

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Genètica i de Microbiologia
Grup de Mutagènesi

**Daño genómico en los pacientes con insuficiencia
renal crónica y su relación con el tratamiento
sustitutivo**

TESIS DOCTORAL

Elitsa Georgieva Stoyanova

2011

Daño genómico en pacientes con insuficiencia renal crónica y su relación con el tratamiento sustitutivo

El presente trabajo se ha realizado en el *Grup de Mutagènesi* del *Departament de Genètica i de Microbiologia* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Julio 2011

Director
Dr. Ricard Marcos Dauder
Catedrático de Genética
UAB

Autora
Elitsa Georgieva Stoyanova

A mí familia

“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo”

Benjamin Franklin (1706-1790)

Agradecimientos

A la Generalitat de Catalunya por la beca FI que me ha permitido estar aquí y poner toda mi atención en la realización de este trabajo.

A mi director de tesis el Dr. Ricard Marcos Dauder, por la paciencia, la comprensión, la dirección y la oportunidad de seguir este camino y aprender durante los últimos 5 años.

A la Unidad de Hemodiálisis de la Fundació Puigvert de Barcelona, en particular a la Doctora Elisabet Coll por la colaboración y excelente organización y a cada uno de los 364 individuos sin cuya participación este trabajo no habría sido posible.

Al Prof. Andrew Collins de la Universidad de Oslo, Noruega por haberme dado la oportunidad de realizar una parte de este trabajo en su grupo.

A Gloria, Lourdes y Cristian, por la ayuda profesional y por haberme enseñado lo importante y agradable que es trabajar en equipo.

A todos mis compañeros y amigos del Grup de Mutagenesi de la Universitat Autònoma de Barcelona que durante todo este tiempo convertían el trabajo en un proceso mucho más agradable, por el ambiente que crearon aportando lo mejor de tantas culturas diferentes, especialmente a Mounaïm, Esteban, Anna Corral, Erico,

Wilser, Susana, Jordi M., Jordi B., Miriam y Tatiana por el apoyo y la paciencia incondicional.

A todos los amigos que adquirí desde cuando llegué a Barcelona, por estar a mi lado tanto en los momentos difíciles, como en los alegres, por compartir conmigo todo y por haberme dado la oportunidad y la confianza de formar parte de su vida y por haberme permitido formar parte de las suyas. Gracias por hacerme sentir tantos años como si estuviera en casa aunque lejos de Bulgaria.

Y por supuesto los agradecimientos más significativos se los doy a mi familia, sin su generosidad, ánimo e inspiración habría sido imposible llevar a cabo este trabajo. A mis padres Zagorka y Georgi, por su apoyo y ejemplo de lucha y honestidad, y a mi hermana Velina por su energía positiva y sus valiosos consejos siempre cuando los necesitaba.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANATOMÍA DE LOS RIÑONES	1
1.2. FISIOLÓGÍA DE LOS RIÑONES	3
1.3. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE FUNCIONAMIENTO DE LOS RIÑONES	4
1.4. ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA	7
1.5. REPERCUSIONES DEL ESTADO URÉMICO SOBRE LOS SISTEMAS Y LOS ÓRGANOS DEL ORGANISMO	10
1.6. TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA	12
1.6.1. La hemodiálisis	13
1.6.1.1. Acceso a la sangre durante la hemodiálisis	13
1.6.1.2. Descripción del proceso	15
1.6.1.3. Efectos secundarios de la hemodiálisis	19
1.6.2. La diálisis peritoneal	20
1.6.3. El trasplante renal	22
1.6.4. Comparación entre las técnicas de tratamiento sustitutivo	22
1.7. DAÑO GENÉTICO ASOCIADO CON LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA ..	23
1.7.1. EL ESTRÉS OXIDATIVO	24
1.7.2. El estrés oxidativo en los estados de uremia	27
1.7.3. Productos de la glicación avanzada y compuestos carbonilos reactivos como mediadores de daño en el DNA	27
1.8. INESTABILIDAD GENÉTICA EN PACIENTES CON IRC	30

1.9. EL ENSAYO DEL COMETA -----	33
1.9.1. Desarrollo histórico del ensayo del cometa -----	33
1.9.2. Mecanismos de formación de los cometas -----	35
1.9.3. Medición del daño en el cometa -----	36
1.9.4. Tipos de daño detectable -----	37
1.9.5. Ventajas e inconvenientes del ensayo del cometa -----	38
1.9.6. Aplicaciones del ensayo -----	40
2. OBJETIVOS -----	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS -----	45
3.1. DONANTES -----	45
3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE -----	45
3.3. OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA. -----	46
3.4. ENSAYO DEL COMETA. -----	47
3.5. DETECCIÓN DE DAÑO OXIDATIVO -----	50
3.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REPARAR BASES DAÑADAS. ----	51
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO -----	54
4. RESULTADOS -----	57
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA. -----	57
4.2. ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA RENAL EN LOS PACIENTES SELECCIONADOS. -----	60
4.3. PARÁMETROS CLÍNICO-ANALÍTICOS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS. --	61

4.4. DAÑO GENÉTICO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA MEDIDO MEDIANTE EL ENSAYO DEL COMETA.	65
4.4.1 Relación entre los distintos estadios de la IRC sobre los niveles de daño genético.	66
4.4.2. Factores bioquímicos relacionados con los niveles de daño genómico en los pacientes con insuficiencia renal crónica.	69
4.4.3. Factores que afectan la mortalidad en los pacientes con IRC sometidos a tratamiento de HD.	72
4.4.4. Efecto del tiempo y tipo de tratamiento de hemodiálisis.	75
4.4.5. Efectos de otros parámetros sobre los niveles de daño genético en los pacientes con IRC.	79
4.5. DAÑO OXIDATIVO EN LOS PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA.	83
4.5.1. Daño oxidativo en pirimidinas.	84
4.5.1.1. Factores moduladores del daño oxidativo en pacientes con IRC.	86
4.5.2. Daño oxidativo en las purinas.	89
4.5.2.1 Relación entre el daño oxidativo en las purinas y distintos parámetros.	91
4.5.3. Daño oxidativo total	93
4.5.3.1 Relación entre el daño oxidativo total y distintos parámetros.	96
4.5.3.2. Otros factores relacionados con el daño oxidativo total	99
4.6. INESTABILIDAD GENÓMICA EN LOS PACIENTES CON IRC EN TRATAMIENTO DE HEMODIÁLISIS.	101
5. DISCUSIÓN	105
5.1. DAÑO GENÉTICO EN LOS PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA	106

5.1.1 Daño genético en los pacientes con IRC medido mediante el ensayo del cometa	109
5.2. DAÑO OXIDATIVO EN LOS PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA	111
5.3. NIVELES DE MORTALIDAD EN EL GRUPO DE PACIENTES SOMETIDOS A TRATAMIENTO DE HEMODIÁLISIS	115
5.4. EFECTO DEL TIEMPO Y EL TIPO DE TRATAMIENTO DE HD	119
5.5. INESTABILIDAD GENÉTICA EN LOS PACIENTES CON IRC EN TRATAMIENTO DE HEMODIÁLISIS	123
6. CONCLUSIONES	127
7. BIBLIOGRAFÍA.....	129
8. ANEXOS	163
8.1. ANEXO I (FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO).....	163
8.2. ANEXO II (OXIDATIVE DNA DAMAGE IN CHRONIC RENAL FAILURE PATIENTS).....	167

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ESTADIOS DE LA IRC SEGÚN EL FILTRADO GLOMERULAR.	7
TABLA 2. INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.	45
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.	58
TABLA 4. CAUSAS MÁS FRECUENTES DE IRC EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA. ---	61
TABLA 5. DISTINTOS VALORES ANALÍTICOS OBSERVADOS EN PACIENTES CON IRC/NT Y HD, RESPECTO A LOS VALORES CONSIDERADOS NORMALES.	63
TABLA 6. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE DAÑO BASAL ENTRE EL GRUPO CONTROL Y LOS PACIENTES.	65
TABLA 7. NIVELES DE DAÑO BASAL EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS.	66
TABLA 8. DAÑO BASAL SEGÚN EL ESTADIO DE IRC.	69
TABLA 9. CAUSAS DE MUERTE MÁS FRECUENTES ENTRE LOS PACIENTES EN HD.	72
TABLA 10. NIVELES DE DAÑO BASAL ENTRE LOS PACIENTES HD VIVOS Y FALLECIDOS.	73
TABLA 11. RELACIÓN ENTRE LA EDAD Y EL GÉNERO CON LA MORTALIDAD.-	73
TABLA 12. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE PRC CON LA MORTALIDAD.	74
TABLA 13. RELACIÓN ENTRE EL TIEMPO EN TRATAMIENTO DE HD Y LA MORTALIDAD.	74
TABLA 14. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.	77
TABLA 15. DAÑO GENÓMICO EN PRIMERAS Y SEGUNDAS EVALUACIONES DE PACIENTES CON/SIN CAMBIO DE TRATAMIENTO.....	78
TABLA 16. DIFERENCIAS EN LA EFICACIA DIALÍTICA.	79

TABLA 17. FACTORES QUE AFECTAN LOS NIVELES DE DAÑO BASAL EN LA POBLACIÓN IRC/NT.	82
TABLA 18. DAÑO EN LAS PURINAS Y LAS PIRIMIDINAS PARA LOS GRUPOS ESTUDIADOS.	83
TABLA 19. DAÑO OXIDATIVO EN PIRIMIDINAS.	84
TABLA 20. DISTRIBUCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN LAS PIRIMIDINAS.	85
TABLA 21. FACTORES QUE AFECTAN LOS NIVELES DE DAÑO OXIDATIVO EN LAS PIRIMIDINAS EN LOS PACIENTES IRC/ND.	86
TABLA 22. VALORES DE DAÑO OXIDATIVO EN LAS PIRIMIDINAS EN PACIENTES HD SIN/CON TRATAMIENTO CON IECA.	87
TABLA 23. VALORES DE DAÑO OXIDATIVO EN PIRIMIDINAS PARA PACIENTES EN HD, VIVOS Y FALLECIDOS.	87
TABLA 24. DAÑO OXIDATIVO EN PIRIMIDINAS SEGÚN EL TIEMPO EN TRATAMIENTO DE HD.	88
TABLA 25. DAÑO OXIDATIVO EN LAS PIRIMIDINAS EN LOS PACIENTES SIN Y CON CAMBIO DE TRATAMIENTO.	89
TABLA 26. DAÑO OXIDATIVO EN LAS PURINAS.	90
TABLA 27. DISTRIBUCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN PURINAS.	90
TABLA 28. RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE DO EN LAS PURINAS Y LA MORTALIDAD DE LOS PACIENTES HD.	92
TABLA 29. DAÑO OXIDATIVO EN PURINAS SEGÚN EL TIEMPO EN TRATAMIENTO DE HD.	92
TABLA 30. DAÑO OXIDATIVO EN PURINAS EN LOS PACIENTES SIN Y CON CAMBIO DE TRATAMIENTO.	93
TABLA 31. DAÑO OXIDATIVO TOTAL EN EL GRUPO CONTROL Y LOS PACIENTES CON IRC.	94

TABLA 32. VALORES DO TOTAL SEGÚN EL ESTADIO DE IRC.	95
TABLA 33. DAÑO OXIDATIVO EN PACIENTES VIVOS Y FALLECIDOS.	96
TABLA 34. NIVELES DE DAÑO OXIDATIVO TOTAL SEGÚN EL TIEMPO EN TRATAMIENTO.....	97
TABLA 35. DAÑO OXIDATIVO TOTAL EN LOS PACIENTES SIN Y CON CAMBIO DE TRATAMIENTO.....	99
TABLA 36. RELACIÓN ENTRE EL DAÑO OXIDATIVO TOTAL Y ALGUNOS FACTORES DISPONIBLES PARA LA POBLACIÓN IRC.	100
TABLA 37. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA Y RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE EL ENSAYO DE REPARACIÓN.	102
TABLA 38. VALORES DE REPARACIÓN NETA PARA LOS DOS GRUPOS ESTUDIADOS.	102
TABLA 39. MODELO LINEAL GENERAL CON LA CAPACIDAD DE REPARAR DEL GRUPO DE DAÑO BAJO COMO VARIABLE DEPENDIENTE.	103
TABLA 40. COMPARACIÓN EN LA CAPACIDAD DE REPARAR ENTRE PACIENTES QUE ESTÁN EN TRATAMIENTO DE HD POR MÁS O MENOS DE 40 MESES.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LOS RIÑONES.	1
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LAS NEFRONAS.	2
FIGURA 3. PRINCIPALES CAUSAS DE FALLO RENAL.	8
FIGURA 4. CATÉTER INTRAVENOSO.	14
FIGURA 5. FÍSTULA ARTERIOVENOSA.	15
FIGURA 6. INJERTO ARTERIOVENOSO.	15
FIGURA 7. ESQUEMA DEL PROCESO DE HEMODIÁLISIS Y ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA.	16
FIGURA 8. DIFUSIÓN.	17
FIGURA 9. CONVECCIÓN.	17
FIGURA 10. DIFERENTES MODALIDADES DE TÉCNICAS DE DIÁLISIS EXTRACORPÓREAS.	19
FIGURA 11. ESQUEMA DE LA DIÁLISIS PERITONEAL.	21
FIGURA 12. ETAPAS DE FORMACIÓN DE UNO DE LOS PRODUCTOS DE LA GLICOLIZACIÓN, EL CML.	28
FIGURA 13. MECANISMOS CELULARES PARA MANTENER LA INTEGRIDAD DEL GENOMA.	31
FIGURA 14. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES.	31
FIGURA 15. IMÁGENES DE LINFOCITOS AISLADOS EN EL ENSAYO DEL COMETA.	35
FIGURA 16. MEDICIÓN DE LOS PARÁMETROS EN EL ENSAYO DEL COMETA. --	37

FIGURA 17. DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS EN GRADIENTE DE DENSIDAD.	46
FIGURA 18. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE LINFOCITOS.	47
FIGURA 19. ESQUEMA DEL PROTOCOLO SEGUIDO PARA LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO DEL COMETA.	48
FIGURA 20. NÚCLEOS CON DISTINTOS NIVELES DE DAÑO GENÉTICO.	50
FIGURA 21. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO DE REPARACIÓN IN VITRO BER. --	53
FIGURA 22. DAÑO BASAL EN EL DNA EN EL GRUPO CONTROL Y EN LOS PACIENTES CON IRC.	66
FIGURA 23. DISTRIBUCIÓN DEL DAÑO BASAL SEGÚN EL FILTRADO GLOMERULAR.	67
FIGURA 24. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE CREATININA Y EL DAÑO BASAL.	68
FIGURA 25. EFECTO DEL ESTADIO DE IRC SOBRE EL NIVEL DE DAÑO BASAL.	69
FIGURA 26. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE CREATININA Y EL DAÑO MEDIDO EN EL ESTADIO 5 DE IRC.	70
FIGURA 27. RELACIÓN ENTRE LA ALBÚMINA EN LA SANGRE Y EL DAÑO BASAL EN LOS PACIENTES IRC/NT.	71
FIGURA 28. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE VITAMINA B12 Y EL DAÑO EN PACIENTES IRC/NT.	71
FIGURA 29. RELACIÓN ENTRE LA MORTALIDAD Y EL TIEMPO EN TRATAMIENTO DE HD.	75
FIGURA 30. RELACIÓN DAÑO GENÉTICO - TIEMPO EN TRATAMIENTO EN HEMODIÁLISIS (1: 259 MESES).	76
FIGURA 31. COMPARACIÓN ENTRE LAS 1ª Y LAS 2ª MUESTRAS DE LOS PACIENTES EN HEMODIÁLISIS CONVENCIONAL.	78

FIGURA 32. COMPARACIÓN ENTRE LA 1ª MUESTRA DE LOS PACIENTES EN HEMODIÁLISIS CONVENCIONAL Y LA 2ª MUESTRA HD ON-LINE.	79
FIGURA 33. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HOMOCISTEINA Y LAS SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO FÓLICO.	81
FIGURA 34. DISTRIBUCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN PIRIMIDINAS SEGÚN EL ESTADIOS DE IRC.	85
FIGURA 35. DISTRIBUCIÓN DEL DAÑO EN LAS PURINAS SEGÚN EL ESTADIO DE IRC.	91
FIGURA 36. DISTRIBUCIÓN DEL DO TOTAL SEGÚN EL PROGRESO DE LA IRC.	96
FIGURA 37. DISTRIBUCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO TOTAL SEGÚN EL TIEMPO EN TRATAMIENTO DE HD.	98
FIGURA 38. RELACIÓN ENTRE LA REPARACIÓN NETA Y EL TIEMPO EN TRATAMIENTO SUSTITUTIVO PARA CADA GRUPO.	104

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo trata de buscar posibles asociaciones entre la insuficiencia renal crónica (IRC) y los niveles de daño en el DNA. Para entender esta patología, parece apropiado empezar haciendo una breve descripción de la anatomía y fisiología del aparato urinario. Éste está compuesto por dos riñones, dos uréteres, una vejiga y una uretra y sus funciones están relacionadas, principalmente, con el mantenimiento del balance de fluidos y de electrolitos así como de la excreción de algunos productos de desecho del organismo.

1.1. Anatomía de los riñones.

El riñón es un órgano par, cada uno con un tamaño aproximadamente de entre 10-13 cm de largo y 5-7,5 cm de ancho. En la Figura 1 se muestran las características anatómicas de los riñones.

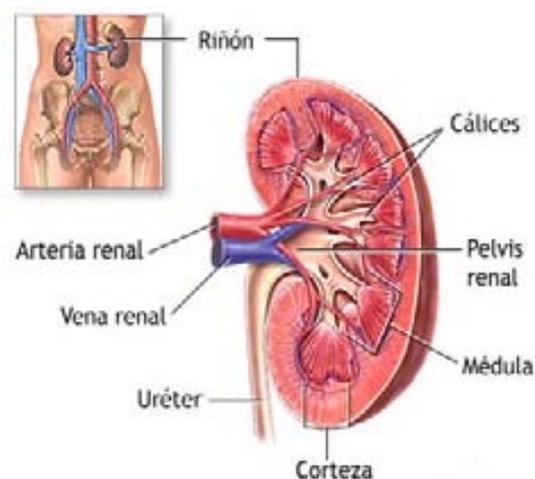


Figura 1. Estructura de los riñones (Zieve, 2011).

Junto con la piel y el sistema respiratorio, los riñones son uno de los principales órganos excretores. Cada riñón está compuesto por aproximadamente 1.000.000-1.200.000 de nefronas, que son las unidades estructurales y funcionales del órgano.

Éstas se encuentran agrupadas en unas 10-12 estructuras llamadas pirámides renales que se extienden entre la parte interna y externa de los riñones, la médula y la corteza renal. Las nefronas están formadas por:

a) El corpúsculo renal

Éste contiene el glomérulo y la cápsula de Bowman, y sus funciones están relacionadas con la filtración. El glomérulo filtra las células y las proteínas de la sangre, mientras que todo el resto de componentes de la sangre pasan a la cápsula de Bowman y de allá a la asa de Henle.

b) La asa de Henle

Sus funciones están relacionadas con los procesos de reabsorción y secreción. Las membranas semipermeables que limitan el túbulo permiten el movimiento selectivo de los componentes de vuelta a la sangre y viceversa.

c) El tubo colector

Éste contiene todas las sustancias que no se han reabsorbido en el bucle y que posteriormente se incluyen en la orina. La estructura de las nefronas se puede observar en la Figura 2.

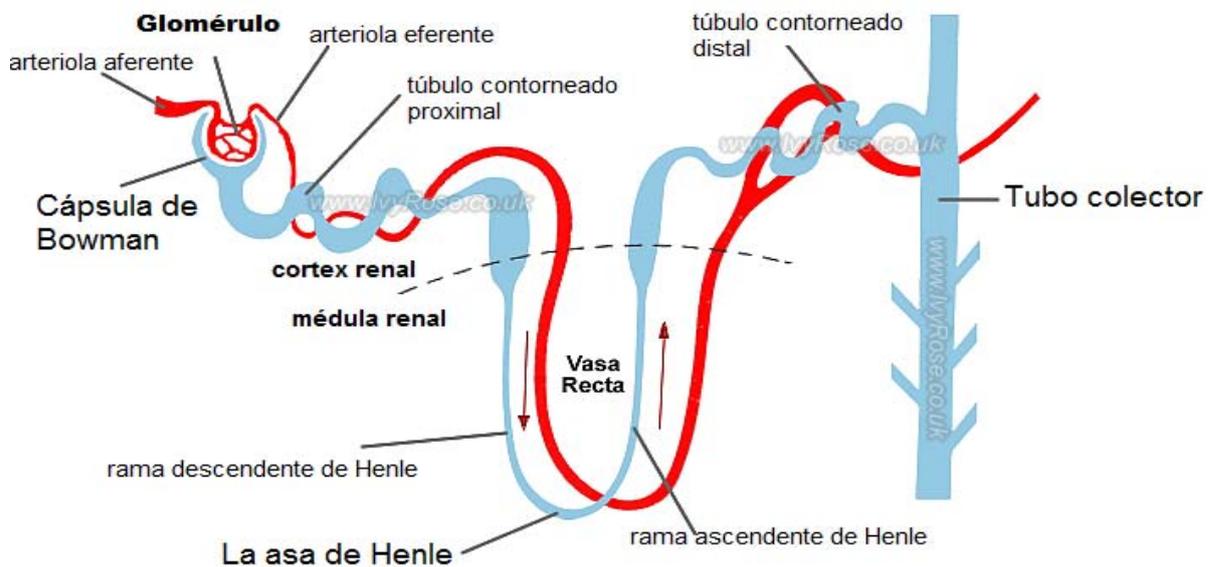


Figura 2. Estructura de las nefronas (modificado del Oxford Concise Colour Medical Dictionary).

1.2. Fisiología de los riñones.

Los riñones tienen un papel fundamental en la regulación de la composición y el volumen de los fluidos extracelulares. Normalmente mantienen la homeostasis a través de la excreción en la orina de las cantidades exactas de muchos compuestos, entre éstos no se encuentran sólo sustancias de desecho, sino que también se hallan sustancias útiles que se encuentran en el organismo en exceso, como resultado de la alimentación y el metabolismo.

Los riñones realizan varias funciones muy importantes (Rhoades y Bell, 2009) para el organismo como:

- a) La regulación de la presión osmótica de los fluidos corporales, a través de la excreción de la orina (dependiendo de su concentración).
- b) La regulación de la concentración de diferentes iones en el plasma sanguíneo Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , bicarbonato, fosfato, sulfato.
- c) El mantenimiento del balance ácido-base a través de la síntesis de amoníaco.
- d) La regulación del volumen de fluidos extracelulares controlando el Na^+ y la excreción del agua.
- e) La participación en la regulación de la presión arterial con la excreción de Na^+ .
- f) La eliminación de distintos productos de desecho del metabolismo, como:
 - la urea (el producto nitrogenado resultante del desecho del metabolismo de las proteínas),
 - el ácido úrico (producto final del metabolismo de las purinas).
 - la creatinina (se forma como resultado de la degradación de la creatina, que es un nutriente para los músculos).
- g) La excreción de un gran número de fármacos, sustancias ajenas o tóxicas.
- h) La producción de varias hormonas, como:
 - la eritropoyetina, que estimula la formación de los eritrocitos, y que se produce en un 90% en los riñones.

