-14.
- Meerwaldt R. (2005) Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 3687-3693.
- Meloine P. (2008) Deaths: Preliminary data for 2006 National Vital Statistics Report. 56. 16: 4-5.
- Meng J., Sakata N., Imanaga Y., Tachikawa Y., Chihara J., Takebayashi S. (1999) Evidence for a link between glycooxidation and lipoperoxidation in patients with chronic renal failure. *Clin. Nephrol.* 51: 280-289.

-
- Messa P., Ponticelli C., Berardinelli L. (2008) Coming back to dialysis after kidney transplant failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23: 2738-2742
- Michelis R., Gery R., Sela S., Shurtz-Swirski R., Grinberg N., Snitkovski T., Shasha S. M., Kristal B. (2003) Carbonyl stress induced by intravenous iron during haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18: 924-930.
- Migliore L., Guidotti P., Favre C., Nardi M., Sessa M. R., Brunori E. (1991) Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutat. Res.* 263: 243-248.
- Miyata T., Tanaeda S., Kawai R., Ueda Y., Horiuchi S., Hara M., Maeda K., Monnier V. M. (1996a) Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in beta-2-microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. *Proc. Natl. Sci. USA.* 93: 2353-2358.
- Miyata T., Ueda Y., Shinzato T., Iida Y., Tanaka S., Kurokawa K., van Ypersele de S. C., Maeda K. (1996b) Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7:1198-1206.
- Miyata T., Hori O., Zhang J., Yan S. D., Ferran L., Iida Y., Schmidt A. M. (1996c) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications

- for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J. Clin. Invest.* 98:1088-1094.
- Miyata T., Wada Y., Cai Z., Iida Y., Horie K., Yasuda Y., Maeda K., Kurokawa K., Van Ypersele de S. C. (1997) Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int.* 51: 1170-1181.
- Miyata T., Fu M. X., Kurokawa K., Van Ypersele de S. C., Thorpe S. R., Baynes J. W. (1998a) Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int.* 54: 1290-1295.
- Miyata T., Kurokawa K., Van Ypersele de S. C. (1998b) Carbonyl stress and long-term uremic complications. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* 28: 311-319.
- Miyata T., Van Ypersele de S. C., Kurokawa K., Baynes J. W. (1999) Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int.* 55: 389-399.
- Miyata T., Horie K., Ueda Y., Fujita Y., Izuhara Y., Hirano H., Uchida K., Saito A., Van Ypersele de S. C., Kurokawa K. (2000a) Advanced glycation and lipidoxidation of the peritoneal membrane: respective roles of serum and peritoneal fluid reactive carbonyl compounds. *Kidney Int.* 58: 425-435.

-
- Miyata T., Kurokawa K., Van Ypersele de S. C. (2000b) Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int. Suppl.* 76: S120-5.
- Miyata T., Kurokawa K., Van Ypersele de S. C. (2000c) Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1744-1752.
- Miyata T., Van Ypersele de S. C., Imasawa T., Yoshino A., Ueda Y., Ogura H., Kominami K., Onogi H., Inagi R., Nangaku M., Kurokawa K. (2001) Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. *Kidney Int.* 60: 2351-2359.
- Monnier V. M., Sell D. R., Nagaraj R. H., Miyata S., Grandhee S., Odetti P., Ibrahim S. A. (1992) Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes.* 41: S36-41.
- Mozdarani H., Mansouri Z., Haeri S. A. (2005) Cytogenetic radiosensitivity of g0-lymphocytes of breast and esophageal cancer patients as determined by micronucleus assay. *J. Radiat. Res (Tokyo).* 46:111-116.
- Münch G., Thome J., Foley P., Schinzel R., Riederer P. (1997) AGEs in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* 23: 134-143.

- Muller C., Eisenbrand G., Gradinger M., Rath T., Albert F.W., Vienken J., Singh R., Farmer P.B., Stockis J. P., Janzowski C. (2004) Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients. *Free. Radic. Res.* 38:1093-1100.
- NAC-SEN (2009). Normas de Actuación Clínica en Nefrología. Sociedad Española de Nefrología. Disponibles en: www.senefro.org/modules.php?name=subsection&idsection=2&idsubsection=9
- Natarajan A. T., Tucker J. D., Sasaki M. S. (1994) Monitoring cytogenetic damage in vivo. En: *Methods to Asses DNA Damage and Repair. Iterspecies Comparisons.* PHM Lohman, RG Tardiff, GN Wogan (Eds). New York, Wiley: 95-117.
- Nath K. A., Grande J., Croatt A., Haugen J., Kim Y., Rosenberg M. E. (1998) Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression. *Kidney Int.* 53: 367-381.
- Niwa T., Miyazaki S., Katsuzaki T., Tatemichi N., Takei Y., Miyazaki T., Morita T., Hirasawa Y. (1995) Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int.* 48: 771-778.
- OECD (1997) Organization for Economic Co-operation and Development. OECD. Guideline for the testing of chemicals, Test no. 474. Mammalian Eruthrocyte Micronucleus test.
- Oeseburg H., de Boer R. A., van Gilst W. H., Van der H. P. (2009) Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch.*

OMS (2006) Índice de Masa Corporal en Organización Mundial de la Salud:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>

Odani H., Shinzato T., Matsumoto Y., Usami J., Maeda K. (1999) Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 256: 89-93.