- la vitamina D₃, que se forma en los riñones por hidroxilación enzimática del calcifediol, y su función es aumentar la absorción intestinal de Ca y P.
 - la renina, que es una enzima también llamada angiotensinogenasa y que suele excretarse en casos de hipotensión arterial y de baja volemia.
- i) La degradación de algunas hormonas polipeptídicas, como la insulina, la glucagona y la hormona paratiroidea.
- j) La síntesis de sustancias que afectan al flujo sanguíneo y a la excreción de Na⁺ (prostaglandinas, tromboxan A₂, y la calicreína, que es una proteasa sérica que libera quininas).

1.3. Determinación del nivel de funcionamiento de los riñones.

Dada la importante función de los riñones, es primordial conocer posibles alteraciones en su funcionamiento. Así, en la práctica clínica hay varias maneras para evaluar el funcionamiento de los riñones. Un parámetro muy importante y ampliamente utilizado para la estimación del funcionamiento renal es el denominado índice de filtrado glomerular (FG), que representa el volumen de fluido filtrado por unidad de tiempo desde los capilares glomerulares renales hacia el interior de la cápsula de Bowman. Se calcula teniendo en cuenta los niveles de creatinina, la edad, la raza y el género, entre otros factores. Las técnicas más ampliamente utilizadas para medir el funcionamiento renal incluyen la evaluación de la creatinina, de la urea, el aclaramiento radioisotópico, etc. Entre los métodos más ampliamente utilizados destacan:

- a) La estimación del FG con inulina.

El método se basa en la utilización de sustancias que se eliminan sólo por filtración glomerular. Se toman muestras de sangre y orina del paciente, se le inyecta la inulina, se espera unos 30-50 min para la difusión de la sustancia y luego se vacía la vejiga; el ritmo de excreción es directamente proporcional al índice de filtración del agua y de los solutos a través del glomérulo.

b) El aclaramiento de la creatinina.

La tasa de excreción de la creatinina es constante a lo largo del día y depende exclusivamente de la filtración glomerular. El FG se calcula como M/P (siendo M la creatinina excretada por unidad de tiempo y P la concentración de creatinina en el plasma (Batlló y Batlló, 2001).

c) Estimación de la función renal por fórmulas.

La estimación del funcionamiento de los riñones utilizando fórmulas tiene la ventaja de que estos métodos no implican la colección de orina durante 24 horas.

- La fórmula de Cockcroft-Gault

Estima el aclaramiento de la creatinina. La fórmula considera la edad, el género, el peso y los niveles de creatinina en el suero. Es menos precisa en poblaciones compuestas por gente mayor y en casos con obesidad.

$$\text{FG (mL/min)} = [(140 - \text{edad}) \times (\text{peso en kg}) \times (0,85 \text{ si mujer})]$$

- La ecuación MDRD (Modificación de la dieta en la enfermedad renal)

Para estimar el FG la ecuación considera la edad, el género, la raza y los niveles de creatinina en sangre.

$$\text{GFR (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 186 \times (\text{Pcr}) - 1,154 \times (\text{edad}) - 0,203 \times \\ (0,742 \text{ si mujer}) \times (1,210 \text{ si afroamericano})$$

Esta ecuación tiene limitaciones en los casos de masa muscular anormal, pacientes con malnutrición u obesidad, mujeres embarazadas, etc. (Cockcroft y Gault, 1976; KDOQI - Guideline 4, 2002; Kuan et al., 2005).

La comparación entre las dos fórmulas muestra resultados contradictorios, basados sobre todo en la edad, índice de masa corporal y el aclaramiento de la creatinina (Kuan et al., 2005; Barroso et al., 2006; Wieczorowska-Tobis et al., 2006; Teruel et al.,

2007). Sin embargo, si se tienen en cuenta estos factores limitantes, las dos fórmulas muestran una precisión similar (Vassalotti, 2006).

El filtrado glomerular se expresa en mL/min/1,73 m², donde el 1,73 m² es un coeficiente para ajustar la fórmula respecto a la superficie corporal. Esta corrección se hace con el cálculo de la superficie corporal a través de la fórmula de DuBois (0,20247 x altura [m] 0,725 x peso [kg] 0,425) (Gómez-Pavón et al., 2010). El filtrado glomerular en personas sanas tiene valores entre 120-130 mL/min/1,73 m², disminuyendo con la edad hasta los 75 mL/min/1,73 m².

La disminución del funcionamiento renal se puede manifestar de manera aguda o crónica. El deterioro renal en la insuficiencia renal aguda (IRA) tiene múltiples etiologías entre las cuales se hallan infecciones bacterianas, insuficiencia cardiaca, intoxicaciones, lesiones, sobredosis de fármacos, etc. La clasificación de los grados de IRA incluye cinco etapas: el riesgo de lesiones, las lesiones, el fallo renal, la pérdida de la función renal, y, por último, la insuficiencia renal terminal (Dirkes, 2011). El tratamiento de la patología incluye la corrección del problema que ha provocado la insuficiencia y, si es necesario, la cirugía (trasplante) o la diálisis.

Por otro lado, la disminución de las funciones renales por más de tres meses, con valores de FGR < 60 mL/min/1,73 m², se considera como anomalía patológica e indicador de daño renal irreversible, definiéndose como enfermedad renal crónica, independientemente de la causa (NKF-K/DOQI, 2002).

En la Tabla 1 se presenta la clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica según las guías K/DOQI 2002 (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative).

Tabla 1. Estadios de la IRC según el filtrado glomerular (Cabrera, 2004).

Estadio	FG (mL/min/1,73 m ²)	Descripción	Tratamiento
-	≥ 60 con factores de riesgo	Riesgo aumentado de ERC	Detección
1	>90	Daño renal* con FG normal	Observación, control de la presión sanguínea
2	60-89	Daño renal* con FG ligeramente disminuido	Control de la presión sanguínea.
3	30-59	Función renal moderadamente reducida	Diagnóstico y tratamiento de las complicaciones
4	15-29	Función renal muy reducida	Insuficiencia renal terminal
5	<15 (diálisis)	Fallo renal	Comienzo del tratamiento sustitutivo

FG, filtrado glomerular; *Daño renal: alteraciones patológicas o marcadores de daño, fundamentalmente proteinuria/albuminuria; otros marcadores pueden ser las alteraciones en el sedimento urinario y alteraciones morfológicas en las pruebas de imagen.

1.4. Etiología de la insuficiencia renal crónica.

La enfermedad renal crónica es un estado fisiopatológico con amplia distribución a nivel mundial. Se considera que la incidencia de IRC en España alcanza entre un 9,16% (en mayores de 18 años) y un 21% (para los enfermos que acuden a las consultas), y cerca de 45.000 personas se encuentran en tratamiento renal sustitutivo (Bermúdez et al., 2011). Por lo que respecta a los EE.UU. la enfermedad renal crónica se presenta en más del 10% de la población (aproximadamente 20 millones de personas) (National Chronic Kidney Disease Fact Sheet, 2010). Hay que hacer notar que se ha observado un incremento en la prevalencia de la enfermedad renal crónica, pasando de un 10% en el periodo entre 1988-1994, a un 13,1% entre los años 1999-2004 (Coresh et al., 2007). Así, para el periodo entre 1982-2003 se ha observado un incremento de tres veces en la incidencia de la enfermedad renal terminal (Stolzmann et al., 2005).

Los factores más comunes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad renal, a nivel mundial, se indican en la Figura 3, y se comentan a continuación.

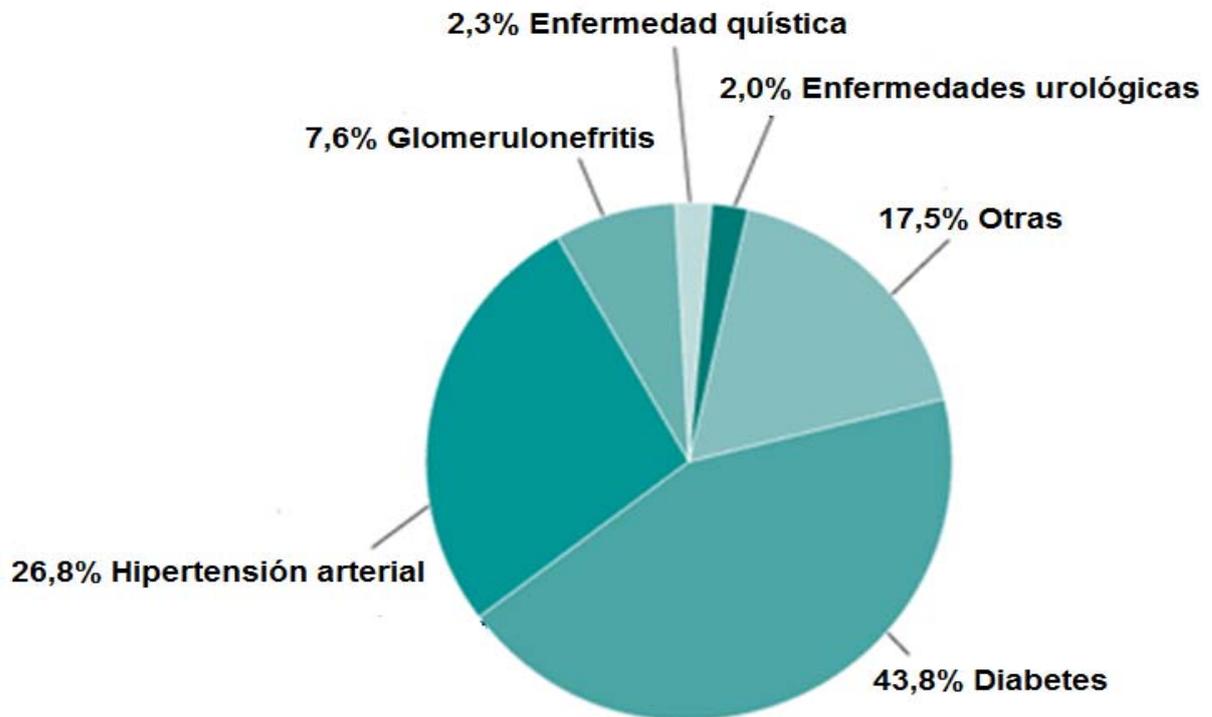


Figura 3. Principales causas de fallo renal (modificado de United States Renal Data System. USRDS 2007 Annual Data Report).

a) La diabetes mellitus (tipo II).

La nefropatía diabética se manifiesta al principio con la aparición de microalbuminuria y la disminución del filtrado glomerular. En los últimos años el número de pacientes con diabetes tipo II que desarrolla problemas renales ha aumentado y hoy en día se ha convertido en la principal causa de la insuficiencia renal crónica. Sin embargo, el número de pacientes con diabetes tipo I se mantiene estable (Akmal, 2001; Harvey, 2003). Varios estudios muestran que el estado de IRC se puede desarrollar como efecto secundario de la diabetes tipo II (Burden et al., 1992).

b) La hipertensión arterial.

Ésta es una patología que bien puede causar la insuficiencia renal o ser consecuencia de la misma. La nefroangioesclerosis es un término utilizado para definir el daño renal generado por la hipertensión. La hipertensión afecta a la microvasculatura

preglomerular y también reduce el suministro de sangre a los riñones (entre otros órganos). En estas condiciones, las nefronas dejan de filtrar adecuadamente, hecho que podría ser causa del aumento de la presión arterial (Mann y Pickering, 1992; National Kidney Foundation, 2004).

c) La glomerulonefritis (o glomerulopatía).

Ésta es una enfermedad inflamatoria que está relacionada con la pérdida de la función renal y puede causar la aparición de sangre y proteínas en la orina. Dichos niveles definen diferentes estadios de insuficiencia renal (Pineda, 2007). La hipertensión arterial puede influir negativamente en el pronóstico de la enfermedad (Quirós et al., 2005). La insuficiencia renal también podría manifestarse como consecuencia del Lupus ya que éste causa la inflamación de los glomérulos de manera parecida a la glomerulonefritis. Esta patología se manifiesta con proteinuria y causa trastornos en el funcionamiento de los túbulos renales (Cameron, 1999).

d) La enfermedad renal poliquística.

Éste es un trastorno hereditario que se manifiesta de dos formas: la autosómica dominante (se desarrolla entre los 30 y los 40 años) y la autosómica recesiva (más típica de los primeros meses de vida). La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de múltiples quistes en ambos riñones que, en el 50% de los casos, lleva al desarrollo de la insuficiencia renal (Torres y Harris, 2009).

e) La enfermedad renovascular.

Se presenta dentro de la población hipertensa, aunque con un porcentaje bajo. Se manifiesta por la oclusión de las arterias y está relacionada con subsecuentes eventos coronarios adversos, causando la hipertensión secundaria y la insuficiencia renal (Edwards et al., 2005).

f) La nefritis intersticial.

La nefritis intersticial crónica se caracteriza por atrofia tubular, infiltración por células mononucleares del intersticio y fibrosis intersticial. Clínicamente se caracterizan por déficit de concentración y acidificación. Las causas de nefritis intersticial crónica son: alteraciones metabólicas (hiperuricemia, nefrocalcinosis, etc.), patología obstructiva (litiasis, tumores, reflujo vesico-ureteral), enfermedades hematológicas (mieloma múltiple), enfermedades autoinmunes (rechazo injerto renal), farmacológico (analgésicos), etc. En el caso de la litiasis renal, los cálculos renales se forman por distintas alteraciones en la composición de la orina como cambios en el pH y el

aumento de la concentración de algunas sustancias. Si no son tratados a tiempo los cambios estructurales obstructivos causan un deterioro renal que conduce a la insuficiencia renal (Gómez Dos Santos y Burgos, 2005).

g) Otras causas.

Otras posibles causas podrían ser las nefropatías causadas por traumatismos o la ingestión de distintos fármacos con efecto nefrotóxico.

1.5. Repercusiones del estado urémico sobre los sistemas y los órganos del organismo.

Las alteraciones bioquímicas y fisiológicas que surgen durante el desarrollo de la insuficiencia renal terminal se definen como síndrome urémico. La insuficiencia renal afecta asimismo a muchos otros órganos y sistemas del organismo. La razón de estos efectos radica en la presencia de las toxinas urémicas que son moléculas que, según su peso, se clasifican como pequeñas hidrosolubles (<500 Da como la creatinina, la urea y el ácido úrico), moléculas de tamaño medio (>500 Da como la IL6, la β 2 microglobulina) y moléculas pequeñas unidas a proteínas (<500 Da como la homocisteína) (Ribes, 2004). Hoy en día se conocen cerca de 90 sustancias que pueden actuar como toxinas urémicas (Vázquez et al., 2003). A continuación se nombran algunos problemas que el estado urémico puede causar sobre diferentes sistemas del organismo.

- a) Aparato circulatorio. En todos los casos la falta de eliminación de la orina lleva al aumento del volumen plasmático, esto favorece la aparición de la insuficiencia cardíaca, a la que además contribuye la hipertensión y la anemia. La formación de depósitos de urea en la serosa pericárdica (pericarditis urémica) causa dolor y también alteraciones en el electrocardiograma. Este estado de retención de volumen y los niveles elevados de renina favorecen la hipertensión arterial que, por otro lado, lleva a la hipertrofia ventricular izquierda. El aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína, puede dañar al tejido arterial y acelerar la coagulación de la sangre. Por estas razones, en la IRC el riesgo de patologías y complicaciones cardiovasculares es muy elevado.
- b) Sistema endocrino. En la IRC se observa hiperparatiroidismo secundario. Asimismo, en las mujeres se observa una disminución de los niveles de estrógenos que causa amenorrea e infertilidad, mientras que en los hombres

- disminuye el nivel de testosterona. Otros efectos suponen anomalías tiroideas, con rasgos de hipofunción, aumento de los niveles de insulina, alteraciones del metabolismo lipídico, aparición de hipertrigliceridemia y aceleración del catabolismo proteico.
- c) Aparato respiratorio. Se puede desarrollar neumonitis urémica y acidosis metabólica, que se manifiesta como respiración magna.
 - d) Alteraciones hematológicas. La menor producción de eritropoyetina renal, el déficit nutricional y las pérdidas por hemorragias suelen ser las causas de la anemia presente en la IRC. Este estado aumenta el gasto cardiaco. Por otro lado, la hemostasia también se ve afectada por la IRC, dando como resultando períodos de hemorragias más largos.
 - e) Aparato locomotor. El déficit de vitamina D debido a la IRC puede causar osteomalacia; asimismo, el hiperparatiroidismo secundario también puede ser causa de alteraciones óseas. Por otro lado, el aumento de los niveles de Ca-P hace que éstos precipiten formando hueso en tejidos blandos (osteodistrofia urémica).
 - f) Aparato digestivo. La urea se acumula en las mucosas formando úlceras; asimismo, aumenta la colonización de *Helicobacter pylori* y aparece anorexia, junto a náuseas y diarreas.
 - g) Problemas neuromusculares. Diversos problemas neuromusculares se asocian con la IRC, entre ellos cabe destacarse la alteración en la capacidad de concentración, el insomnio, la irritabilidad neuromuscular, así como calambres y temblor de manos.
 - h) Piel. La urea puede depositarse en la epidermis formando descamación. En estos casos la piel es seca y de color amarillo pajizo (García-Conde et al., 2003).
 - i) Malnutrición. Las restricciones en la dieta durante el desarrollo de la insuficiencia renal son importantes para el control de la enfermedad en la fase de pre-díalisis. El estado de malnutrición es un parámetro importante, dado que está relacionado con algunas complicaciones en el estado urémico y también, junto con la inflamación sistemática y los desórdenes metabólicos, influye en la mortalidad de este grupo (Oliveira et al., 2010).
 - j) Elevada mortalidad. Se considera que los pacientes con IRC, tanto los IRC/NT como los pacientes sometidos a tratamiento sustitutivo, forman una población con

elevados niveles de mortalidad, sobre todo de causa cardiovascular. Se considera que existe una relación negativa entre el funcionamiento de los riñones y la mortalidad de estos pacientes (Tonelli et al., 2006). La supervivencia de los pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis también difiere significativamente de la supervivencia de la población sana (O'Riordan et al., 2003).

1.6. Tratamiento de la insuficiencia renal crónica.

Como ya se ha visto, el daño renal puede venir causado por una enfermedad que afecte directamente a los riñones o bien puede ser consecuencia indirecta de una patología que afecte a otros órganos. Independientemente de la causa, una vez se ha detectado la IRC es muy importante empezar un tratamiento adecuado para controlar el desarrollo del estado urémico. Para ello, se debe tener en cuenta la causa del deterioro renal para escoger los fármacos adecuados para el tratamiento, evitando la aplicación de aquellos con demostrada nefrotoxicidad, como por ejemplo algunos analgésicos y antiinflamatorios como la aspirina, la indometacina y el ibuprofeno y también algunos antibióticos, antineoplásicos e inmunosupresores. El control de la presión arterial es también muy importante para retrasar el daño a los riñones y, para ello, en la mayoría de los pacientes se emplean inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). La dieta correcta del paciente es otro factor importante para posponer la terapia renal sustitutiva (TRS). Así, aplicando regímenes de nutrición bajos en proteínas, limitando la ingesta de líquidos, sal, potasio, fósforo y el consumo de comidas bajas en grasa y colesterol, se puede ayudar al control de la toxicidad urémica, al menos durante un tiempo (Bianchi et al., 1978; Soroka et al., 1998).

Sin embargo, una vez se ha alcanzado la IRC irreversible, los únicos tratamientos que forman parte de la terapia renal sustitutiva (TRS) son la diálisis y el trasplante renal. Hay dos tipos principales de diálisis: la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. Como variaciones del tratamiento de diálisis se aplican también la hemofiltración y la hemodiafiltración, que son métodos de purificación de la sangre de manera extracorpórea, mientras que la diálisis peritoneal utiliza el peritoneo del propio paciente para filtrar la sangre.

El momento de comenzar el tratamiento sustitutivo es crucial, porque su correcta elección puede prevenir posibles complicaciones relacionadas con la uremia, lo que

está estrechamente relacionado con la evolución de los pacientes. Se ha comprobado que los pacientes con TRS programada tienen menores niveles de morbo-mortalidad frente a los que empiezan el tratamiento de manera no programada (Molina y Rodríguez, 2008).

Según el informe anual de ERA-EDTA 2008 (Registro europeo de recopilación de datos sobre la asociación europea de diálisis y trasplante) en España funcionan cerca de 151 centros de TRS, de los cuales 45 se encuentran en Cataluña. El promedio de edad de los pacientes que empiezan un tratamiento sustitutivo por diálisis, tanto en España como a nivel Europeo, es de entre 61 y 67 años, siendo los hombres el género más afectado.

1.6.1. La hemodiálisis.

Entre las técnicas de TRS la hemodiálisis es la más ampliamente utilizada, comparada con la diálisis peritoneal y el trasplante renal. La primera máquina de hemodiálisis utilizada para tratar humanos, se inventó en 1945 por William J. Kolff (Connor, 1989), y el proceso de diálisis supone tener en cuenta distintas etapas, como se indica a continuación.

1.6.1.1. Acceso a la sangre durante la hemodiálisis.

Antes de empezar el tratamiento de diálisis es necesaria la elaboración de un acceso vascular cómodo. El acceso a la sangre durante la sesión de hemodiálisis se puede realizar mediante:

- Catéter intravenoso central para acceso temporal (CVC), o permanente: El CVC (Figura 4) es un catéter de material sintético que se inserta a través de la vena yugular interna, vena subclavia o vena femoral. Se utiliza para pacientes cuya insuficiencia renal ha progresado rápidamente o ha sido detectada relativamente tarde (estadios 4 y 5) y requieren esta manera de acceso rápido, ya que esta situación no permite que madure un acceso permanente (fístula o injerto intravenoso) o en pacientes en los cuales es imposible realizar una fístula o un injerto. El catéter tiene dos luces y de esa manera permite el flujo bidireccional de la sangre, uno para extraerla del organismo y el otro para devolverla después de la filtración, permitiendo el movimiento de grandes flujos (Ash, 2008). El acceso a través del catéter intravenoso puede funcionar desde unas semanas hasta 3 meses (en el caso del catéter temporal), periodo durante el cual el acceso permanente está madurando. Las complicaciones que puede causar este acceso son principalmente el bajo flujo (que influye a su vez a la adecuación de la

hemodiálisis), las infecciones, la estenosis venosa, la congestión venosa severa (trombosis), la bacteriemia y sangrados. Todos estos aspectos pueden afectar a la supervivencia del paciente (Borrego-Utiel et al., 1996; Delgado et al., 2006).



Figura 4. Catéter intravenoso (Taylor et al., 2005).

- **Accesos vasculares permanentes:** La situación óptima para los pacientes en hemodiálisis es tener su acceso vascular permanente, antes de empezar el tratamiento de diálisis, y utilizar lo menos posible el catéter intravenoso. Hay que recordar que se requieren unos dos meses para que los accesos permanentes maduren y puedan ser utilizados (García Cortés, 2005). Entre los accesos permanentes cabe citar la fístula arteriovenosa (FAV) y el injerto arteriovenoso (IAV).

Para la FAV se procede, a través de un procedimiento quirúrgico, a formar una anastomosis entre una vena y una arteria con localización radiocefálica o en localización húmero braquial en uno de los brazos (Figura 5).

Su período de maduración es de entre 1 y 4 meses. Entre las dos opciones de acceso vascular permanente la fístula arteriovenosa es la mejor variante para los pacientes que inician terapia de diálisis (Rayner et al., 2004), y el uso de FAV se asocia con mayor supervivencia y menor tasa de complicaciones, sobre todo a nivel de trombosis e infecciones (Domiguez et al., 1999; Gruss et al., 2006; Stolic et al., 2011). Las complicaciones más comunes relacionadas con la aplicación de FAV son los aneurismas, la hipertensión venosa y el síndrome del robo, que es cuando la fístula tiene un flujo muy alto y la sangre es atraída dentro de la fístula y retornada a la circulación sin entrar en los tubos capilares del miembro; esto puede ser causa de isquemia en las extremidades (Derakhshanfar et al., 2009).



Figura 5. Fístula arteriovenosa.

El injerto arteriovenoso (IAV) (Figura 6) es parecido a la FAV, dado que se realiza a través de cirugía pero, en este caso, para juntar la vena y la arteria se utiliza un trozo de vena hecha de material sintético. Su ventaja es que madura más rápido que las fístulas.

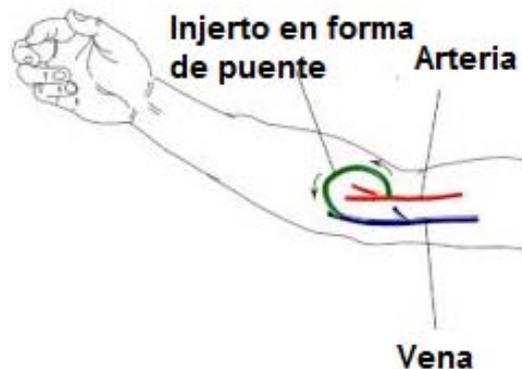


Figura 6. Injerto arteriovenoso.

Entre las complicaciones que podrían surgir tras el IAV están las típicas para el FAV, además de la aparición de estenosis donde el injerto está unido a los vasos del paciente. Este injerto muestra más probabilidades de desarrollar complicaciones relacionadas con infecciones y trombosis y se practica en pacientes cuya fisiología no permite la realización de una fístula arteriovenosa (Schild et al., 2008).

1.6.1.2. Descripción del proceso.

En el proceso de hemodiálisis la sangre del paciente se extrae a través de su acceso vascular y en un circuito de fluido extracorpóreo circula hacia la bomba de sangre de la máquina de hemodiálisis, dirigiéndose hacia la membrana semipermeable. En el

proceso de extracción de la sangre, y antes de que la misma alcance el dializador, se administra anticoagulante. La membrana semipermeable se encuentra en el dializador separándolo en dos espacios uno para la sangre y otro para el dializado, que es el líquido utilizado para “lavar” la sangre. Las fibras de la membrana permiten el paso de las toxinas urémicas e impiden el intercambio de componentes útiles de la sangre (los linfocitos, los glóbulos rojos, las proteínas, etc.). El dializado se administra en el lado opuesto de la membrana y fluye en dirección contraria a la de la sangre, mientras que las sustancias nocivas como la creatinina, la urea y el potasio se eliminan. La limitación en el paso de algunas sustancias se basa en su tamaño; así, las moléculas de gran tamaño no pueden atravesar los poros de la membrana. Después de filtrarse en el dializador la sangre vuelve al cuerpo del paciente. Durante la sesión de diálisis a través de la máquina se controlan parámetros como la presión arterial y venosa del paciente, la presión de administración de la solución de hemodiálisis y la detección de aire en el sistema extracorpóreo.

En la Figura 7 se observa la estructura de la membrana de hemodiálisis y el esquema del proceso de filtración de la sangre.

El tratamiento se puede llevar a cabo tanto en un hospital como en la casa del paciente. Las sesiones en el hospital normalmente duran 3-4 horas y se realizan tres veces por semana, mientras que en el caso de hemodiálisis en casa se pueden realizar hasta seis sesiones por semana (Szromba, 2008).

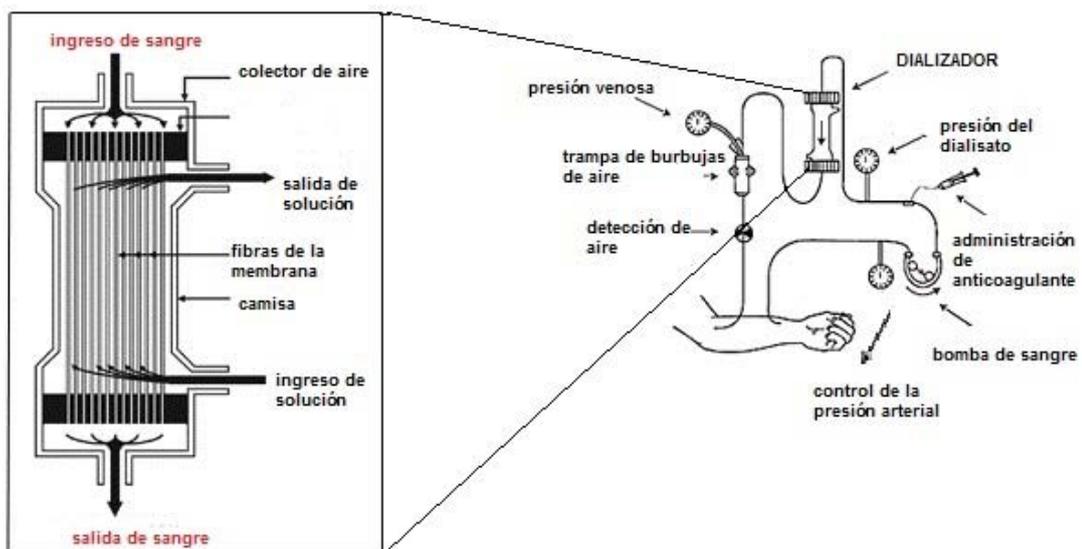


Figura 7. Esquema del proceso de hemodiálisis y estructura de la membrana (NIH-National Institute of Health, 2007).

El proceso de filtración de la sangre se basa en dos fenómenos físicos: a) la difusión y b) la convección.

a) La difusión es un proceso físico irreversible que consiste en la distribución homogénea de partículas y disolvente por gradiente de concentraciones, de mayor a menor concentración, hasta llegar a concentraciones iguales de los dos lados de la membrana. El movimiento se realiza por gradiente de concentración. Este proceso se esquematiza en la Figura 8.

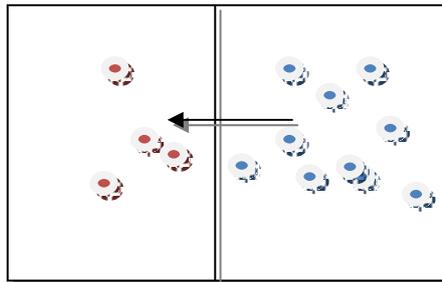


Figura 8. Difusión.

b) La convección requiere un desplazamiento de fluido como consecuencia de una presión aplicada en una cara de la membrana (Figura 9). El movimiento se realiza por gradiente de presión.

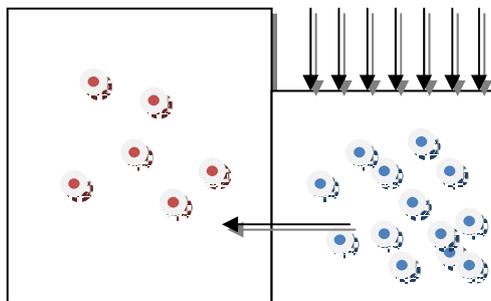


Figura 9. Convección.

Mientras la HD convencional se basa en el proceso de difusión, existen otras técnicas convectivas que utilizan la convección o bien la convección en combinación con la difusión. Así, tenemos:

a) la hemofiltración (HF) que es un método basado en la convección, sin utilizar el baño de diálisis. No hace falta gradiente de concentración porque se aplica fuerza hidrostática y osmótica.

- b) la hemodiafiltración (HDF) es un variante de la hemodiálisis realizada con membranas de alto flujo; esta técnica utiliza para la filtración de la sangre una combinación de difusión y transporte convectivo a través de la membrana. Este tipo de transporte requiere ultrafiltración del fluido en una medida que excede el peso que se quiere eliminar. La hemodiafiltración puede ser también ABF (biofiltración sin acetato) y PFD (filtración pareada).
- c) Por último, tenemos la hemodiafiltración on-line (HDF-OL) en la que se realiza la infusión del líquido de sustitución en modo postdilucional, predilucional o dilución intermedia. Se considera que la capacidad que tiene este método para limpiar algunas toxinas urémicas es mejor que la de la HD y la HF por separado, eliminando moléculas de tamaño mediano (la β -microglobulina, la IL-6 etc.) y grande que se filtran mal por difusión, dando la ventaja de poder controlar más fácilmente algunos parámetros como la presión arterial (Maduell et al., 1999; van der Weerd et al., 2008). La HD-OL se considera uno de los avances más significativos en el desarrollo de la técnica de hemodiálisis en los últimos 50 años. Este tratamiento implica la utilización de membranas de alto flujo, agua ultra pura y máquinas muy precisas. Actualmente en España tan sólo un 22,5% de los pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis están en HD-OL. En la Figura 10 se ilustran los procesos de filtración de la sangre en las diferentes variantes de la hemodiálisis.

En los distintos tipos de tratamiento de diálisis se pueden utilizar cuatro tipos distintos de membranas: 1) membranas de celulosa, 2) membranas de celulosa sustituida, 3) membranas celulosintéticas y 4) membranas sintéticas.

- 1) En el caso de la membrana de celulosa: el material se obtiene de algodón procesado y se puede encontrar bajo distintos nombres como celulosa regenerada, cupramonio-celulosa, cupramonio-rayón y éster de celulosa saponificada. Durante las sesiones de hemodiálisis con este tipo de membranas, se activa al sistema del complemento de la sangre que pasa por la membrana y entra en contacto con los radicales hidroxilo libres de su superficie.
- 2) Entre las membranas de celulosa sustituida se encuentran las membranas de acetato, diacetato y triacetato. En éstas, la mayoría de los abundantes radicales hidroxilo libres de la superficie están químicamente unidos al acetato.

- 3) Las membranas celulosintéticas están hechas por celulosa y el compuesto sintético amino-terciario. La biocompatibilidad de este tipo de membranas es mayor, como resultado de la modificación de su superficie.
- 4) Por último, las membranas sintéticas están hechas de polisulfona, policarbonato, poliamida, poliacrilonitrilo (PAN) y polimetilmetacrilato (PMMA) y no contienen celulosa (Daugirdas et al., 2000). Actualmente, tienden a usarse cada vez más membranas sintéticas, puesto que son más biocompatibles y de mayor permeabilidad hidráulica, ya que permiten eliminar moléculas de mayor tamaño.

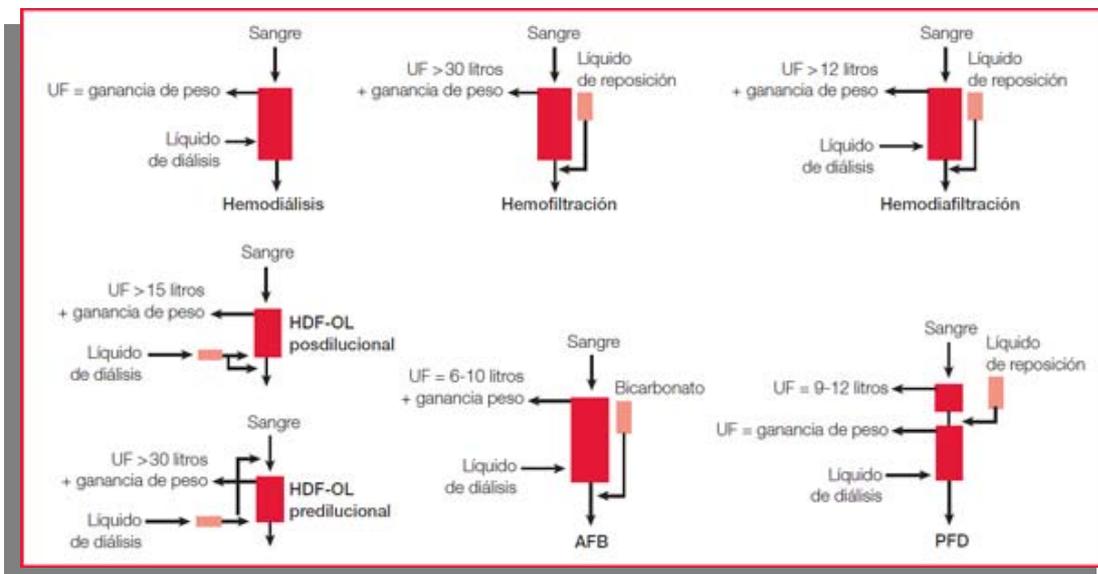


Figura 10. Diferentes modalidades de técnicas de diálisis extracorpóreas. (<http://nefrologiadigital.revistanefrologia.com/>).

1.6.1.3. Efectos secundarios de la hemodiálisis.

Puesto que durante la sesión de hemodiálisis el agua se elimina de la sangre demasiado rápido, se puede provocar una baja presión arterial debido a hipovolemia. En algunos casos después de la sesión también se presenta fatiga, dolores de pecho, calambres o dolor de cabeza. Entre las sesiones se puede observar la sobrecarga de líquidos acumulados bajo la piel en la zona de los tobillos e incluso en los pulmones.

Otras complicaciones del tratamiento lo constituyen las infecciones, tanto de carácter viral como de carácter bacteriano. Esto es debido al acceso vascular permanente que tienen estos pacientes, así como a la reutilización de dializadores (lo que sucede en algunos países como en los EE.UU.) (MMWR, 2001). También se ha observado alta

incidencia de hepatitis en los pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis (Wong et al., 2005; Sulowicz et al., 2007).

La amiloidosis dialítica es otra de las complicaciones más frecuentes. Está causada por la acumulación de β -microglobulina y afecta a las articulaciones, causando artritis (Dorland, 2005).

Otra posible complicación la constituyen las hemorragias, debido a la tendencia de sangrados en el estado urémico, así como al uso sistemático de anticoagulantes durante el tratamiento (generalmente con heparina) y también debido a la administración de fármacos para evitar la trombosis de la fístula (Janssen y van der Meulen, 1996). Por eso, para minimizar estas consecuencias se intenta reducir el uso de heparina y utilizar anticoagulantes alternativos como la protamina o el citrato (Holden et al., 2008).

Entre las complicaciones derivadas de la HD también se pueden observar reacciones alérgicas causadas por el tratamiento. Las reacciones alérgicas agudas normalmente suceden en los primeros minutos del tratamiento de HD, atribuyéndose al uso de heparina o el uso de un dializador nuevo (Berkun et al., 2004; Altintas et al., 2009). Las reacciones en respuesta al dióxido de etileno, utilizado como esterilizante, o el así denominado "síndrome del primer uso"; incluye dificultad respiratoria, urticaria, hipotensión, calambres, náuseas y vómitos. Asimismo, contaminaciones bacterianas del líquido de diálisis también pueden causar reacciones alérgicas y fiebre (Periz y Sanmartín, 2007).

Finalmente, el exceso de potasio en sangre (hipercalemia), es también una complicación frecuente en los pacientes en tratamiento de HD (Putcha y Allon 2007; Tzamaloukas et al., 2011).

1.6.2. La diálisis peritoneal (DP).

La diálisis peritoneal es una técnica que empezó a utilizarse ampliamente a partir de los años 80. Es un tratamiento que da más libertad al paciente puesto que se puede realizar en cualquier lugar fuera del hospital. Si se realiza correctamente, este tipo de tratamiento puede llegar a dar resultados equivalentes a los de la hemodiálisis, siendo también una alternativa para los pacientes cuyo acceso vascular ha fracasado o también para los que tienen algún inconveniente para empezar tratamiento de HD

(Rocha et al., 2010). El tratamiento de diálisis peritoneal se esquematiza en la Figura 11.

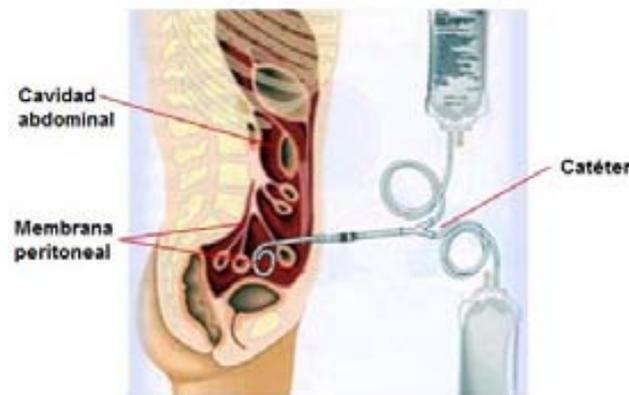


Figura 11. Esquema de la diálisis peritoneal.

El tratamiento sustitutivo de la DP utiliza como membrana semipermeable el peritoneo; así, el agua y los solutos pasan de los capilares peritoneales al líquido de diálisis a través de esta membrana hasta alcanzar el equilibrio. Las sustancias de bajo peso molecular como la urea, la creatinina, el potasio, el cloro, el bicarbonato, el ácido úrico etc. pueden atravesar la membrana peritoneal, mientras que las de peso molecular alto se quedan en la sangre (Martín y Sánchez, 2006). Para el acceso al peritoneo se utiliza el denominado catéter de Tenckhoff que es el que permite el suministro del líquido de diálisis (generalmente solución de glucosa y otras sales) (Stöwas et al., 2002).

La membrana peritoneal tiene una red abundante de vasos sanguíneos que durante la diálisis actúan como las fibras de un riñón artificial (dializador). Para que funcione todo el proceso, primero hace falta llenar la cavidad abdominal con la solución de diálisis, conectando una bolsa de solución al catéter; después de llenar la cavidad abdominal el catéter se cierra por unas horas. La diferencia entre las concentraciones hace que los desechos de la sangre atraviesen la membrana quedándose en la solución. Después el líquido de diálisis se elimina a través del catéter. En la práctica se realizan dos tipos de DP: la diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC) y la diálisis peritoneal automatizada (DPA).

La DPAC es un variante de la DP en la cual el paciente sin necesidad de máquina realiza su diálisis, haciendo 3 - 4 cambios por día con una duración de 30 - 40 minutos por sesión en los cuales se intercambian unos 1,5 - 3 litros de líquido. La DPA se

realiza durante la noche, mientras el paciente duerme; el dializado se cambia con la ayuda de una máquina que llega a intercambiar entre 8 y 12 litros.

La complicación más frecuente durante este tipo de tratamiento sustitutivo es la peritonitis, seguida por las hernias (causadas por la alta presión intraperitoneal constante), los hematomas, los abscesos retroperitoneales y las fugas de líquido de diálisis (Cakir et al., 2008).

1.6.3. El trasplante renal.

El trasplante renal es la mejor opción para el tratamiento de la insuficiencia renal crónica cuando el paciente se encuentra en el estadio 5 o en insuficiencia renal terminal, dado que restaura una parte importante de la función renal. Éste es el tratamiento que muestra mejores resultados de supervivencia y proporciona mejor calidad de vida, sobre todo en los pacientes que no han sido tratados con diálisis anteriormente (Frutos y Cabello, 2010). Sin embargo, la demanda de trasplante renal excede las disponibilidades de riñones para su realización.

Hay dos tipos de trasplante renal, el de donante cadáver y el de donante vivo. En España, el 90% de los trasplantes realizados son de donante cadáver. Por lo que respecta al tipo de trasplante de donante vivo, el primero realizado con éxito se llevó a cabo en 1954 (Murray et al., 1955). Hay que señalar que en los últimos años se observa un incremento significativo en el número de trasplantes de donantes vivos lo que se debe a sus ventajas frente el trasplante de donante cadáver y también al bajo riesgo que supone para los donantes (Domínguez-Gil y Pascual, 2008; Salinas, 2010).

En las personas que ya están en tratamiento de diálisis, el someterse a un trasplante tiene algunos aspectos negativos asociados con el retraso en la función del injerto, el rechazo agudo, la enfermedad cardiovascular, el hábito de fumar y la edad del paciente al iniciar la terapia de diálisis (Andrés, 2010).

Independientemente del tipo, los principales inconvenientes relacionados con los trasplantes renales son la enfermedad cardiovascular y los tumores malignos causados por el tratamiento con inmunosupresores (Veroux et al., 2009).

1.6.4. Comparaciones entre las técnicas de tratamiento sustitutivo.

Comparando las ventajas, medidas en términos de supervivencia del paciente, de las técnicas DP y HD se encuentra que éstas dependen de los diferentes grupos de

pacientes. Así, se ha demostrado que la DP da mejores resultados sobre todo cuando éstos mantienen diuresis residual, respecto la supervivencia, para pacientes más jóvenes y para los que no presentan patología diabética, mientras que la HD es mejor para pacientes con diabetes (Rufino et al., 2011). La proporción de uso de las distintas técnicas sustitutivas (sin el trasplante renal) depende de distintos factores sanitarios, geográficos y económicos. Se observa que el uso de DP es mayoritario en países donde el tratamiento es público. En el caso de España, hace sólo unos pocos años que se ha empezado a prestar más atención al tratamiento DP aunque, de momento no alcanza el nivel de uso del tratamiento con HD (Vega et al., 2005).

Por lo que respecta a la HD-OL, los beneficios que ésta presenta frente la hemodiálisis convencional se relacionan sobre todo con la calidad de vida de los pacientes. La HD-OL minimiza la sintomatología inter-diálisis, mejora los parámetros bioquímicos (la albúmina, la PCR, etc.), disminuye la necesidad de administración de eritropoyetina para el estado de anemia y mantiene mejor la concentración de Ca y P.