Odani H., Shinzato T., Usami J., Matsumoto Y., Brinkmann F. E., Baynes J. W., Maeda K. (1998) Imidazolium crosslinks derived from reaction of lysine with glyoxal and methylglyoxal are increased in serum proteins of uremic patients: evidence for increased oxidative stress in uremia. *FEBS Lett.* 427: 381-385.

Okamoto K., Toyokuni S., Kim W. J., Ogawa O., Kakehi Y., Arao S., Hiai H., Yoshida O. (1996) Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int. J. Cancer.* 65: 437-441.

Ongajooth L., Ongajyooth S., Likidlilid A., Chantachum Y., Shayakul C., Nilwarangkur S. (1996) Role of lipid peroxidation, trace elements and anti-oxidant enzymes in chronic renal disease patients. *J. Med. Assoc. Thai.* 79: 791-800.

Ong-Ajyooth L., Ong-Ajyooth S., Sirisalee K., Nilwarangkur S. (1996) Lipoproteins and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal disease. *J. Med. Assoc. Thai.* 79: 505-512.

Ong-awyooth L., Ong-Ajyooth S., Tiensong K., Nilwarangkur S. (1997) Reduced free radical scavengers and chronic renal failure. *J. Med. Assoc. Thai.* 80:101-108.

Opelz G., Dohler B. (2004) Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant.* 4:222-230.

Ortuño Mirete J. (2003) Insuficiencia Renal Crónica. *MEDICINE* 8: 5888-5897.

Panzetta O., Cominacini L., Garbin U., Fratta Pasini A., Gammara L., Bianco F., Davoli A., Campagnola M., De Santis A., Pastorino A. M. (1995) Increased susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients on maintenance hemodialysis: effects of fish oil and vitamin E administration. *Clin. Nephrol.* 44: 303-309.

Peña C., Carter D., Ayala-Fierro F. (2001) *Toxicología ambiental.* © 1996-2001, The University of Arizona (consulta 23 Julio 2007) disponible en <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/index.html>

Penn I. (1994) Horizons in organ transplantation. Malignancy. *Surg. Clin. North Am.* 74: 1247-1257.

Pernice F., Floccari F., Nostro L., Caccamo C., Belghity N., Mantuano S., Romeo A., Barilla' A., Aloisi C., Ruello, A., Frisina N., Buemi M. (2006) Oxidative stress, sister chromatid exchanges and apoptosis in the pathogenesis of lymphocytopenia in ESRD patients. *J. Nephrol.* 19: 613-620.

Peuchant E., mas-Beauvieux M. C., Dubourg L., Thomas M. J., Perromat A., Aparicio M., Clerc M., Combe C. (1997) Antioxidant effects of a

- supplemented very low protein diet in chronic renal failure. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 313-320.
- Popanda O., Ebbeler R., Twardella D., Helmbold I., Gotzes F., Schmezer P., Thielmann H. W., von Fournier D., Haase W., Sautter-Bihl M. L., Wenz F., Bartsch H., Chang-Claude J. (2003) Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 55:1216-1225.
- Pope J. C., Koch M. O., Bluth R. F. (1994) Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: a comparison of clinical significance in patients receiving hemodialysis and those with renal transplants. *Urology.* 44: 497-501.
- Port F. K., Ragheb N. E., Schwartz A. G., Hawthorne V. M. (1989) Neoplasms in dialysis patients: a population-based study. *Am. J. Kidney Dis.* 14: 119-123.
- Raj D. S., Choudhury D., Welbourne T. C., Levi M., (2000) Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am. J. Kidney Dis.* 35: 365-380.
- Ramírez M., Surrallés J., Puerto S., Creus A., Mercos R. (1999) Low persistence of radiation-induced centromere positive and negative micronuclei in cultured human cells. *Mutat. Res.* 440:163-169.
- Reid T. M., Fry M., Loeb L. A. (1991) Endogenous mutations and cancer. *Princess Takamatsu Symp.* 22: 221-229.