1.7. Daño genético asociado con la insuficiencia renal crónica.

Los pacientes con insuficiencia renal crónica, tanto en tratamiento de hemodiálisis como los pacientes no tratados con HD (IRC/NT), forman una población con una alta incidencia de patología cancerosa, de enfermedades cardiovasculares, de envejecimiento prematuro y de reducción en la capacidad de reparar el daño generado en el DNA. Asimismo, se ha propuesto que este grupo de pacientes está bajo condiciones de inflamación, estrés oxidativo y estrés carbonilo, sugiriendo que el estrés oxidativo y la inflamación son mecanismos ligados con el estrés carbonilo (Li et al., 2006).

En la población con IRC, tanto en tratamiento de hemodiálisis como en los pacientes con IRC/NT, se ha observado un aumento de la inestabilidad genética, presentando una alta incidencia de anormalidades cromosómicas estructurales y también niveles elevados de intercambios entre cromátidas hermanas (Cengiz et al., 1988; Liu et al., 2001).

Hay algunos estudios dedicados a la evaluación del daño genético en los pacientes con insuficiencia renal crónica y al estudio de su relación con la progresión de la patología renal. Gran parte del daño en el DNA se asume que es debido a la presencia

de las toxinas urémicas que en los individuos sanos no están presentes, dado que se excretan a través de los riñones. Algunas de estas toxinas urémicas, aparte de la urea, presentan propiedades genotóxicas, y se las ha relacionado con la presencia de la alta incidencia de cáncer mostrada por estos pacientes (Robles et al., 1990; Schupp et al., 2010).

Entre los distintos mecanismos que se han propuesto para explicar la existencia de los elevados niveles de daño genético observados en los pacientes con IRC hay que destacar el daño oxidativo.

1.7.1. El estrés oxidativo.

De manera espontánea, y durante algunos procesos metabólicos, se forman en el organismo las denominadas especies reactivas del oxígeno (EROs), que son moléculas muy reactivas debido a que poseen electrones desapareados, lo que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción. Entre estas moléculas se encuentran los radicales libres, los iones de oxígeno y los peróxidos (Halliwell y Gutteridge, 1989; Pham-Huy et al., 2008).

Como consecuencia de la falta de equilibrio, entre la generación de radicales libres y la capacidad del organismo de eliminarlos, aparece lo que se denomina estrés oxidativo. Como se ha comentado, las fuentes espontáneas de radicales libres son el metabolismo celular del organismo junto con las reacciones de óxido-reducción y de peroxidación lipídica.

Puesto que en los organismos vivos estas reacciones se generan continuamente, éstos se encuentran constantemente bajo el efecto de EROs. Además de los de origen endógeno hay que señalar que los organismos se encuentran también expuestos a otras fuentes de EROs de origen exógeno. Esta situación ha generado la aparición de una respuesta adaptativa constituida por un conjunto de defensas antioxidantes, tanto de origen enzimático como no enzimático. Entre las enzimas más conocidas involucradas en la defensa antioxidante cabe destacar (Molina, 2003):

- la superóxidodismutasa (SOD), que convierte el $O_2^{\cdot -}$ en O_2 y H_2O_2 .
- la catalasa (CAT), que convierte el H_2O_2 en O_2 y agua.
- la GSH-peroxidasa, que cataliza la reducción de peróxidos (ROOH, inclusive el H_2O_2 a alcoholes (ROH).

- las quinonas reductasas y hemo oxigenasas, que previenen la formación de EROs.

Entre los agentes antioxidantes de carácter no enzimático se encuentran los hidrofílicos como la vitamina C (ascorbato), el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina, y los agentes lipofílicos como la vitamina E (alfatocoferol), los carotenoides y las ubiquinonas.

En el estrés oxidativo las especies reactivas del oxígeno interactúan con diversos compuestos celulares causando el así llamado daño oxidativo. Estas interacciones tienen lugar, fundamentalmente sobre los lípidos, las proteínas y sobre el DNA.

Mediante una serie de reacciones en cadena los lípidos de las membranas celulares, se ven afectados, causando la peroxidación lipídica. En estos casos el radical hidroxilo actúa sobre los ácidos grasos de la membrana celular sustrayendo un átomo de hidrógeno, formando de esa manera el peróxido lipídico y el hidroperóxido (Guerra, 1997). Por lo que respecta al daño oxidativo sobre las proteínas, la interacción entre las EROs y los aminoácidos como la metionina, la serina, la lisina, la tirosina etc. causa cambios en la estructura y las funciones de las proteínas, afectando la regulación redox. La señalización redox afecta a las proteínas reguladoras y, a través de oxidaciones específicas cambia su actividad de manera reversible (Maccarrone y Ullrich, 2004).

Sin embargo, en el contexto de esta tesis lo más interesante son los mecanismos de inducción de daño oxidativo sobre la molécula de DNA. Así, la interacción de las EROs (especialmente el $\text{OH}\cdot$) con el DNA, puede causar diversas alteraciones en la molécula del DNA, incluyendo tanto alteraciones a nivel cromosómico como genómico (Wiseman y Halliwell, 1996). Los distintos tipos de daño en la molécula de DNA pueden generarse mediante diferentes mecanismos, entre los que podemos destacar:

- Modificaciones de bases en el DNA. La modificación más frecuente que ocurre bajo la acción de los radicales libres endógenos es la formación de 8-OH-dG, producto que posee potencial altamente mutagénico (Stopper et al., 2004).
- Formación de sitios AP (apurínicos y apirimidínicos). La formación de los sitios AP en el DNA es el resultado de “ataques” específicos o no específicos de los radicales libres sobre la desoxiribosa, produciendo oxidaciones en las posiciones C-1', C-2' o C-4'. Entre los agentes exógenos que producen estos efectos podemos señalar la bleomicina, la irradiación gamma, el H_2O_2 , y la o-phenanthrolina [$(\text{OP})_2\text{Cu}^+$] (Povirk y Steighner, 1989).

- Roturas en la cadena del DNA. Como resultado de la interacción entre los radicales libres y la desoxiribosa se generan roturas de cadena simple.
- Mutaciones causadas por los radicales libres. La oxidación de las bases del DNA, produce errores de sustitución (transiciones o transversiones), que son la principal fuente de inducción de mutaciones génicas (Jackson y Loeb, 2001).

Independientemente del blanco del ataque oxidativo, existe una relación clara entre el estrés oxidativo y el desarrollo de diversas patologías como la aterosclerosis, el envejecimiento y el cáncer, entre otras. Así, el incremento de las EROs es un factor importante para el desarrollo de la aterosclerosis, mediante la modificación de las proteínas de baja densidad en la pared arterial. Estas especies reactivas de oxígeno se producen no sólo por las células endoteliales sino también por las células de los músculos lisos y las células adventicias (Harrison et al., 2003; Vogiatzi et al., 2009).

Por lo que respecta al envejecimiento, se ha comprobado que los niveles de EROs se encuentran en concentraciones elevadas en organismos de edad avanzada en algunos órganos importantes como el hígado, el corazón, el cerebro y los músculos, tal y como un incremento significativo en el daño oxidativo en el DNA nuclear y mitocondrial (Kregel y Zhang, 2007).

Referente al cáncer, se ha observado en varios tipos de cáncer un desequilibrio en la señalización redox celular, demostrándose que las EROs participan en las tres etapas de la carcinogénesis, la iniciación, la promoción y la progresión (Manda et al., 2009).

Se conoce que las EROs son capaces de interactuar con las quinasas unidas a la membrana celular, así como a factores de crecimiento y sus receptores, y causar de esta manera la activación de oncogenes (Sahu, 1990). Además, la acumulación de EROs puede causar mutaciones en los genes supresores de tumores, anulando de esa manera funciones como la transcripción de estos genes, la síntesis de DNA y la reparación, la detención del ciclo celular y la apoptosis (Hussain et al., 2001).

Además de los procesos indicados, el daño oxidativo se encuentra asociado con otras patologías como la diabetes mellitus, la artritis, la hipertensión arterial, la Insuficiencia hepática, la catarata senil, la distrofia muscular, las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson y la isquemia cerebral, entre otras (Guerra, 2001).

1.7.2. El estrés oxidativo en los estados de uremia.

En distintos estudios realizados en pacientes con IRC se sugiere que los diferentes estadios del estado urémico de esta población están relacionados con elevado estrés oxidativo (Annuk et al., 2001; Galle, 2001; Himmelfarb y Hakim, 2003).

El estrés oxidativo en los pacientes con insuficiencia renal se puede generar tanto como resultado de una disminución en la capacidad antioxidante como por un aumento en la producción de EROs. El aumento en la generación de EROS en los pacientes con IRC se relaciona con la acumulación de las toxinas urémicas, resultado de la propia patología, así como debido al contacto con las membranas de diálisis y las infecciones crónicas, resultado de las reacciones a los accesos permanentes para la HD. Por lo que respecta a la disminución de la capacidad antioxidante se observa que los pacientes presentan niveles reducidos de SOD en sangre, así como de catalasa y de glutatión peroxidasa (Vaziri, 2004).

Un marcador ampliamente utilizado para detectar el estrés oxidativo en pacientes con IRC consiste en medir los niveles de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG), un derivado oxidado de la desoxiguanosina que es el mayor producto de oxidación del DNA. Este producto causa la transversión G-T, que es un cambio típico presente en las mutaciones observadas en los oncogenes y los genes supresores de tumores, sugiriendo la participación del daño oxidativo en el DNA en el desarrollo de varios tipos de cáncer (Marnett, 2000). Se ha observado que los niveles de 8-oxo-dG se encuentran elevados en los pacientes con IRC, tanto en los tratados con HD como con DP. Además, se ha observado una relación entre sus niveles y el tipo de membrana utilizado en el tratamiento sustitutivo (Stopper et al., 2004). Hay que señalar que los niveles de 8-oxo-dG dependen tanto de su inducción como de su eliminación y ésta depende de la capacidad de reparar del individuo (Haghdoost et al., 2005).

1.7.3. Productos de la glicación avanzada y compuestos carbonilos reactivos como mediadores de daño en el DNA.

La acumulación de sustancias nocivas nitrogenadas en la sangre, que normalmente se eliminan a través de la orina, se relaciona con la formación progresiva de los denominados productos de la glicación avanzada (AGEs). Los AGEs se forman en una reacción espontánea de los carbohidratos con los grupos amino de las proteínas, pasando por una forma reversible (aductos de base de Schiff) hasta la formación de los productos de Amadori (los productos estables). Muchos de los AGEs pueden

formar enlaces cruzados con proteínas y con el DNA. Así, cultivos de células renales tratados con AGEs muestran elevados niveles de daño en el DNA, proporcionales a las dosis administradas. Como la posterior aplicación de proteasas tripsina y la bromelina reduce este daño genotóxico, se sugiere que el efecto de los AGEs puede venir mediado por los receptores (Stopper et al., 2004). Además, algunos AGEs uniéndose a los receptores aumentan la producción de EROs y el estrés oxidativo; esto supone que parte importante del daño en el DNA inducido por los AGEs puede ser eliminado con la aplicación de antioxidantes (Thornalley, 1996; Schupp et. al., 2005). Entre los distintos AGEs se puede citar:

- N ϵ -(carboximetil) lisina (CML)
- N ϵ -(carboxietil) lisina (CEL)
- Pyrralina

En la Figura 12 se señalan distintas reacciones de formación del CML, como ejemplo de AGE.

El aumento de la inducción de daño en estos pacientes puede que no se debe sólo a los AGEs sino también a los productos de lipoxidación (ALEs), que también se encuentran elevados en plasma. Myiata et al. (1999), asumen que el nivel de estos productos depende de la concentración de sus precursores en el plasma.

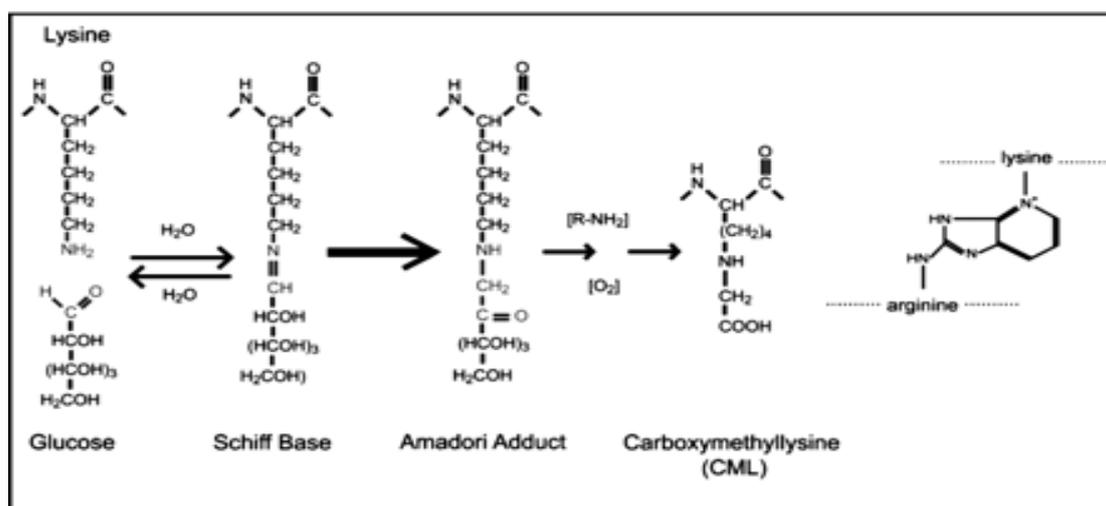


Figura 12. Etapas de formación de uno de los productos de la glicolización, el CML (Bohlender, 2004).

Los AGEs normalmente participan en la homeostasis como señal para la reparación o para la eliminación de las moléculas dañadas. Sin embargo, a concentraciones altas dañan a los tejidos de dos formas;

- Modificando el receptor. La modificación del receptor supone formar enlaces cruzados con las enzimas, disminuyendo su actividad catalítica, produciendo epitopes con características inmunológicas nuevas. Este proceso causa daño en el DNA vía inducción de roturas en el DNA, mutaciones puntuales y lugares AP.
- Otro mecanismo implica la interacción entre los AGEs y RAGE. Estos últimos son receptores específicos para los AGEs, pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas y tienen expresión baja. Su concentración aumenta cuando aumenta la presencia de AGEs en los tejidos. Cuando se unen AGEs-RAGE se activa el factor nuclear NF- κ B (Sebeková et al., 2007).

Los niveles de AGEs se encuentran elevados en los pacientes en tratamiento de hemodiálisis convencional (tres veces a la semana), mientras que los tratados con hemodiálisis todos los días muestran niveles mucho más bajos, sugiriendo de esa manera una clara relación entre el estado urémico y la acumulación de estos productos (Fragedaki et al., 2005). La formación y acumulación de productos de la glicación avanzada en los pacientes con insuficiencia renal crónica se asocian con las complicaciones observadas a largo plazo en esta población. Distintos estudios indican que los niveles de AGEs, sobre todo los de la pentosidina, son más altos en pacientes en tratamiento de hemodiálisis, pero también se encuentran elevados en los pacientes tratados con DP (Friedlander et al., 1995, 1996). Los niveles de CML y CEL se encuentran significativamente elevados en los pacientes con IRC y las concentraciones de CEL en el plasma de los pacientes tratados con PD se encuentran hasta 10 veces más altos que en la población sana, mientras que en los pacientes en HD el aumento llega a ser de 22 veces (Thornalley et al., 2003). Esto coincide con lo encontrado previamente en otro estudio (Degenhardt et al., 1997). La formación de los AGEs alcanza niveles elevados como resultado de la hiperglicemia, la hiperlipidemia, el estrés oxidativo y la escasa eliminación por el deterioro de la función renal en estos pacientes. Para causar su efecto, los AGEs interactúan con receptores específicos (RAGE), causando de esta manera daño a los tejidos y complicaciones. Dado que interactúan con proteínas y lípidos, e inducen estrés oxidativo e inflamatorio, pueden llegar a activar el factor de transcripción NF- κ B y causar alteraciones en la expresión de algunos genes (Aronson y Rayfield, 2002; Meerwaldt et al., 2009).

Resumiendo, la uremia también se caracteriza por un estado de estrés carbonilo, como consecuencia del estrés oxidativo o de la falta de inactivación de los compuestos carbonilos reactivos (Myiata et al., 1999).

1.8. Inestabilidad genética en pacientes con IRC.

Los organismos eucariotas están bajo el ataque continuo de agentes que causan diferentes tipos de daño en el DNA (roturas de simple y doble cadena, apareamientos de bases erróneos, modificaciones químicas en las bases).

Para evitar las consecuencia de la acumulación del daño en el DNA y mantener la integridad del material genético se han desarrollado múltiples vías de detección y reparación, cada una asociada con la reparación de lesiones específicas. Así, el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER, Base Excision Repair), repara daño oxidativo en el DNA (Seeberg et al., 1995); el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER, Nucleotide Excision Repair), repara daño causado por la radiación UV, así, como la mayor parte de los aductos voluminosos (Wood, 1997); mientras que el mecanismo de reparación de falsos apareamiento (MMR, Mismatch Repair) repara las inserciones erróneas y la mala incorporación de bases (Hart et al., 2006) (Figura 13).

En condiciones normales se mantiene un cierto equilibrio entre la inducción de daño genético y la reparación del mismo. Este equilibrio se puede romper tanto por la exposición a agentes con un elevado potencial genotóxico como por un defecto en la capacidad de reparar una gran parte de las lesiones inducidas. Así, la inestabilidad genética es un mecanismo importante en la etiología del cáncer y en las patologías relacionadas con la edad.

La reparación por escisión de bases (BER) es el principal mecanismo involucrado en la reparación del daño oxidativo. En este proceso una glicosilasa específica elimina la base oxidada formando de esa manera un sitio AP, posteriormente éste se convierte en una rotura de simple cadena, reconstruida por la acción de una DNA polimerasa específica y la ligasa (Evans et al., 2000). En la Figura 14 se visualiza el proceso de reparación BER.

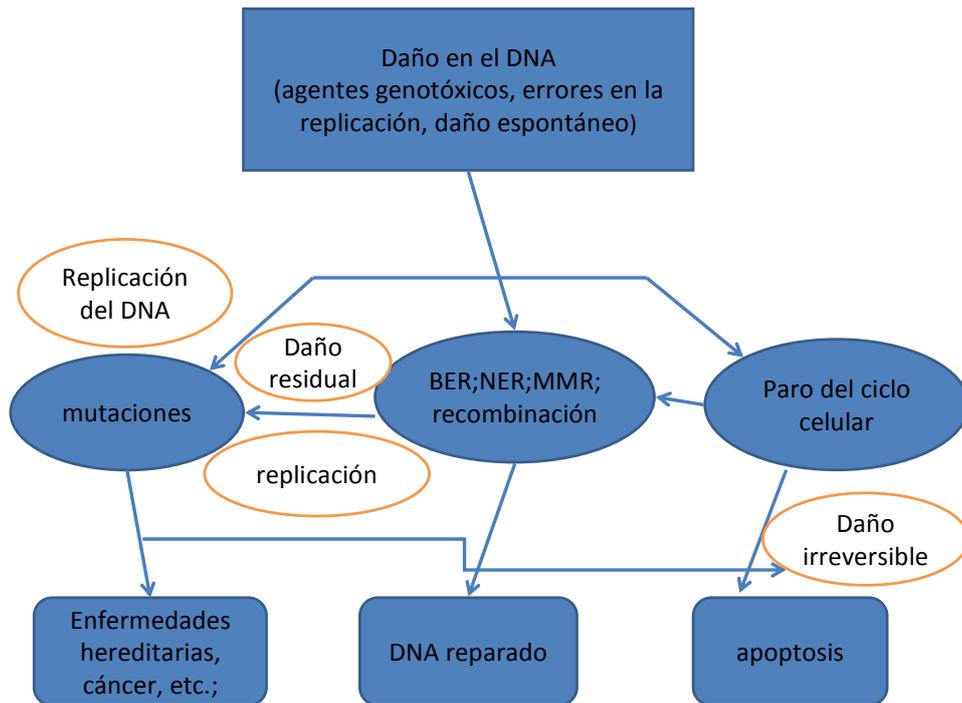


Figura 13. Mecanismos celulares para mantener la integridad del genoma (Krokan et al., 1997).

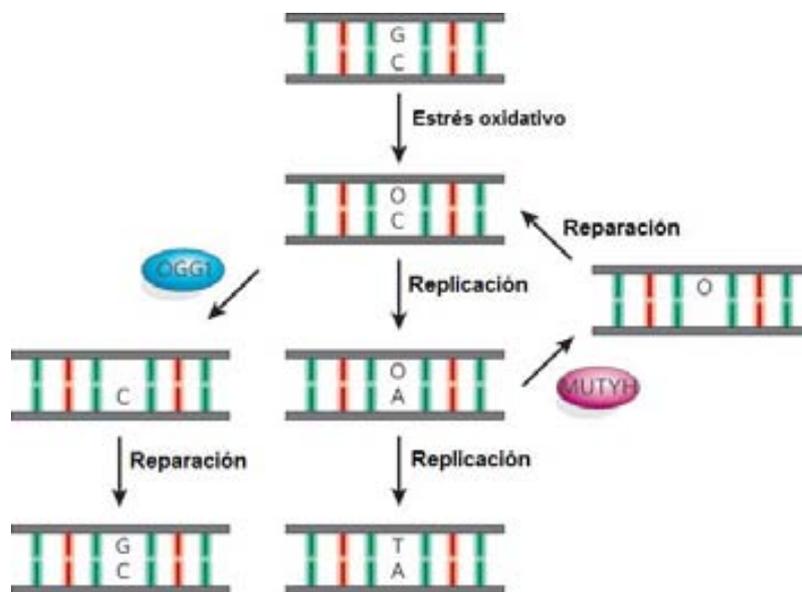


Figura 14. Reparación por escisión de bases (Sheila et. al., 2007).

El mecanismo BER elimina tanto bases dañadas como bases inapropiadas, generadas de manera endógena o inducida por genotóxicos. La reparación por escisión de bases

es la principal y más simple manera (entre los tres tipos de reparación por escisión) de reparar el daño en el DNA causado por las EROs. La reparación del daño oxidativo *in vivo* implica la participación de un gran número de enzimas, incluso algunas necesarias para la reparación NER (Mitra et al., 2001; Hegde et al., 2008). El funcionamiento correcto de la BER es crítico para el mantenimiento de la integridad del DNA y para ello se han descrito múltiples genes involucrados en dicho proceso. Asimismo, se han descrito diversos polimorfismos en los genes de reparación BER asociados con una elevada probabilidad de desarrollar cáncer (Rybicki et al., 2004; Hung et al., 2005; Berndt et al., 2007), lo que indicaría que la inestabilidad genética podría estar ligada a la presencia de estos polimorfismos.

En los pacientes con insuficiencia renal crónica, tanto los individuos que no están en tratamiento con hemodiálisis como los pacientes tratados con HD, presentan altos niveles de daño en su DNA, así como una reducida capacidad de reparación y, probablemente, como consecuencia de esto presentan una alta incidencia de cáncer (Stopper et al., 1999; Peces y Garrancho, 2004).

En un estudio realizado con 11 pacientes en DPAC, 11 pacientes en tratamiento de HD, 10 con IRC/NT y 12 controles sanos se observó que la capacidad de reparar el daño inducido por la irradiación UV estaba reducida de manera muy significativa en los pacientes DPAC y IRC/NT, mientras que en los tratados con HD la capacidad se mantenía normal (Zevin et al., 1991). En otro estudio, los pacientes con IRC que no se encontraban en tratamiento de hemodiálisis también mostraban una capacidad reducida (hasta 60%) de reparar el daño ocasionado en su DNA, hecho que cambia cuando las células se incuban con el plasma de los controles sanos, sorprendentemente, la capacidad de reparar de los pacientes en tratamiento de HD resulta ser mejor que en los pacientes IRC/NT, aunque se ha comprobado que esta capacidad disminuye después de más de 10 años en tratamiento sustitutivo (Malachi et al., 1993; Fragedaki et al., 2005). La inestabilidad genética observada en los pacientes con insuficiencia renal crónica, como defectos en la reparación, también se ha encontrado asociada con un mayor acortamiento de los telómeros (Boxall et al., 2006) que es un marcador claramente ligado con la inestabilidad genómica (Poonepalli et al. 2008; Rampazzo et al., 2010).

1.9. El ensayo del cometa.

Dada la trascendencia de las lesiones en el DNA, tanto espontánea como inducida, se han diseñado todo un conjunto de técnicas para detectarlas.

Entre dichas técnicas están las que miden alteraciones citogenéticas como son los micronúcleos (MN), que evalúan daño clastogénico y aneugénico, las aberraciones cromosómicas y los intercambios entre crómatidas hermanas. Sin embargo, las técnicas citogenéticas presentan la limitación de que requieren células proliferativas para detectar el daño en el DNA como lesiones visibles microscópicamente. Es por esto que últimamente está creciendo el interés por utilizar el denominado ensayo del cometa o ensayo de electroforesis en microgeles de células individualizadas (SCGE). Ésta es una técnica rápida, fácil de realizar utilizando cualquier tipo de células con núcleo y muy útil para detectar el daño genético y la reparación a nivel de células individualizadas (Hartmann et al., 2003; Rao et al., 2004). Las ventajas del ensayo del cometa hacen que su uso se esté expandiendo a diversas áreas de investigación como la biomonitorización de poblaciones expuestas, los estudios nutricionales y la práctica clínica. Además, pequeñas modificaciones introducidas en el protocolo estándar permiten la evaluación del daño oxidativo, así como la detección de la capacidad de reparar el daño inducido en el DNA (Dusinska y Collins, 2008).

1.9.1. Desarrollo histórico del ensayo del cometa.

En 1978 Rydberg y Johanson cuantificaron por primera vez roturas en el DNA en células individualizadas. En su experimento mezclaron linfocitos humanos con agarosa para preparar geles sobre portaobjetos. A continuación lisaron las membranas celulares y desnaturalizaron parcialmente el DNA en condiciones alcalinas. La cantidad de fragmentos de cadena simple generada durante la desnaturalización depende del número de roturas del DNA y para su detección utilizaron el naranja de acridina, que es un agente intercalante que al unirse a las roturas de doble cadena da una tinción de color verde, mientras que cuando se une a roturas de simple cadena da tinción roja. Así, cuantificando la proporción de tinción verde y roja estimaron el daño genético inducido.

Más tarde Östling y Johanson (1984) añadieron un nuevo paso a la técnica, aumentando de esta manera la sensibilidad de la misma. Así, tras irradiar las células y embeberlas en agarosa, realizaron la lisis con una solución neutra de detergentes (pH 9,5, en el que no se separan las cadenas de DNA). Después aplicaron un pequeño

campo eléctrico y tiñeron con naranja de acridina, que dió una coloración verde. Östling y Johanson comprobaron que el DNA migraba hacia el ánodo y que la extensión de la migración dependía directamente de la dosis de irradiación. Este ensayo presentaba dos tipos de problemas: primero, la lisis neutra no degrada el RNA que por su parte interfiere en la visualización correcta del daño al DNA, y segundo, la sensibilidad estaba limitada por las condiciones utilizadas para la disociación de la cromatina, que permite al DNA mantener su estructura terciaria y cuaternaria. Es por esto que en 1988 Singh y colaboradores introdujeron la técnica de microgel con electroforesis alcalina (pH >13), que es capaz de detectar roturas de doble y de simple cadena, además de lugares alcali-lábiles y roturas transitorias de reparación por escisión. Las condiciones alcalinas de la lisis (pH 10) permiten la degradación del RNA y la desnaturalización, mientras que una electroforesis posterior a pH 13, permite la detección de roturas de cadena simple, además de doble. Fueron estos investigadores quienes denominaron a esta técnica, electroforesis en gel de células individualizadas. Dado que las células dañadas muestran el aspecto de un cometa con cabeza brillante y fluorescente y cola cuya longitud e intensidad de fluorescencia depende del número de roturas del DNA, pronto esta técnica se popularizó con el nombre de ensayo del cometa.

Con la finalidad de optimizar la técnica se han ido introduciendo numerosas modificaciones que la han hecho más sensible y a la vez más sencilla de realizar. La variación del pH del tampón de electroforesis hace posible la detección de diferentes tipos de roturas. Así, Olive et al. (1990) realizaron la electroforesis en condiciones ligeramente alcalinas (pH 12,6) lo que les permitió detectar roturas de doble y simple cadena, pero no los correspondientes sitios alcali-lábiles, que no se pueden convertir en roturas bajo estas condiciones, en las que sólo se produce la desnaturalización del DNA. Se han hecho también modificaciones relacionadas con el tipo de células empleadas, concentración y composición de las soluciones utilizadas, concentración y número de capas de agarosa, tinción, tiempo de las etapas del ensayo, etc. (Olive et al., 1992; Fairbairn et al., 1995; Tice y Strauss, 1995; Rojas et al., 1999; Tice et al., 2000) lo que ha llevado a un aumento en la sensibilidad de la técnica (Fairbairn et al., 1995; Miyamae et al., 1997a, 1997b; Yendle et al., 1997; Speit et al., 2009).

A partir de los años 90 la introducción de sistemas informatizados de análisis de imágenes supuso un gran avance, produciendo una optimización en la interpretación de los resultados, e introduciendo un gran número de parámetros para cuantificar el

daño, lo que redujo el tiempo necesario para la lectura, en comparación con las metodologías previas (Olive et al., 1990; Hellman et al., 1995; McCarthy et al., 1997).

1.9.2. Mecanismos de formación de los cometas.

Las roturas producen fragmentos de cadena simple cargados negativamente que en un campo eléctrico migran hacia el ánodo. La Figura 15 muestra dos núcleos de células con diferentes niveles de daño.

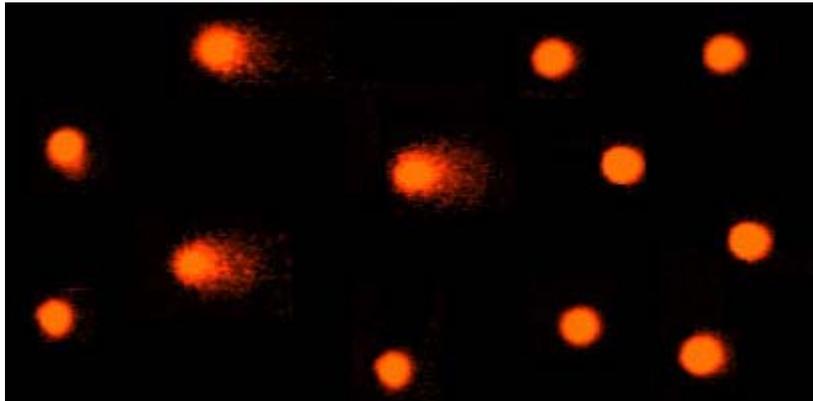


Figura 15. Imágenes de linfocitos aislados en el ensayo del cometa.

Sobre la formación de la cola del cometa existen dos teorías que suponen que ésta está formada por fragmentos de DNA o por bucles relajados de DNA, respectivamente.

Östling y Johanson (1984) propusieron que las roturas de cadena eran suficientes para relajar la estructura del núcleo y permitir su migración bajo la acción del campo eléctrico y, por tanto, estos autores propusieron que los cometas estaban formados por lazos de DNA relajados. De la misma manera Mckelvey-Martin y colaboradores (1993) defendieron la teoría de la relajación del superenrollamiento, argumentando que en las células eucariotas la molécula de DNA extendida puede medir entre 50 y 100 cm de longitud y para caber en el núcleo de 5-10 μm de diámetro es necesario que la molécula se condense unas 10^5 veces. Las roturas en la cadena de DNA, sumadas a unas condiciones alcalinas que permitan la desnaturalización, hacen que haya una relajación del superenrollamiento y la consiguiente emisión del DNA fuera del núcleo.

Así, según Fairbairn y colaboradores (1995) la habilidad del DNA para formar cometas depende del tamaño de la molécula y de sus roturas que, aunque estén ligados a piezas más grandes de la molécula, pueden migrar hacia la cola. Estos autores

afirman que al aumentar el número de roturas, los fragmentos de DNA migran más libremente. Por lo tanto, según ellos, la cola del cometa está formada por fragmentos de DNA ligados o no a piezas más grandes de la molécula, es decir está formada por bucles de DNA relajados. Resultados similares son los de Klaude et al., (1996) quienes realizaron experimentos con el fin de determinar el mecanismo de formación de la cola. Según ellos, en condiciones neutras, la cola está formada por lazos relajados del núcleo, mientras que bajo condiciones alcalinas la cola está formada por fragmentos de DNA. Ellos asumen que hay dos tipos de fragmentos después del tratamiento alcalino: el DNA comprendido entre roturas cercanas de la misma cadena, que podrá desnaturalizarse por completo y migrar como un fragmento libre durante la electroforesis, y el DNA comprendido entre roturas lejanas, que no podrán separarse y sólo podrá relajarse el superenrollamiento del lazo.

Por último, Collins et al., (1997b) han propuesto un modelo en el que la cola del cometa está formada por lazos de DNA relajados y que el número de lazos en la cola indica la cantidad de roturas. Este modelo puede explicar que al incrementar el daño, el porcentaje de DNA en la cola aumente pero la longitud de la cola se sature. Así, la extensión del cometa deberá venir determinada por la longitud de los lazos.

1.9.3. Medición del daño en el cometa.

Los parámetros utilizados para detectar el daño en el ensayo del cometa se basan en medir de forma cuantitativa y/o cualitativa la cantidad de DNA migrada del núcleo (“cabeza”) a la cola del cometa.

En la evaluación directa se puede medir el diámetro de la cabeza y la longitud del cometa de diversas maneras. Se puede utilizar una escala calibrada en el ocular del microscopio o se puede hacer mediante microfotografías (McKelvey-Martin et al., 1993; McCarthy et al., 1997). La categorización subjetiva de los cometas también se puede realizar en función del contenido aparente de DNA en la cola: determinando cinco categorías de 0 a 4, donde 0 es la ausencia de daño y 4 corresponde a células muy dañadas. Este método introduce mucha subjetividad aunque presenta buena correlación con los otros métodos (Gedik et al., 1992; Collins et al., 1997a; Collins, 2004).

El uso de equipos de análisis de imágenes da mediciones mucho más objetivas e introducen nuevos parámetros más representativos del daño genético (McKelvey-Martin et al., 1993; Tice, 1994; McCarthy et al., 1997; Tice et al., 2000). Los

parámetros más utilizados con estos equipos son: la longitud de la cola, el porcentaje de DNA en la cola y el momento de la cola. En la Figura 16 se indica como se miden los parámetros con el programa de visualización. El momento de la cola fue introducido por Olive y colaboradores en 1990 y representa la relación entre la distancia desde el centro de gravedad de la cabeza al centro de gravedad de la cola. Aunque el momento de la cola ha sido muy utilizado, actualmente el porcentaje de DNA en la cola parece ser el parámetro más aceptado porque tiene más sentido biológico.

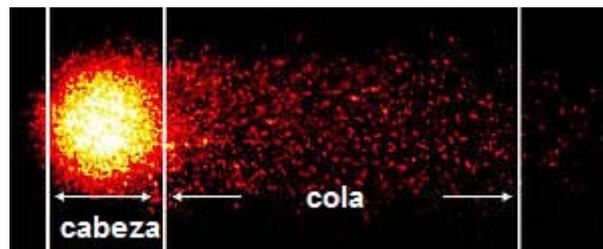


Figura 16. Medición de los parámetros en el ensayo del cometa.

1.9.4. Tipos de daño detectable.

El pH es un parámetro muy importante en la estima del daño medido por el ensayo del cometa. Así, según los diferentes pH de electroforesis utilizados en el ensayo del Cometa se pueden detectar varios tipos de daño.

- a pH 7 - 8 se miden fundamentalmente roturas de cadena doble y enlaces intracatenarios.
- a pH 12,1 lo que se detectan son roturas de simple y de doble cadena, así como roturas transitorias de reparación por escisión y enlaces DNA-DNA o DNA-proteína.
- a pH > 13, el daño mayormente detectado es roturas de simple y de doble cadena, así como roturas transitorias generadas durante el proceso de reparación por escisión.

Los enlaces DNA-DNA o DNA-proteína se pueden detectar aumentando el tiempo de electroforesis (Olive et al., 1992; Tice, 1994; Spanswick et al., 1999), o mediante la aplicación de agentes clastogénicos (como la radiación ionizante) que inducen

elevados niveles de roturas según la presencia o ausencia de enlaces cruzados (Tice, 1994; Singh, 2000).

Las roturas de simple cadena se pueden generar por distintos mecanismos. Así, la existencia de lugares alcali-lábiles, que son los sitios del DNA donde se ha producido la pérdida de una base purica o pirimídica, se convierten en roturas de simple cadena en condiciones alcalinas (Collins et al., 1997a; Horvathova et al., 1998; Tice et al., 2000). Por otro lado, se pueden generar roturas transitorias de simple hebra durante diferentes procesos como la reparación por escisión de nucleótidos y de bases, la escisión directa en la estructura del DNA por la acción de agentes químicos, la escisión luego de la unión de un agente intercalante, por aductos de DNA alcali-lábiles y por la acción de endonucleasas y topoisomerasas (Horvathova et al., 1998). Hay que señalar, de todas maneras que, aunque estas roturas de simple cadena son muy frecuentes en el DNA son fácilmente reparables por lo que tienen poca relevancia biológica si la reparación está exenta de error; pero si el sistema de reparación se satura, en casos de inducción masiva de roturas de simple cadena, se pueden generar fenómenos de muerte celular y eventos de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis (Singh, 2000).

1.9.5. Ventajas e inconvenientes del ensayo del cometa.

El ensayo del cometa es una técnica de evaluación del daño en el DNA muy sensible, cuantitativa y aplicable en el trabajo con distintos tipos celulares, dando información a nivel de célula individual (Singh et al., 1988; Tice, 1994). Las ventajas de la técnica son variadas, destacando que:

- La evaluación se hace individualizada para cada célula. Con el ensayo se pueden detectar diferencias intercelulares tanto en la inducción de daño como en su reparación. También el ensayo se puede combinar con técnicas de identificación de subtipos celulares (Strauss et al., 1994).
- El ensayo se puede llevar a cabo utilizando cualquier tipo de célula eucariota. Además, existen técnicas para obtener células individualizadas a partir de tejidos compactos (Miyamae et al. 1998; Spanswick et al., 2010).
- La cantidad de células necesarias para el ensayo es relativamente poca.
- No es necesario que las células sean proliferativas, lo que es una gran ventaja frente otras técnicas, como el ensayo de MN, por ejemplo.

- Es capaz de detectar diversos tipos de lesiones.
- Es un ensayo simple, rápido, sensible y económico (Singh et al., 1988; Tice y Strauss, 1995; Hellman et al., 1997; Rojas et al., 1999; De Boeck et al., 2000).

En este contexto, hay que señalar que un estudio llevado a cabo por Monteith et al. (1995) sobre la sensibilidad del ensayo del Cometa, comparándolo con otros ensayos de genotoxicidad (AC, mutaciones somáticas, MN y UDS) en diversos tipos celulares y con dos mutágenos estándar, llegaron a la conclusión de que el ensayo del cometa es capaz de detectar el daño observado por los otros ensayos, pero con una mayor sensibilidad. Además, la gran sensibilidad que muestra el ensayo de Cometa le convierte en una técnica altamente aplicable en los estudios de biomonitorización.

Entre los inconvenientes del ensayo cabe indicar la variabilidad de la técnica ya que hay una gran variabilidad intrínseca de la metodología (Tice, 1994; Hellman et al., 1997; De Boeck et al., 2000). Las fuentes de esta variabilidad radican sobre todo, en las concentraciones de las soluciones de lisis, la electroforesis, la concentración de la agarosa, las condiciones de la electroforesis y el observador. Por esto es necesario introducir controles internos en cada electroforesis para minimizar estos efectos. Sin embargo, Singh y Stephens (1997) no encontraron variabilidad entre réplicas del mismo cultivo y calcularon que 100 células por dosis es suficiente para detectar diferencias significativas entre tratamientos. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que cada línea celular muestra distinto grado de sensibilidad.

Por otro lado, cuando el ensayo se realiza con linfocitos de sangre periférica, se debe tener en cuenta la variabilidad intra- e interindividual, que puede estar ocasionada por los denominados factores de confusión individuales, como puede ser la actividad física del donante, que puede incrementar el número de roturas del DNA (Hartmann et al., 1994); la edad, ya que donantes mayores muestran mayor grado de daño (Singh et al., 1990); la dieta, dado que dietas ricas en antioxidantes disminuyen los niveles de daño del DNA (Collins et al., 1997b); el hábito de fumar (Piperakis et al., 2000); o diferencias en la capacidad de reparación entre individuos.

Otro inconveniente del ensayo cuando se aplica a grupos humanos es que la población de linfocitos aislados es heterogénea, lo que puede introducir variabilidad intra- e interindividual.

1.9.6. Aplicaciones del ensayo.

El ensayo del Cometa se puede aplicar a numerosas situaciones:

- Estudios de genotoxicidad. En este tipo de estudios el ensayo del cometa es una herramienta importante para la evaluación de la genotoxicidad *in vivo* e *in vitro* de agentes químicos y físicos utilizando diferentes tipos de células (Speit et al., 2009, Zeiger et al., 2009).
- Aplicaciones clínicas. En los pacientes con cáncer se aplica en los estudios de evaluación de los niveles de daño en el DNA, así como en la determinación de la capacidad de reparar de los diferentes tipos de células tumorales. Se puede utilizar también como herramienta para detectar la resistencia o la susceptibilidad de las células tumorales a la radioterapia, ayudando de esta manera a encontrar la terapia más adecuada para ser aplicada (McKenna et al., 2008). El ensayo también ha encontrado aplicaciones en el diagnóstico prenatal de enfermedades como el xeroderma pigmentosum y la tricotodistrofia (TTD) en combinación con otros ensayos como el UDS (Alapetite et al., 1997); así como para detectar casos con susceptibilidad a diabetes mellitus, por la gran sensibilidad de estos pacientes frente al daño oxidativo (Collins et al., 1997).
- Estudios de reparación. El ensayo del cometa además de permitir la evaluación del daño basal y oxidativo en células aisladas, con la introducción de una mínimas modificaciones se puede utilizar también para medir la capacidad de reparar el daño inducido en el DNA y para comparar las variaciones intra-individuales en la reparación de diferentes tipos de daño (McKelvey-Martin et al., 1993; Rojas et al., 1999). La mayoría de los ensayos convencionales para medir la capacidad de reparar daño en el DNA se basan en la medición de la síntesis del DNA no programada (UDS) o en la eliminación de bases dañadas. Estos métodos resultan ser demasiado insensibles en los casos de bajas concentraciones de los agentes que dañan al DNA. Una variante alternativa es la evaluación de la capacidad de reparar de un extracto celular incubándolo con células sustrato que llevan incorporado determinado daño en el DNA (Collins et al., 2001; Wang et al., 2005; Azqueta et al., 2009; El-Zein et al., 2010).
- Estudios nutricionales y de biomonitorización humana. El ensayo del cometa es un método ampliamente utilizado para detectar genotoxicidad en organismos centinela por su capacidad de detectar diferentes tipos de daño. Tiene gran aplicación en los estudios de biomonitorización ocupacional y exposición ambiental a agentes tóxicos

(Anderson et al., 1998; Møller et al., 2000; Rigonato et al., 2005), utilizándose también para la detección de los efectos de los hábitos nutricionales sobre los biomarcadores de algunas enfermedades (Wasson et al., 2008). El ensayo también encuentra aplicación en la medicina, para la biomonitorización de los niveles basales de daño en el DNA en pacientes con cáncer (Rajeswari et al., 2000; Palyvoda et al., 2003; Smith et al., 2003). Los efectos sobre el daño en el DNA de los diferentes tratamiento del cáncer también se han evaluado con el ensayo de cometa (Johnstone et al., 2000; Kopjar et al., 2002; Popanda et al., 2002). En los estudios de biomonitorización hay que tener en cuenta los factores de confusión que pueden afectar a los resultados del ensayo, como la edad, el género, los polimorfismos genéticos, el hábito de fumar y el consumo de alcohol. El ensayo detecta roturas temporales, que en condiciones normales se reparan al cabo de unas horas antes de ser fijadas como mutaciones, por eso la determinación paralela de los efectos genotóxicos se ha llevado a cabo con otros ensayos citogenéticos que han validado los resultados dados por el ensayo del cometa (Faust et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los pacientes con insuficiencia renal, tanto los que están en tratamiento de diálisis como los que se encuentran en una etapa previa de la patología, constituyen una población con alta incidencia de diferentes patologías, como el cáncer y las patologías cardiovasculares, que se relacionan con la inestabilidad genómica. Para este tipo de pacientes también se han observado elevados niveles de daño oxidativo, incluyendo daño en el DNA, posiblemente como consecuencia de una capacidad disminuida de reparar las lesiones en el DNA.

En este contexto, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. La evaluación del daño genómico en pacientes con insuficiencia renal crónica, a través del ensayo del cometa.
2. La evaluación del daño oxidativo mediante el uso de las enzimas Endo III y FPG.
3. Determinar la posible asociación entre niveles de daño genómico y evolución de la patología.
4. Comprobar la posible relación entre el tiempo en tratamiento de hemodiálisis y los niveles de daño.
5. Determinar si con el cambio de técnica de hemodiálisis se consiguen disminuciones en el nivel de daño en el DNA y en la calidad de vida de estos pacientes.
6. Realizar estudios de reparación con pacientes en tratamiento de hemodiálisis convencional, con el fin de comprobar su capacidad de reparar y su relación con los niveles de daño genómico.
7. Estudiar la mortalidad en los pacientes en tratamiento de hemodiálisis y su relación con los niveles de daño genómico que presentaban.