- Ridker P. M. (2001) Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. *Lancet*. 358: 946-948.
- Roth J. M., Restani R. G., Goncalves T. T., Sphor S. L., Ness A. B., Martino-Roth M. G., Garcias G. L. (2008) Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test. *Genet. Mol. Res.*20: 433-444
- Sakurabayashi T., Miyazaki S., Yuasa Y., Sakai S., Suzuki M., Takahashi S., Hirasawa Y. (2008) L carnitine supplementation decreases the left ventricular mass in patients undergoing hemodialysis. *Circ. J.* 72: 926 – 931
- Saldaña A., García B., Cassanova A., García J. (2004) El estrés oxidativo en la insuficiencia renal crónica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 23: 118-120.
- Sanaka T., Nakano Y., Nishimura H., Shinobe M., Higuchi C., Omata M., Nihei H., Sugino N. (1997) Therapeutic effect of a newly developed antioxidative agent (OPC-15161) on experimental immune complex nephritis. *Nephron*. 76: 315-322.
- Savica V., Santoro D., Mazzaglia G., Ciolino F., Monardo P., Calvani M., Bellinghieri G., Kopple J.D. (2005) L-carnitine infusions may suppress serum C-reactive protein and improve nutritional status in maintenance hemodialysis patients. *J. Ren. Nutr.* 15:225-230.

-
- Shankar A., Leng C., Chia K. S., Koh D., Tai E. S., Saw S. M., Lim S. C., Wong T. Y., (2008) Association between body mass index and chronic kidney disease in men and women: population-based study of Malay adults in Singapore. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23: 1910-1918.
- Schmid W. (1975) The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 9-15.
- Schupp N., Stopper H., Rutkowski P., Kobras K., Nebel M., Bahner U., Vienken J., Heidland A. (2006) Effect of different hemodialysis regimens on genomic damage in end-stage renal failure. *Semin. Nephrol.* 26: 28-32
- Schupp N., Dette E. M., Schmid U., Bahner U., Winkler M., Heidland A., Stopper H. (2008a) Benfotiamine reduces genomic damage in peripheral lymphocytes of hemodialysis patients. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 378:283-291.
- Schupp N., Schmid U., Heidland A., Stopper H. (2008b) New approaches for the treatment of genomic damage in end-stage renal disease. *J. Ren. Nutr.* 18:127-133
- Scott D. J., Barber B., Levine E. L., Burrill W., Roberts S. A. (1998) Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition?. *Br. J. Cancer.* 77: 614-620.
- Scott D., Barber J. B., Spreadborough A. R., Burrill W., Roberts S. A. (1999) Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int. J. Radiat. Biol.* 75: 1-10.

- Scott D. (2000) Chromosomal radiosensitivity, cancer predisposition and response to radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* 176: 229-234.
- Sebekova K., Schinzel R., Ling H., Simm A., Xiang G., Gekle M., Munch G., Vamvakas S., Heidland A. (1998) Advanced glycated albumin impairs protein degradation in the kidney proximal tubules cell line LLC-PK1. *Cell Mol. Biol.* 44: 1051-1060.
- Sebekova K., Wagner Z., Schupp N., Boor P. (2007) Genomic damage and malignancy in end-stage renal failure: do advanced glycation end products contribute? *Kidney Blood Press Res.* 30: 56-66.
- SEN (2008) Informe de Diálisis y Trasplante 2007. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología, 4 -7 de Octubre de 2008, Donostia, San Sebastian.
- Shi X., Jiang H., Mao Y., Ye J, Saffiotti U. (1996) Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage. *Toxicology.*106: 27-38.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R, Schneider E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Slonina D., Gasinska A. (1997) Intrinsic radiosensitivity of healthy donors and cancer patients as determined by the lymphocyte micronucleus assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 693-701.

- Stopper H., Boullay F., Heidland A., Vienken J., Bahner U. (2001) Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am. J. Kidney Dis.* 38: 296-301.
- Stopper H., Meysen T., Bockenforde A., Bahner U., Heidland A., Vamvakas S. (1999) Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *Am. J. Kidney Dis.* 34: 433-437.
- Stopper H., Treutlein A. T., Bahner U., Schupp N., Schmid U., Brink A., Perna A., Heidland A. (2008) Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23: 3272-3279.
- Stoyanova E., Sandoval S. B., Zuniga L. A., El-Yamani N., Coll E., Pastor S., Reyes J., Andres E., Ballarin J., Xamena N., Marcos R. (2009) Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*
- Surralles J., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1995) The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat. Res.* 342: 43-59.
- Takayama F., Aoyama I., Tsukushi S., Miyazaki T., Miyazaki S., Morita T., Hirasawa Y., Shimokata K., Niwa T. (1998) Immunohistochemical detection of imidazolone and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in aortas of hemodialysis patients. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44: 1101-1109.
- Tarng D. C., Huang T. P., Wei Y. H., Liu T., W. Chen H., Wen C. T., Yang W. C. (2000) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of

- oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 36: 934-944.
- Tarng D. C., Tsai T. J., Chen W. T., Liu T. Y., Wei Y. H. (2001) Effect of human OGG1 1245C→G gene polymorphism on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels of leukocyte DNA among patients undergoing chronic hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:2338-2347.
- Tarng D. C., Wen C. T., Huang T. P., Chen C. L., Liu T. Y., Wei Y. H. (2002) Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:1321-1330.
- Teschner M., Garte C., Ruckle-Lanz H., Mader U., Stopper H., Klassen A., Heidland A. (2002) Incidence and spectrum of malignant disease among dialysis patients in North Bavaria. *Dtsch. Med Wochenschr.* 127: 2497-2502.
- Thierens H., Vral A., De R. L. (1991) Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose response. *Health Phys.* 61: 623-630.
- Tolkoff-Rubin N., Goes N. (2004) Chronic Renal Failure en Cecil Textbook of Medicine, 22nd Edition. W.B. Saunders Company (Cap. 118).
- Toto R. (2005) Treatment of hypertension in chronic kidney disease. *Semin. Nephrol.* 25: 435-439.

-
- Tucker J. D., Preston R. J. (1996) Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 365:147-159.
- Twardella D., Chang-Claude J. (2002) Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view - overview of methods and results. *Radiother. Oncol.* 62: 249-260.
- Čučković C., Djukanović L., Janković S., Stanojević A., Dragičević P., Radmilović A., Lambić L., Stojanović M., Milić M., Baković J., Radović M., Labudović M. (1996) Malignant tumors in hemodialysis patients. *Nephron.* 73: 710-712.
- Vamvakas S., Bahner U., Becker P., Steinle A., Gotz R., Heidland A. (1996) Impairment of DNA repair in the course of long-term hemodialysis and under cyclosporine immunosuppression after renal transplantation. *Transplant Proc.* 28: 3468-3473.
- Vamvakas S., Bahner U., Heidland A. (1998) Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved -editorial-. *Am. J. Nephrol.* 18: 89-95.
- Van den B. C., Gabriels M., Vamecq J., Vanden H. K., Verbeelen D. (1997) Carvedilol protects against glomerulosclerosis in rat remnant kidney without general changes in antioxidant enzyme status. A comparative study of two beta-blocking drugs, carvedilol and propranolol. *Nephron.* 77: 319-324.
- Vanholder R. (2003) Uremic toxins. *Nephrologie.* 24: 373-376.

- Vernez L., Dickenmann M., Steiger J., Wenk M., Krahenbuhl S. (2006) Effect of L-carnitine on the kinetics of carnitine, acylcarnitines and butyrobetaina in long-term hemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21: 450-458.
- Vlassara H., Striker L. J., Teichberg S., Fuh H., Li Y. M., Steffes M. (1994) Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 9:11704-11708.
- Wang S., Geraci G., Kuhlmann M. K., Levin N. W., Handelman, G. J. (2008) Chemical reactions of vitamin C with intravenous-iron formulations. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23: 120-125.
- Wells-Knecht K. J., Zyzak D. V., Litchfield J. E., Thorpe S. R., Baynes J. W. (1995) Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry.* 34: 3702-3709.
- Widel M., Jedrus S., Lukaszczyk B., Raczek-Zwierzycka K., Swierniak A. (2003) Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. *Radiat. Res.* 159: 713-721.
- Wu PA., Loh CH., Hsieh L. L., Liu T. Y., Chen C. J., Liou S. H. (2004) Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutat. Res.* 562: 27-38.
- Xiang G., Schinzel R., Simm A., Munch G., Sebekova K., Kasper M., Niwa T., Schmitz C., Heidland A. (2001) Advanced glycation end products (AGEs)-

- induced expression of TGF-beta 1 is suppressed by a protease in the tubule cell line LLC-PK. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16:1562-1569.
- Xue K. X., Wang S., Ma G. J., Zhou P., Wu P. Q., Zhang R. F., Xu Z., Chen W. S., Wang Y. Q. (1992) Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol- and tea-drinking habits. *Int. J. Cancer.* 50: 702-705.
- Yang C. W., Vlassara H., Striker G. E., Striker L. J. (1995) Administration of AGEs in vivo induces genes implicated in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int. Suppl.* 49:S55-8.
- Zalacain M., Sierrasesámaga L., Patiño A. (2005) Ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28: 153-298.
- Zalacain M., Sierrasesumaga L., Patino A. (2005) The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28: 227-236.
- Zevin D., Malachi T., Gafter U., Friedman J., Levi J. (1991) Impaired DNA repair in patients with end-stage renal disease and its improvement with hemodialysis. *Miner. Electrolyte Metab.* 17: 303-306.
- Zorrilla A., Eirez M., Izquierdo M. (2004) Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Medicina Militar* 22: 51-57.