8. Identificar posibles factores involucrados tanto en la génesis de la patología IRC como en su desarrollo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sujetos del estudio.

Este trabajo se ha llevado a cabo evaluando un total de 364 individuos cuya distribución en los distintos grupos de estudio vienen definidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Individuos incluidos en el estudio.

Pacientes con IRC		Controles	
IRC/NT	HD		
184	121		59
	Seguimiento		
	HD	HD on-line	
	49	18	
Total = 364			

HD (pacientes en tratamiento de hemodiálisis); IRC/NT (pacientes con insuficiencia renal crónica no tratados con diálisis); HD on-line (pacientes con tratamiento de hemodiafiltración on-line).

Tanto pacientes como controles fueron reclutados en la Fundació Puigvert. Una descripción más detallada de las características de los individuos se indica en la sección de Resultados.

3.2. Obtención de muestras de sangre.

En el presente trabajo se ha utilizado como material primario muestras de sangre periférica de los donantes indicados. Los pacientes se caracterizan por sufrir distintos grados de insuficiencia renal crónica (IRC) y los más afectados se encuentran en un programa de tratamiento de hemodiálisis. Los controles se escogieron entre los pacientes que visitaban dicho hospital por afecciones leves que no incluyen la IRC

(tienen un filtrado glomerular superior al de los pacientes, siendo éste el criterio para incluirlos en el estudio).

La extracción de la muestra de sangre se realizó en la Fundació Puigvert de Barcelona utilizando tubos Vacutainer con anticoagulante EDTA. Tras la extracción, las muestras se transportaron a la Universitat Autònoma de Barcelona a temperatura ambiente, donde fue procesada.

Antes de participar en este estudio todos los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de dicha fundación.

3.3. Obtención de linfocitos de sangre periférica.

Para llevar a cabo la determinación de los niveles de daño genético de los pacientes se trabajó con linfocitos aislados según el siguiente protocolo. Se toman 30 μL de sangre de cada participante en el estudio y se mezclan con 1 mL de PBS, en tubos de eppendorf, dejándose durante 20 minutos en hielo. Para conseguir la separación de los linfocitos de los distintos tipos de células sanguíneas se utiliza un método basado en las diferentes densidades de los tipos celulares de la sangre. En la Figura 17 se indican las distintas densidades de los diferentes tipos celulares presentes en la sangre y en la Figura 18 se esquematiza el protocolo seguido.

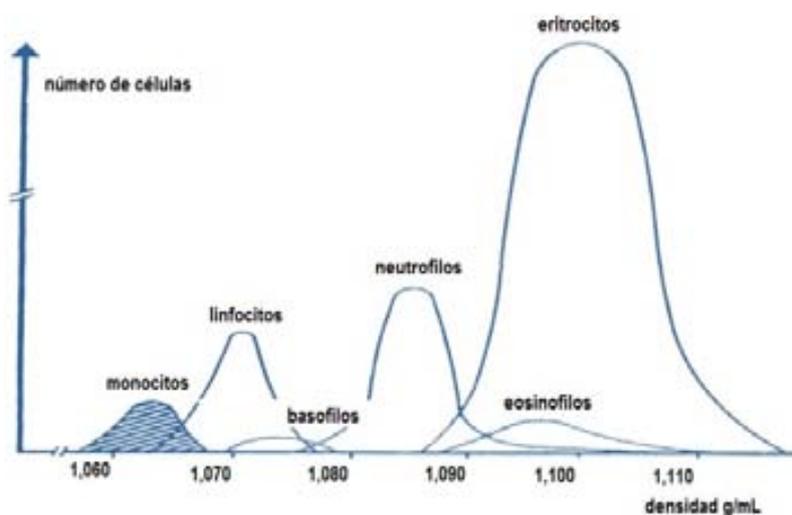


Figura 17. Distribución de las células sanguíneas en gradiente de densidad (Boyum, 1968).

Para realizar la separación de linfocitos, en la parte inferior de cada eppendorf se colocan 100 μ L de Ficoll (polisacárido hidrófilo de gran masa utilizado como medio para aislar linfocitos), en la parte inferior de cada eppendorf, evitando que se mezcle con la sangre. A continuación, los eppendorfs se centrifugan a 2000 rpm durante 3 minutos y a 4 °C. El Ficoll aglutina los eritrocitos en el fondo del tubo y entre las fases de Ficoll y plasma se forma un anillo de linfocitos. Después de la centrifugación, este anillo de linfocitos se traspasa a un nuevo eppendorf con 1 mL de PBS y se centrifuga de nuevo bajo las mismas condiciones, para eliminar la posible inclusión de todo aquello que no sean los linfocitos.

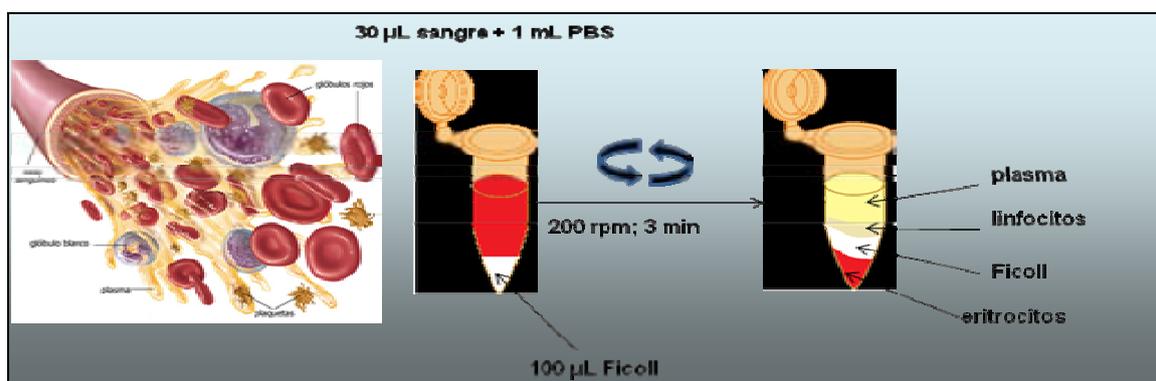


Figura 18. Protocolo de aislamiento de linfocitos.

3.4. Ensayo del cometa.

Para evaluar el daño genético presente en los linfocitos de los donantes se utilizó la versión alcalina (pH 13,2) del ensayo del cometa, que es una variante muy sensible para la detección de bajos niveles de daño.

El ensayo del cometa se llevó a cabo según el método inicialmente descrito por Singh et al. (1988) con distintas modificaciones desarrolladas en el Grupo de Mutagénesis. El proceso consta de distintas fases (ver Figura 19):

a) Preparación de los portaobjetos

Portaobjetos de tamaño 76 x 26 mm se sumergen en alcohol para desengrasarlos y posteriormente se cubren con una capa fina de agarosa. Para ello se depositan sobre cada uno de ellos 170 μ L de NMA (normal melting agarose) disuelta en agua destilada y se secan a 65 °C.

Por cada donante se prepararon 8 portaobjetos (uno para el control negativo, dos para los tratamientos con enzimas (Endo III y FPG) y uno para el daño basal, con sus respectivas réplicas).

b) Preparación de las capas de células

A cada uno de los portaobjetos preparados en el apartado anterior se le añadió una mezcla de linfocitos y LMA. Para ello, los linfocitos recogidos se mezclaron con 140 μL de agarosa LMA (low melting agarose), y se colocaron en forma de dos gotas separadas de 70 μL sobre los portaobjetos. Las dos gotas se cubrieron con dos cubreobjetos de tamaño 18 x 18 mm para constituir una capa. Para solidificar la agarosa las preparaciones se mantienen 10 minutos en la nevera a 4 °C. Posteriormente se quitaron con cuidado los cubreobjetos para no remover los geles de la segunda capa.

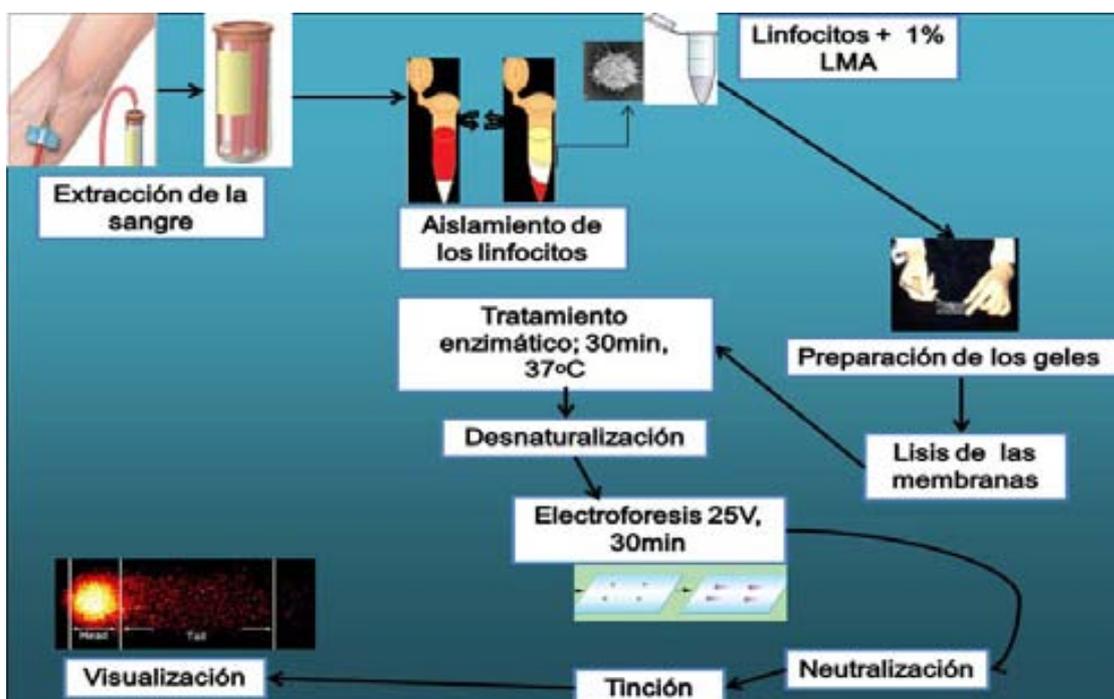


Figura 19. Esquema del protocolo seguido para la realización del ensayo del cometa.

c) Lisis de membranas

Los portaobjetos preparados se sumergen en una solución de lisis que está formada por: 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris - HCl y un 1% Tritón X100, añadido justo antes de utilizar la solución, ajustando el pH a 10. Esta solución de lisis preparada previamente, se mantiene en la nevera a 4 °C (para enfriarse), sobre todo para asegurar la estabilidad de los geles de agarosa. La lisis se realiza por un tiempo

que puede variar de 1 hora a 24 horas, según las necesidades experimentales. La alta concentración de sales y detergentes de esta solución permite la destrucción de las membranas plasmáticas y nucleares, así como la pérdida de algunas histonas y restos citoplasmáticos (Singh, 2000). Los geles que corresponden al control negativo se mantienen en la solución de lisis hasta realizar la electroforesis.

d) Desnaturalización y electroforesis

Todas las preparaciones se colocan ordenadamente en un tanque horizontal de electroforesis y se cubren con una solución de electroforesis durante 40 minutos. Esta solución está formada por 1 mM Na₂EDTA y 300 mM NaOH, ajustando a pH 13,2. La alcalinidad de esta solución lleva a la disociación de la doble cadena del DNA. Después de la desnaturalización se realiza la electroforesis bajo las condiciones de 30 minutos a 4 °C, 25 V y 300 mA.

e) Neutralización y fijación

Una vez terminada la electroforesis los portaobjetos se lavan 2 veces durante 5 minutos con una solución de neutralización preparada con Tris 0,4 M, y un pH ajustado a 7,5 para que se pueda neutralizar la alcalinidad de la solución de electroforesis y eliminar los restos de detergentes que puedan interferir con el proceso de tinción y, consecuentemente, con la posterior visualización (McKelvey-Martin et al., 1993). A continuación, las preparaciones se lavan durante 10 min con agua destilada y después se secan al aire. Una vez finalizado este proceso los portaobjetos se pueden almacenar en cajas oscuras a temperatura ambiente hasta la tinción.

f) Tinción y visualización

La tinción se realiza con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) colocando 20 µL de una concentración de 1 µg/mL sobre cada gel y cubriéndolo con un cubreobjetos.

Para la visualización se utiliza un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX50) con filtro de excitación de 480-550 nm, lámpara de mercurio de 100 W y filtro de barrera de 590 nm, conectado a una videocámara Hitachi Denshi, Ltd. CCD-IRIS. La obtención de las imágenes de las células se realiza mediante el programa Komet 5.5 (Kinetic Imagind Ltd.) a un aumento de 40x.

El programa está diseñado para poder distinguir la cola del cometa del núcleo y puede cuantificar una gran variedad de parámetros. Para cada célula seleccionada la

videocámara captura la imagen y cuantifica el daño observado. En la Figura 20 se observan núcleos con distintos niveles de daño genético.



Figura 20. Núcleos con distintos niveles de daño genético.

Durante todo el proceso las muestras se mantienen en hielo reduciendo de esta manera la actividad metabólica y la posible actividad reparadora de los linfocitos. Los pasos del ensayo, después de la lisis de las membranas celulares, se llevaron a cabo en un entorno con luz reducida (amarilla) con el fin de evitar posible daño adicional al DNA.

3.5. Detección de daño oxidativo.

El ensayo del cometa, además de medir daño genético basal (roturas de simple y doble hebra), también puede medir daño oxidativo en las bases del DNA, con una simple variación del protocolo. Para ello, después de la lisis de las membranas celulares se realiza un tratamiento con enzimas extraídas de *Escherichia coli*, de la familia de las enzimas reparadoras del DNA que reconocen las bases oxidadas de los nucleótidos y las eliminan por hidrolización del enlace N-glicosídico que los adhiere a la molécula del azúcar de la cadena de DNA.

Las enzimas utilizadas han sido:

La FPG (formamidopirimidina DNA glicosilasa), que reconoce purinas oxidadas (sobre todo la 8 oxoguanina, que es el principal substrato para esta enzima) e hidroliza el enlace que las une a las desoxirribosas.

La Endo III (Endonucleasa III), que reconoce pirimidinas oxidadas y las corta de manera similar a como ocurre con la FPG.

El uso de estas dos enzimas tiene un efecto sustancial en la medición del daño genético ya que aumenta el índice de daño observado hasta 4 veces (Collins et al., 1996), además de permitir su cualificación.

Las enzimas utilizadas en este estudio nos fueron proporcionadas por el Prof. Andrew Collins del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oslo (Noruega).

Para el tratamiento con las enzimas las preparaciones se lavan previamente dos veces con el tampón de las enzimas (40 mM HEPES, 0,1 M KCL, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA,) durante 5 minutos cada vez. El tampón se ajusta a pH 8,0 mediante KOH. Una vez lavados, los portaobjetos se tratan con 50 μ L de las enzimas (FPG o Endo III), a una concentración de 5 μ L en 500 μ L de tampón, utilizando una solución madre a una concentración de 1/3000), y después se cubren con cubreobjetos de tamaño 22 x 22 mm. Posteriormente se realiza una incubación durante 30 minutos a 37 °C en una cámara húmeda.

3.6. Determinación de la capacidad de reparar bases dañadas.

La mayoría de los métodos diseñados para medir los niveles de reparación del DNA generalmente tienen poca sensibilidad para determinar la respuesta de los linfocitos humanos frente a dosis bajas de agentes genotóxicos. Un método alternativo consiste en la medición de la actividad reparadora *in vitro* de un extracto celular de un determinado donante, incubado con un substrato que contiene daño específico en el DNA (Collins et al., 2001). Para llevar a cabo este estudio, se procede como se indica a continuación:

a) Preparación de las células del extracto celular

Se aíslan linfocitos a partir de 10 mL de sangre periférica de los distintos pacientes, realizando la sedimentación con Lymphoprep, seguida de dos lavados con PBS 1x. Las células obtenidas se resuspenden en 10 mL de tampón A 3x diluido (45 mM HEPES, 0,4 M KCL, 1 mM EDTA, 0,1 mM ditiotreitól, 10% glicerol, pH 7,8, más dos volúmenes de H₂O). La densidad celular se cuenta en una cámara de Neubauer (10 μ L de células

+ 90 μ L de Trypanblue). Se realiza una centrifugación a 700 g, durante 5 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante y añadiendo 20 μ L de tampón A por cada 106 células. De esta suspensión se preparan alícuotas de 50 μ L en crioviales que se congelan de manera rápida en nitrógeno líquido, para guardarlos después a -80 °C.

b) Preparación de las células del substrato

A partir de 20 mL de la sangre de un donante sano, obtenida con el anticoagulante EDTA, se aíslan los linfocitos siguiendo el protocolo de Lymphoprep. La cantidad de células aisladas se reparte en dos tubos, uno de los cuales se trata con el compuesto fotosensible Ro 19-8022 (Hoffmann- La Roche, Basel, Switzerland) (20 μ L de solución Ro 1 mM) y se irradia con una lámpara halógena de 500 W durante 5 min a una distancia de 33 cm. Durante el proceso de irradiación los tubos se mantienen en hielo para evitar la reparación. El otro tubo, que sirve de control, también se irradia, pero sin Ro 19-8022.

Tras la irradiación, las células se centrifugan a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se cuenta la densidad celular y después de otro centrifugado a 1500 rpm durante 5 min y a 4 °C se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden en medio para congelar (RPMI 80%, suero 20%, DMSO 10%) a una densidad de 106 células/mL y se hacen alícuotas de 0,5 mL. Las alícuotas se congelan lentamente a -80 °C.

c) Incubación

Para el ensayo se utilizan dos alícuotas de substrato (tratado y no tratado con Ro 19-8022). A cada tubo se le añade 1 mL de PBS frío y se transfieren a tubos con 10 mL de PBS, centrifugando durante 5 min a 1500 rpm y a 4 °C. Se elimina el sobrenadante, se resuspende el pelet y se añade PBS hasta un volumen de 2 mL. Se añaden 60 μ L de la suspensión celular a 280 μ L de 1% LMP agarosa (disuelta en PBS), preparándose 12 geles de 5 μ L en cada portaobjeto. Para cada experimento se preparan 4 portaobjetos y en cada uno se colocan 12 muestras, según se muestra en la Figura 21.

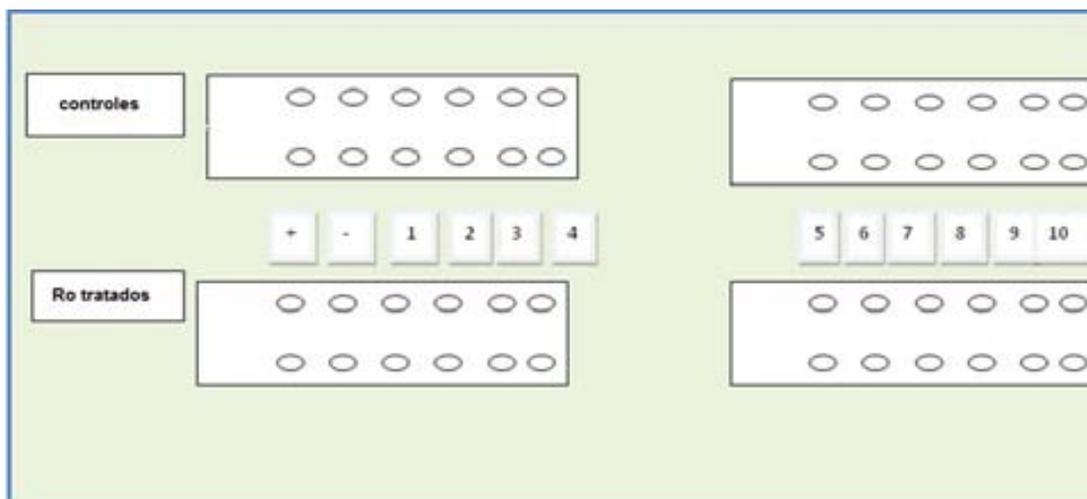


Figura 21. Esquema del experimento de reparación in vitro BER.

+ control positivo (FPG); - control negativo (tampón F); cada posición de 1 a 10 corresponde a un paciente (el mismo para los portas control y los tratados con Ro).

Después de preparar los geles, éstos permanecen 5 min a 4 °C y luego se sumergen en la solución de lisis durante toda la noche. De las alícuotas obtenidas de cada paciente se procede a obtener su extracto. Para ello, una vez descongeladas se dejan en hielo y se les añaden 12 µL de solución de 1% de Tritón en tampón A. Tras 5 min de tratamiento se centrifuga a una velocidad de aproximadamente 13000 g, durante 5 min y a 4 °C para separar el núcleo y los restos celulares. Se toman 50 µL del sobrenadante y se mezclan con 200 µL de tampón F (tampón de enzimas del ensayo del cometa estándar). Todo el proceso se realiza manteniendo las muestras y las soluciones en hielo.

Después de la lisis los portaobjetos se lavan 3 veces durante 5 min cada vez con tampón F a 4 °C. A continuación, los portaobjetos se colocan en una cámara de incubación para 12 geles (Severn Biotech) y a cada gel se le añaden 30 µL de extracto o de tampón F (C-) o de FPG diluido en tampón F (control +). Se cubren con parafilm y se incuban durante 45 min a 37 °C.

El extracto no utilizado en el tratamiento se guarda a -20 °C y se utiliza para la determinación proteica. Para ello el extracto se diluye 12x, se mezcla con una solución de Fluoram y se cuantifica el nivel de proteínas mediante el Nanodrop.

Tras la incubación se procede con el protocolo estándar del ensayo del cometa. Para ello los portaobjetos se colocan sobre hielo y se lavan con solución de electroforesis

para parar completamente la reacción. La desnaturalización dura 20 min seguida por una electroforesis de 20 min, a 25 V, 300 mA. Después de la electroforesis las preparaciones se lavan durante 10 min con PBS y 10 min con agua y luego se secan durante 15 min en etanol 70% y 15 min en etanol absoluto. Después de secarlos al aire se pueden teñir en un baño con 25 mL de tampón TE con 30 μ L de SyberGold 1x por 40 min, en agitación y a la temperatura de 4 °C. Se lavan dos veces con agua y se dejan secar. La visualización se realiza con el software Comet IV (Perceptive Instruments) contándose 30 células por cada gel.

Hay que indicar que las muestras de sangre se obtuvieron en la Fundació Puigvert, la preparación del extracto se realizó en la Universitat Autònoma de Barcelona, y el ensayo se ha llevado a cabo en el laboratorio de Prof. Andrew Collins en la Universidad de Oslo (Noruega).

3.7. Análisis estadístico.

Para el análisis de los resultados obtenidos en el ensayo del cometa (independientemente de sus modificaciones) se utiliza el parámetro porcentaje de DNA en la cola, que es un parámetro recomendado que proporciona una indicación clara de la formación de los cometas, y por presentar una relación lineal con la frecuencia de roturas del DNA (Cederberg et al., 2010). Con todos los valores obtenidos se ha realizado una base de datos mediante el programa SPSS para que posteriormente se pueda llevar a cabo el análisis estadístico. Después de comprobar la distribución normal de los valores (prueba Kolmogorov-Smirnov), que mostró normalidad, se decidió utilizar pruebas paramétricas. Las comparaciones entre los grupos se hacen con la t-Student para muestras independientes y las comparaciones entre las evaluaciones de daño del mismo grupo con la t-Student para muestras relacionadas. Los coeficientes de correlación entre los diferentes parámetros clínico-analíticos y el daño en el DNA se calculan a través del test de correlaciones bivariadas de Pearson. El efecto de los parámetros disponibles para estos pacientes, sobre el daño en el DNA evaluado, se analizó mediante un modelo lineal general univariante. Ya que los valores de daño oxidativo medidos en las pirimidinas seguía una distribución no normal, el análisis con estos valores se ha realizado mediante pruebas no paramétricas (la prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos y la prueba de Wilcoxon para la comparación de muestras relacionadas).

Los resultados se presentan como la media \pm su error estándar y se consideró estadísticamente significativa una *P* inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características de la población estudiada.

En el presente estudio han participado un total de 364 individuos de los cuales 121 eran pacientes con insuficiencia renal terminal sometidos a tratamiento de hemodiálisis convencional (HD). De estos pacientes en HD 67 se evaluaron de nuevo al cabo de aproximadamente un año para ver su evolución; de ellos 49 seguían en tratamiento convencional, mientras que 18 habían cambiado de tratamiento y pasaron a ser tratados con hemodiafiltración on-line. Otros 184 eran pacientes con insuficiencia renal crónica no tratados con diálisis, dado que no han llegado al estadio de insuficiencia renal terminal (IRC/NT). Finalmente, 59 personas sin síntomas de IRC formaban la población control. Todos los individuos se reclutaron en la Fundació Puigvert de Barcelona y se muestrearon en nuestro laboratorio entre Enero de 2007 y Mayo de 2010. Se recogieron distintos datos demográficos de todos los participantes en este estudio mediante la revisión de sus historias clínicas. Además, se obtuvieron toda una serie de parámetros clínico-analíticos, medidos habitualmente en los pacientes con IRC, como nitrógeno uréico en la sangre (BUN), creatinina, sodio, potasio, bicarbonato, ácido úrico, colesterol, calcio, fósforo, glucosa, fosfatasa alcalina, transaminasas, bilirrubina, colesterol total, triglicéridos, albúmina, ferritina, hemoglobina y recuento de leucocitos; también se midieron los niveles de proteína C reactiva y homocisteína, entre otros parámetros. Los análisis para la obtención de estos parámetros bioquímicos se han llevado a cabo en la Fundació Puigvert.

En la Tabla 3 se pueden ver algunas de las características de las personas que participaron en el estudio. Como se puede observar, la edad media de la población control es significativamente más baja, en comparación con la edad media de los pacientes con insuficiencia renal, tanto en hemodiálisis como en los no tratados con terapia sustitutiva ($P < 0,001$). También se encuentran diferencias en la edad entre el grupo IRC/NT y el grupo HD, siendo más alta en la población pre-diálisis ($P = 0,020$).

Tabla 3. Características de la población estudiada.

	IRC/NT (n=184)	Hemodiálisis (n=121)	Controles (n=59)
Edad (años)	66,90 ± 0,98 ***	63,02 ± 1,34 ***	51,80 ± 1,90
Género (% hombres/mujeres)	59,8% / 40,2% **	62% / 38% **	55,9% / 44,1%
IMC (Kg/ m ²)	26,97 ± 0,35	24,76 ± 0,42 ***	27,07 ± 1,01
Tiempo en tratamiento (meses)	ND	37,31 ± 4,09	-
Trasplante renal previo (% sí-no)	ND	24,4% - 75,6%	ND
Estadio según filtrado glomerular (1-5), 6= tratamiento de diálisis	3 (47,3%); 4 (41,3%); 5 (11,4%)	6 (100%)	1 (76,4%); 2 (23,6%)
Peso (kg)	73,10 ± 1,05	66,71 ± 1,18	ND
Evolución (vivos/fallecidos)	ND	68% / 31,9%	ND
Enfermedades presentes en la población			
Cáncer (sí-no)	24,6% - 75,4%	28,1% - 71,9%	0 - 100%
Diabetes mellitus (sí-no)	25,1% - 74,9%	29,7% - 70,3%	5,5% - 94,5%
ECV (sí-no)	46,4% - 53,6%	64,5% - 35,5%	0 - 100%
HTA (sí-no)	90,5% - 9,5%	88,4% - 11,6%	18,2% - 81,8%
Dislipemia	58,7% - 40,8%	60,3% - 39,7%	12,7% - 87,3%

ECV, enfermedad cardiovascular; HTA, hipertensión arterial; IMC, índice de masa corporal; los valores se presentan como media ± EE. ND, datos no disponibles. Las comparaciones entre los grupos se han llevado a cabo mediante la prueba t- Student y chi-cuadrado.

En los dos grupos, de acuerdo con la incidencia de la patología, predomina la presencia de hombres: 59,8% en el grupo IRC/NT, 62% en el grupo HD y 55,9% en el grupo control, siendo significativamente más alta la presencia de hombres en el grupo IRC/NT y el grupo HD ($P = 0,008$).

El índice de masa corporal (IMC = peso (kg)/talla (m²)) también difiere en los grupos estudiados, siendo más alto en el grupo control, disminuyendo en los pacientes con IRC/NT ($P = 0,914$), alcanzando los niveles más bajos en el grupo HD ($P = 0,037$).

Comparando el IMC entre los pacientes IRC/NT con los pacientes HD se observan diferencias significativas, probablemente debidas a la malnutrición que tiene lugar durante el tratamiento de HD ($P = 0,001$).

La distribución de los pacientes según su estadio de insuficiencia renal (representado por el filtrado glomerular), indica que el 33,2% de las personas de la población estudiada pertenecen al grupo sometido a tratamiento sustitutivo, con un promedio de tiempo en tratamiento de diálisis de $37,31 \pm 4,09$ meses, con un rango muy amplio que va de 1 a 259 meses. Sólo 4 pacientes llevaban más de 6 años en HD, probablemente debido a la elevada mortalidad que se da en este grupo, que en este caso alcanza el 31,9%. La mayoría de los pacientes habían estado sometidos a HD por un periodo de entre 1 y 3 años.

En el grupo de IRC/NT 47,3% de los pacientes pertenecían al estadio 3, 41,3% al estadio 4 y 11,4% pertenecían al estadio 5, el último estadio de insuficiencia renal antes de empezar tratamiento. De la población control un 76,4% pertenecía al estadio 1 y 23,6% al estadio 2 (estos estadios son asintomáticos), posiblemente debido a la disminución fisiológica de la capacidad de filtrar que acontece con la edad.

Entre los pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis un 28,1% padecían algún tipo de cáncer. En este grupo predominaba el cáncer de próstata, seguido por el cáncer renal, el de vejiga, el de mama, el de pulmón, el de piel y linfomas. En la población IRC/NT un 24,6% de los pacientes padecían cáncer, principalmente vesical. En la tabla también se indican las patologías más frecuentes que afectan a las personas estudiadas. Algunas de estas patologías están presentes también en el grupo control, pero con una frecuencia mucho más baja comparada con la población con insuficiencia renal.

Un 64,5% de los pacientes HD se encuentra afectado por distintas patologías cardiovasculares, igual que un 46,4% de los pacientes en pre-diálisis. Asimismo, la hipertensión arterial afecta al 88,4% de pacientes en diálisis y al 90,5% de los pacientes en pre-diálisis, mientras que la diabetes mellitus se encuentra presente en un 29,7% de los pacientes en diálisis y en un 25,1% de los pacientes en pre-diálisis.

Finalmente, en el grupo control un 18,2% tiene hipertensión arterial, un 5,5% tiene diabetes mellitus, un 12,7% presenta dislipemia mientras que ninguno sufre patologías cardiovasculares o cáncer.

4.2. Etiología de la insuficiencia renal en los pacientes seleccionados.

A partir de las historias clínicas se ha analizado las causas subyacentes a la IRC en los pacientes incluidos en nuestro estudio. Las causas más frecuentes de la IRC en la población estudiada se indican en la Tabla 4.

Como se observa en la tabla, para los individuos IRC/NT la causa más frecuente de la patología es la nefroangiosclerosis (24,5%); término que describe las alteraciones vasculares que se producen en el parénquima renal, como consecuencia de la hipertensión arterial o del envejecimiento progresivo del árbol vascular. Se caracteriza por hipertrofia de la pared vascular, arteriosclerosis hialina (engrosamiento hialino de la pared de la arteriola) y cambios isquémicos en los glomérulos. Estas alteraciones en el parénquima renal, producen insuficiencia renal crónica (IRC) que con el tiempo progresará hacia una IRC terminal.

Otra causa ligada a la incidencia de la patología es la nefritis intersticial (19,6%), que se caracteriza por alteraciones inflamatorias que afectan sobre todo al intersticio y a los túbulos renales. En algunos casos las complicaciones de esta enfermedad pueden llevar a la insuficiencia renal.

En el grupo de pacientes sometidos a hemodiálisis las principales causas de la patología vienen dadas por trastornos en las funciones glomerulares (23,9%) y también a la diabetes mellitus (14,9%) y a la nefroangiosclerosis (14%). Otras patologías que suelen causar la insuficiencia renal en esta población son la poliquistosis renal y la pielonefritis.

Tabla 4. Causas más frecuentes de IRC en la población estudiada.

Causas de IRC		
	IRC/NT	HD
Pielonefritis	ND	1,7%
Poliquistosis renal	7,6%	5,8%
Nefroangioesclerosis	24,5%	14%
Diabetes mellitus	15,8%	14,9%
Nefropatía intersticial crónica	19,6%	2,5%
Glomerulonefritis	7,6%	23,9%
Vasculorenal	2,7%	6,6%
Desconocidas	17,4%	23,2%

ND, datos no disponibles.

4.3. Parámetros clínico-analíticos de los pacientes estudiados.

La determinación de diversos parámetros clínico-analíticos en la sangre y orina de los pacientes es muy importante ya que nos permite la prevención, la clasificación y la elección del tratamiento adecuado. En las primeras fases de pérdida de función renal aún no se manifiesta ninguna sintomatología (etapa "silenciosa"), pero con el desarrollo de la enfermedad empiezan a aumentar los valores de nitrógeno uréico y de creatinina sérica y, con la progresión aparecen manifestaciones clínicas y bioquímicas como anemia progresiva, edemas, hipertrofia cardíaca, alteraciones cardiovasculares, retención azoada y osteodistrofia renal, hasta alcanzarse el estadio de uremia clásica. Por eso a los pacientes se les realizan pruebas químico-analíticas detalladas que incluyen la medición de la PCR (proteína C reactiva), la β 2M (β microglobulina-proteína eliminada vía renal), la albúmina, la homocisteína, la urea (el principal producto terminal del metabolismo de las proteínas), los LDL (lípidos de baja densidad), los HDL (lípidos de alta densidad), la hemoglobina, la PAS (presión arterial sistólica), la PAD (presión arterial diastólica) y el Kt/V (eficacia de la diálisis), entre otras.

En la Tabla 5 se indican los valores que presentan los pacientes con IRC para distintos parámetros bioquímicos y a continuación se hace una breve descripción del significado de algunos de estos parámetros.

Una característica fundamental en el desarrollo de la enfermedad renal es la aparición de retención de productos terminales del metabolismo nitrogenado, como la creatinina y la urea. El seguimiento de los valores de estos productos ayuda mucho en la estimación del grado de disfunción renal.

La insuficiencia renal puede causar hipertensión arterial y, asimismo, ésta podría ser una causa directa de la enfermedad renal (cerca de 25% de los casos cada año), por eso la PAS y la PAD se convierten en parámetros importantes para vigilar la evolución de la patología. Su buen control puede retrasar la progresión de la insuficiencia renal y el comienzo del tratamiento en hemodiálisis. Es por esto que un alto porcentaje de pacientes con IRC se encuentran en tratamiento con fármacos que regulan la presión arterial (79,1% de los pacientes con IRC/NT y 41,3% de la población en tratamiento de diálisis). La mayoría de los pacientes se tratan con IECA (inhibidores de la conversión de la angiotensina) o ARA 2 (antagonistas del receptor tipo1 de la angiotensina 2), que son una serie de fármacos que regulan el sistema renina-angiotensina-aldosterona y que han mostrado ser eficaces en frenar la progresión de la IRC.

La anemia es otro factor que acompaña a la insuficiencia renal y su grado aumenta con la progresión del estado urémico. Aunque la anemia sea multifactorial, en el caso de los pacientes con IRC se debe sobre todo a la baja capacidad de los riñones de producir eritropoyetina. Por eso el 95,9% de los pacientes en diálisis y el 17,4% de los pacientes IRC/NT reciben tratamiento con eritropoyetina.

Los principales depósitos de hierro se hallan en forma de ferritina. La ferritina es una molécula proteica hidrosoluble (apoferritina) unida al hierro. Una ferritina sérica menor a 12 ng/mL confirma la existencia de ferropenia.

Tabla 5. Distintos valores analíticos observados en pacientes con IRC/NT y HD, respecto a los valores considerados normales.

Parámetros	Valores normales	IRC/NT	HD
Urea	3,2 - 7,5 mmol/L	15,47 ± 0,52	ND
Creatinina	65 - 110 µmol/L	203,65 ± 6,38	559,33 ± 51,61
Ácido fólico	600 - 2350 nmol/L	1,95 ± 0,016	1,60 ± 0,045
Glucosa	4,2 - 6 mmol/L	6,16 ± 0,12	5,25 ± 0,20
Colesterol	3,2 - 5,2 mmol/L	4,73 ± 0,074	3,98 ± 0,08
Triglicéridos	0,30 - 1,80 mmol/L	1,48 ± 0,047	1,52 ± 0,07
Hemoglobina	Mujeres 120 - 160 (g/L) Hombres 140 - 180 (g/L)	133,19 ± 1,32	121,67 ± 1,35
HbA1C-hemoglobina glicosilada	< 6,5%	4,79 ± 0,14	4,06 ± 0,17
PTH	7 - 53 ng/L	138,63 ± 8,81	217,05 ± 19,20
Albúmina	37 - 47 g/L	42,53 ± 0,29	39,17 ± 0,37
PCR	<10 mg/L	7,42 ± 1,37	13,29 ± 2,30
PAS	<140 mmHg	133,65 ± 1,50	138,23 ± 1,88
PAD	< 90 mmHg	75,15 ± 0,90	78,15 ± 1,20
Fe sérico	9,0 - 27 µmol/L	13,16 ± 0,70	11,47 ± 0,46
Ferritina	30 - 300 µg/L	153,83 ± 13,68	319,86 ± 26,30
B12	175 - 750 pmol/L	361,50 ± 15,88	415,93 ± 21,58
Ácido úrico	210 - 420 µmol/L	400,19 ± 7,43	366,76 ± 14,01
CTFH (capacidad total de fijación del hierro)	47 - 79 µmol/L	50,69 ± 1,34	38,10 ± 0,78
IST - Índice de saturación de la transferrina	12 - 44 %	0,27 ± 0,019	0,31 ± 0,01
Fibrinógeno	2 - 4 g/L	4,60 ± 0,12	4,36 ± 0,31
Kt/V	≥ 1,3	-	1,51 ± 0,02

La proteína C reactiva se produce en el hígado en presencia de una infección o inflamación aguda. Es un marcador de inflamación que generalmente se encuentra muy elevado en los pacientes con insuficiencia renal crónica (probablemente bajo la influencia de infecciones ocultas, del estrés oxidativo, la uremia, exposiciones a membranas bioincompatibles, etc.). Los valores que se consideran como normales son los menores de 10 mg/L.

El ácido úrico es un compuesto formado como consecuencia del metabolismo de las purinas, se encuentra en la sangre y se excreta a través de los riñones. Las concentraciones séricas de ácido úrico aumentan por dos posibles mecanismos: aumento de la síntesis o disminución de la excreción renal (90%), que es el mecanismo más común.

Las estadísticas a nivel mundial muestran que unas 500.000 personas afectadas por la diabetes mellitus presentan también complicaciones renales. Además, la diabetes se considera la primera causa de insuficiencia renal: el 43,8% (USRDS, 2007) de las personas en tratamiento con diálisis, son diabéticos. La hemoglobina glicosilada sirve para evaluar el control metabólico en los pacientes con diabetes ya que representa el nivel de glucemia en los últimos 2-3 meses antes de la prueba. Se considera un buen control metabólico una HBA1c < al 7%.

La alteración de los lípidos es una complicación común en los pacientes con IRC. Por eso, para el control de la dislipemia es recomendable intentar mantener el nivel de colesterol más bajo de 175 mg/dL, las LDL menor de 100 mg/dL, y las HDL superior a 40 mg/dL. Esto se consigue mediante una dieta equilibrada o mediante el suministro de estatinas, lo que se observa en el 65,1% de los pacientes con IRC/NT y en el 58,7% de los pacientes en hemodiálisis.

Los pacientes en tratamiento sustitutivo por hemodiálisis deben tomar aporte extra de vitaminas, sobre todo de las hidrosolubles, ya que éstas se pierden parcialmente durante el tratamiento de diálisis. El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble del complejo B, con propiedades antioxidantes y que se utiliza para disminuir los niveles de homocisteína.

Una cuestión de gran interés es el control de la eficacia del tratamiento de diálisis, ya que de éste depende el estado nutricional de los pacientes, su peso corporal, y también el grado de morbilidad y mortalidad de las personas afectadas. El parámetro

que se utiliza para calcular la eficacia de la diálisis es el Kt/V que se calcula a partir de los niveles de urea pre- y post-diálisis (K es el aclaramiento de la urea, T es la duración en minutos de la sesión de diálisis y V es el volumen de distribución de la urea). En la práctica se intentan obtener valores iguales o superiores a 1,3, que son los que han llegado a mostrar menor morbimortalidad.

Por último en la tabla se incluye también el hábito tabáquico. El tabaco siendo un factor de riesgo cardiovascular, también influye en la progresión de la insuficiencia renal crónica, aumentando la presión arterial y, mediante la activación simpática, acelera el desarrollo de la enfermedad.

4.4. Daño genético en pacientes con insuficiencia renal crónica medido mediante el ensayo del cometa.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo el protocolo estándar, de la versión alcalina del ensayo del cometa, para determinar los valores de daño en el DNA en los pacientes con IRC y en el grupo control. Los resultados de las comparaciones entre el daño basal de toda la población de pacientes con insuficiencia renal crónica (tratados y no tratados con HD) y el grupo control se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de los niveles de daño basal entre el grupo control y los pacientes.

	n	Daño basal	P
Grupo control	59	15,78 ± 0,72	<0,001
IRC	305	24,63 ± 0,72	

IRC = (pacientes IRC/NT + pacientes HD); los valores se presentan como media ± EE; t-Student para muestras independientes.

Se ha observado que los valores de daño en el DNA en los pacientes son mucho más altos que los observados en la población control, siendo esta diferencia altamente significativa. En la Figura 22 se pueden ver las diferencias observadas en el daño basal entre el grupo control y los pacientes con IRC.

En la Tabla 7 se indican los valores de daño basal por separado para los pacientes con IRC que aún no están sometidos a tratamiento de hemodiálisis y los pacientes HD.

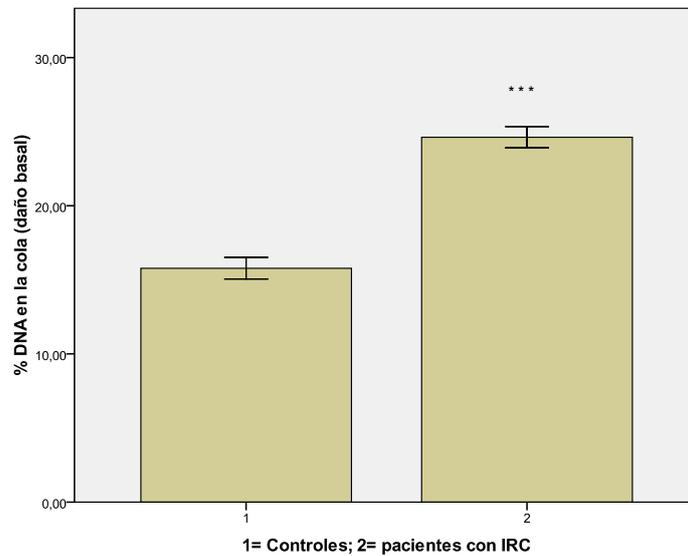


Figura 22. Daño basal en el DNA en el grupo control y en los pacientes con IRC. Diferencias significativas *** $P < 0,001$. t- Student para muestras independientes.

Tabla 7. Niveles de daño basal en los grupos estudiados.

	Controles (n=59)	Pacientes con IRC			<i>P</i>
		IRC (total) (n=305)	IRC/NT (n=184)	HD (n=121)	
Daño basal	15,67 ± 0,69	24,63 ± 0,72	22,22 ± 0,83	28,30 ± 1,23	< 0,001

P, comparación entre daño basal en IRC/NT y daño basal en HD; *P* significativo < 0,05; los valores se presentan como media ± EE. t- Student para muestras independientes.

Se ve que los niveles de daño basal son más altos en el grupo HD que en los IRC/NT y esta diferencia es altamente significativa ($P < 0,001$).

4.4.1. Relación entre los distintos estadios de la IRC sobre los niveles de daño genético.

El filtrado glomerular, siendo un parámetro que indica el grado de funcionamiento de los riñones, varía entre una media de $85,86 \pm 1,22$ en la población control y $30,83 \pm$

1,28 en los pacientes con insuficiencia renal que no se encuentran en tratamiento de HD.

En la Figura 23 se muestra la correlación negativa existente entre el FG y los niveles de daño basal en la población compuesta por los controles y los pacientes IRC/NT. Así, los individuos con FG alto, es decir con mejor funcionamiento renal, tienen niveles de daño basal significativamente más bajos ($P < 0,001$).

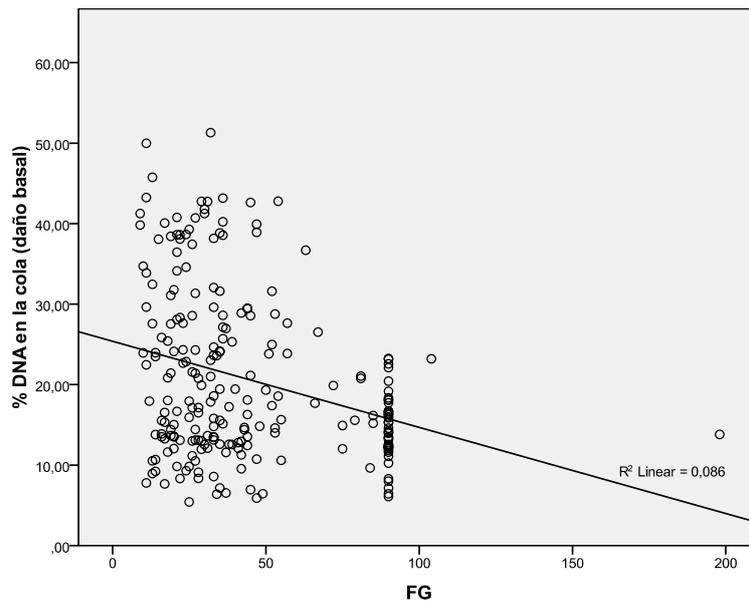


Figura 23. Distribución del daño basal según el filtrado glomerular.

También la creatinina en la sangre es un indicador del funcionamiento de los riñones. Para la población estudiada, en la Figura 24 se presenta la relación de los niveles de creatinina en los grupos control e IRC/NT con respecto al daño basal. En nuestro estudio la creatinina aumenta con el desarrollo de la enfermedad renal, afectando los niveles de daño basal; así, los pacientes con niveles altos de creatinina presentan más daño genético, en comparación con los que mostraban valores bajos ($P < 0,001$).

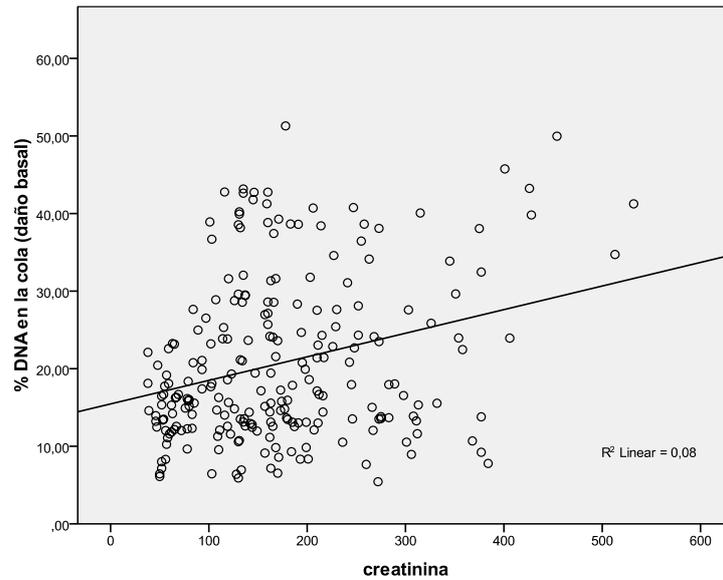


Figura 24. Relación entre los niveles de creatinina y el daño basal.

Además de clasificar a los pacientes en grandes grupos, también se les ha clasificado de acuerdo con su estadio de IRC. Así, en la Tabla 8 se indican los valores de daño en el DNA que corresponden a los diferentes estadios de la insuficiencia renal crónica.

Comparando el daño entre los diferentes estadios de IRC se nota un aumento con el progreso de la enfermedad renal, siendo el nivel de daño en el DNA más alto antes de que los pacientes empiecen el tratamiento de hemodiálisis. Por esta razón tiene interés observar los valores que se presentan durante el tratamiento de hemodiálisis y su posible relación con el tiempo y el tipo de tratamiento.

En la Figura 25 se pueden observar los niveles de daño que corresponden a cada estadio de IRC. Dado que en el grupo control se encuentran los individuos en estadios 1 y 2 (la fase asintomática de la IRC), en la figura se presentan agrupados.

Los valores de los controles son significativamente más bajos que los de los estadios 3 ($P < 0,001$), 4 ($P < 0,001$), 5 ($P = 0,002$) y que en los pacientes en tratamiento de hemodiálisis ($P < 0,001$). Sin embargo, no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los estadios 3, 4, 5 y 6.

Tabla 8. Daño basal según el estadio de IRC.

	Controles (n=59)		Pacientes con IRC			
			IRC/NT (n=184)			HD (n=121)
Estadios (FG)	1 (n=44)	2 (n=15)	3 (n=87)	4 (n=76)	5 (n=21)	6 (n=121)
Daño basal	14,74 ± 0,67	18,40 ± 1,70	21,72 ± 1,19	21,65 ± 1,22	26,24 ± 2,89	28,30 ± 1,23

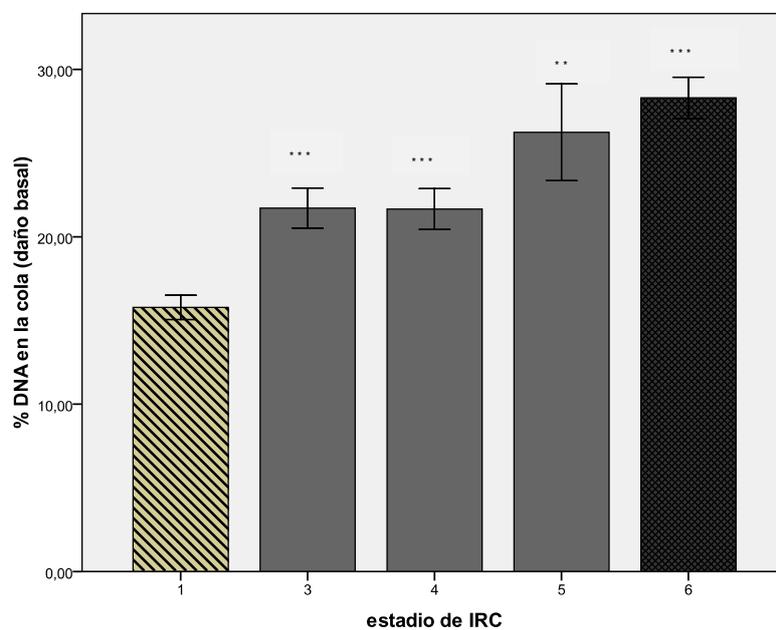


Figura 25. Efecto del estadio de IRC sobre el nivel de daño basal. Diferencias significativas respecto al valor del grupo control: $**P < 0,01$, $***P < 0,001$. t- Student de muestras independientes.

4.4.2. Factores bioquímicos relacionados con los niveles de daño genómico en los pacientes con insuficiencia renal crónica.

El estadio de insuficiencia renal crónica antes de empezar el tratamiento de hemodiálisis es una etapa importante en el desarrollo de la enfermedad renal, puesto que el manejo adecuado de este estadio tiene gran importancia para la evolución

posterior de los pacientes. A continuación se presta atención a algunos factores que tienen influencia sobre los niveles de daño en el DNA de esta población.

La creatinina, siendo un producto de la degradación de la creatina (un ácido orgánico nitrogenado derivado de los aminoácidos), presenta generalmente niveles más bajos en mujeres que en hombres, debido a las diferencias en la masa muscular. En los pacientes del grupo de IRC/NT las diferencias para este parámetro entre hombres y mujeres son significativas ($P = 0,011$). Asimismo, se ha encontrado una relación positiva entre los niveles de creatinina y el daño genético medido en los pacientes IRC/NT del estadio 5 ($P = 0,006$) (Figura 26).

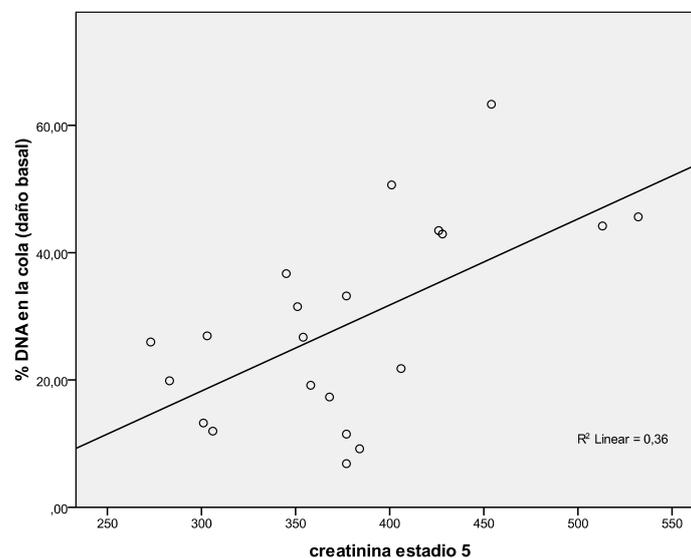


Figura 26. Correlación entre los niveles de creatinina y el daño medido en el estadio 5 de IRC.

La albúmina es una proteína que abunda en la sangre y cuando se encuentra en la orina indica daño renal. Además la proteinuria es un marcador de progresión de insuficiencia renal y de daño cardiovascular. En el grupo de pacientes IRC/NT (estadios 3, 4 y 5) se encontró una correlación negativa entre el daño basal y los niveles de albúmina en sangre ($P = 0,035$), es decir cuánto más altos eran los niveles de albúmina en sangre, menores eran los niveles de daño genético detectado (Figura 27).

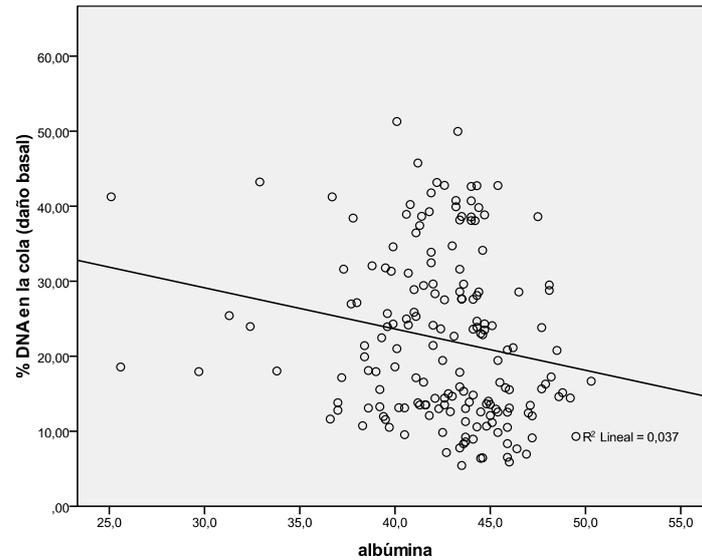


Figura 27. Relación entre la albúmina en sangre y el daño basal en los pacientes IRC/NT.

La vitamina B₁₂ (cobalamina) es una vitamina hidrosoluble, antianémica que está implicada en el metabolismo celular, que participa en la síntesis y en la regulación del DNA junto con la vitamina B₉ (ácido fólico). A la población de pacientes IRC/NT se les ha suplementado con diferentes dosis de esta vitamina. El análisis de regresión indica que los pacientes que han recibido dosis más altas tienen niveles de daño significativamente más bajos respecto a los suplementados con dosis menores ($P = 0,005$). En la Figura 28 se visualiza esta tendencia.

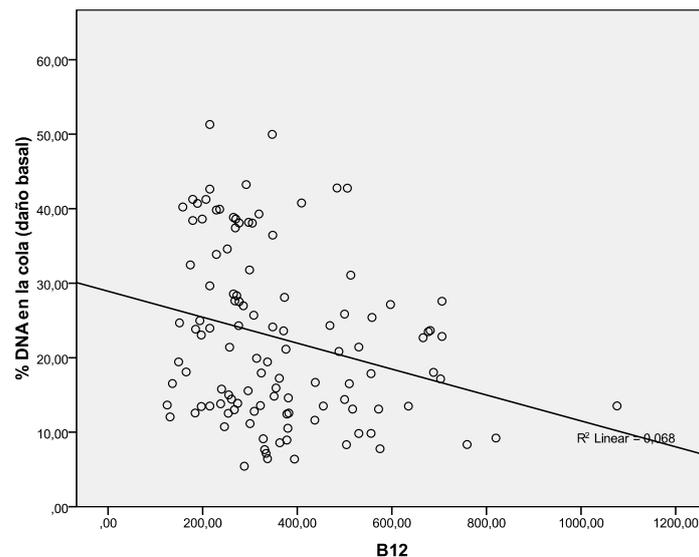


Figura 28. Correlación entre los niveles de vitamina B₁₂ y el daño en pacientes IRC/NT.

4.4.3 Factores que afectan la mortalidad en los pacientes con IRC sometidos a tratamiento de HD.

Los pacientes con IRC en tratamiento de HD se consideran un grupo de alto riesgo, debido al incremento progresivo de la edad de los pacientes que inician tratamiento y a la alta incidencia de diferentes patologías entre ellos. En los últimos 4 años, dentro del grupo de pacientes en tratamiento de diálisis convencional, se ha observado un alto nivel de mortalidad, llegando a un 31,9%. El análisis de las causas de mortalidad de nuestra población indica que la enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad, seguida del cáncer y de las enfermedades infecciosas. La distribución de las principales causas de muerte en estos pacientes se puede observar en la Tabla 9.

Dentro del grupo inicial de HD 81 pacientes seguían vivos al final del estudio, siendo el promedio de edad de $60,05 \pm 1,67$ contra 38 pacientes que habían fallecido en los últimos 3 años cuyo promedio de la edad era de $68,89 \pm 1,99$ ($P = 0,002$). Los pacientes vivos tenían una media de $33,38 \pm 5,16$ meses en tratamiento de HD mientras la media de los pacientes fallecido era de $46,61 \pm 6,84$ meses ($P = 0,138$).

En la Tabla 10 se indican los valores de daño genético basal obtenidos para los pacientes vivos y fallecidos dentro del grupo en tratamiento de hemodiálisis.

Tabla 9. Causas de muerte más frecuentes entre los pacientes en HD.

Causas de muerte	%
Enfermedad cardiovascular	55,3
Cáncer	15,8
Enfermedades infecciosas	15,8
Otras	13,1

Tabla 10. Niveles de daño basal entre los pacientes HD vivos y fallecidos.

Evolución de los pacientes HD y el daño que presentan			
	Vivos (n=81)	Exitus letalis (n=38)	<i>P</i>
% DNA en la cola/daño basal	26,25 ± 1,57	32,36 ± 1,77	0,011

Los resultados se presentan como media ± EE; las comparaciones se han llevado a cabo con la prueba t- Student de muestras independientes.

De la comparación de los niveles basales del daño en el DNA entre los dos grupos se observa que en el grupo de los pacientes fallecidos los valores son significativamente más altos ($P = 0,011$). Este resultado se considera importante, dado que no se han encontrado estudios similares en la literatura y, por esto, se consideró interesante realizar un estudio detallado para comprobar cuales son los posibles parámetros a los que se podría atribuir la alta mortalidad observada en esta población.

Primero se comprobó si la edad y el género tenían influencia. Para eso se llevó a cabo un análisis univariante multifactorial y los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Relación entre la edad y el género con la mortalidad.

Modelo lineal general univariante		
Factor	F	<i>P</i>
Edad	9,278	0,003
Género	1,294	0,258
R²= 0,089; R² ajustado= 0,073		

Los resultados indican que el género no está relacionado con la mortalidad de estos pacientes ($P = 0,258$), pero la edad sí que mostró ser un factor que tiene una influencia significativa, indicando que los pacientes fallecidos son los mayores del grupo.

También se encontró efecto positivo de los niveles de PCR sobre la mortalidad, tal y como se indica en la Tabla 12.

Tabla 12. Relación de los niveles de PCR con la mortalidad.

Modelo lineal general univariante		
Factor	F	P
PCR	8,293	0,005
R²= 0,066; R²ajustado= 0,058		

PCR, proteína C reactiva.

La proteína C reactiva es una proteína plasmática que aumenta en respuesta a los procesos de inflamación y su efecto sobre la mortalidad en este grupo es significativo. Los valores de PCR en las personas que siguen vivas son de $8,97 \pm 1,77$, mientras en los pacientes fallecidos llega a ser de $22,95 \pm 6,05$ (media \pm EE). En la Tabla 13 se observa la relación existente entre el tratamiento de HD y la mortalidad de los pacientes.

Tabla 13. Relación entre el tiempo en tratamiento de HD y la mortalidad.

Modelo lineal general univariante		
Factor	F	P
Tiempo en HD	1,860	0,009
R²= 0,606; R²ajustado= 0,280		

Como se observa, el tiempo en tratamiento en hemodiálisis también está relacionado con la mortalidad en este grupo. Así, los pacientes que han fallecido llevaban más tiempo en tratamiento sustitutivo que los paciente vivos ($P = 0,009$). En la Figura 29 se visualiza esta relación y se indican los valores (media \pm EE) del tiempo en tratamiento sustitutivo.

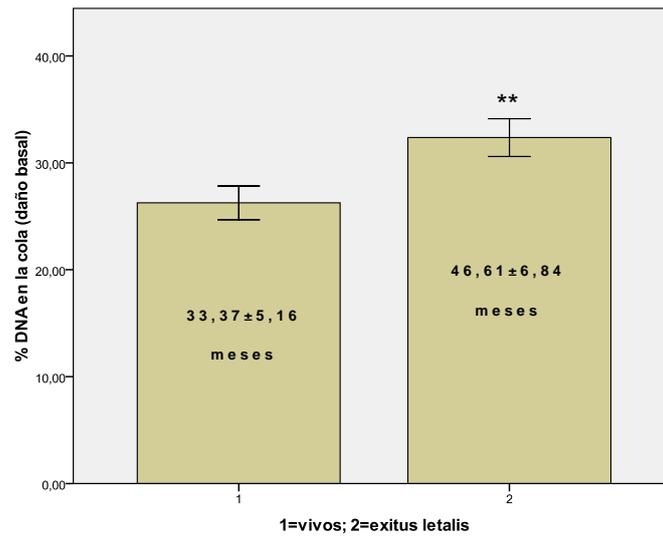


Figura 29. Relación entre la mortalidad y el tiempo en tratamiento de HD. Diferencias significativas: ** $P < 0,01$.

4.4.4. Efecto del tiempo y tipo de tratamiento de hemodiálisis.

Los pacientes en tratamiento de hemodiálisis muestran una variación muy amplia en el tiempo que llevan sometidos a tratamiento sustitutivo, que oscila entre 1 y 259 meses. La mayoría de los pacientes de nuestro estudio llevaban en tratamiento de HD un periodo de entre 1 y 40 meses y solamente 9 personas se mantenían en tratamiento con HD por un periodo superior a los 100 meses. Dado este amplio rango se optó por analizar los valores del daño basal dividiendo la población en subgrupos, separando los que llevaban menos de un año y poniendo un punto de corte cada 20 meses. De esta manera se equilibraba el número de personas en cada subgrupo. Así, se formaron grupos que correspondían a los pacientes tratados por menos de 1 año, entre 12-20 meses, entre 20-40 meses, entre 40-60 meses, entre 60-80 meses y por más de 80 meses.

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los pacientes que habían sido tratados con HD por menos de un año, en comparación con el grupo 2 (pacientes tratados hasta 2 años). También se ha observado que los valores de daño en el DNA de los pacientes del grupo 3 (en tratamiento por un periodo de entre 40-60 meses) son significativamente más altos en comparación con los pacientes tratados por menos de 12 meses ($P = 0,013$).

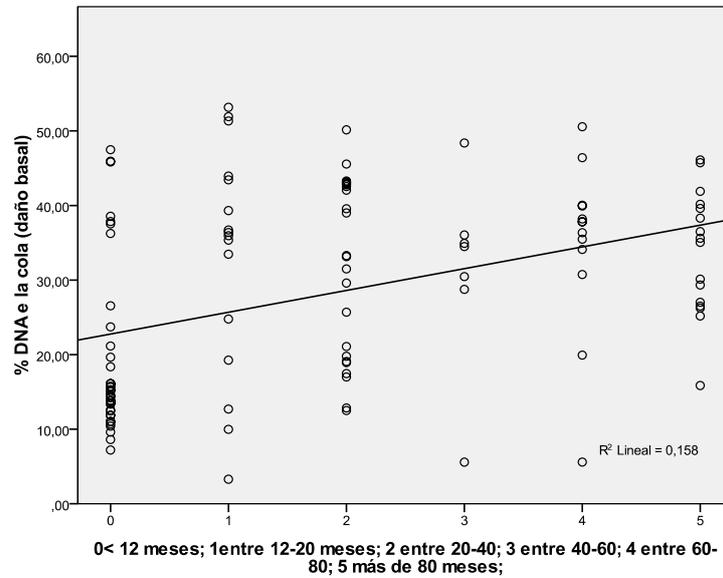


Figura 30. Relación daño genético - tiempo en tratamiento en hemodiálisis (1: 259 meses).

Los resultados observados indican que los niveles de daño basal en el DNA para los pacientes tratados con HD por un periodo menor a 12 meses son significativamente más bajos en comparación con los pacientes tratados por un periodo mayor al mencionado ($P < 0,001$) (Figura 30). Después del primer año en tratamiento se observa aumento del daño en el DNA y los valores se mantienen altos en los grupos tratados por periodos más largos.

Para determinar el efecto del tiempo en diálisis, se procedió a hacer un estudio específico de seguimiento a lo largo del tiempo de un grupo de 67 pacientes. A 49 de estos pacientes en tratamiento de hemodiálisis convencional se les realizó una segunda evaluación del daño genómico al cabo de $18,31 \pm 7,07$ meses; mientras que a los otros 18 pacientes, que cambiaron de tratamiento convencional a hemodiafiltración on-line, se les evaluó de nuevo al cabo de un período superior a 12 meses después del cambio de tratamiento.

Entre la población estudiada dominaba la presencia de hombres 52,2% en el grupo de HD convencional y 66,7% en el grupo de pacientes que cambiaron de tratamiento. Gran parte de las personas presentaban patologías típicas de estos pacientes; así, el 24,2% presentaban patología cancerosa, el 60,6% presentaban enfermedad cardiovascular, mientras que 89,7% presentaban hipertensión arterial. Algunas

características de los pacientes cuya evaluación de daño en el DNA ha sido seguida se indican en la Tabla 14.

En la Tabla 15 se presenta el daño medido en las primeras muestras y en las evaluaciones repetidas. Las comparaciones entre las primeras y las segundas muestras de los dos grupos se llevó a cabo mediante la prueba t-Student para muestras pareadas.

Así, claramente se pudo observar que en la segunda muestra, tanto de los pacientes que han cambiado de tratamiento como en la de los que han seguido en tratamiento convencional, se nota una disminución significativa del daño. Se debería considerar que el tiempo que los dos grupos llevan en tratamiento sustitutivo es relativamente poco, $40,65 \pm 8,02$ meses para los de tratamiento convencional y $33,39 \pm 8,73$ meses para los de hemodiafiltración on-line respectivamente, y también se tiene que considerar la diferencia en el número de pacientes incluidos en los dos grupos.

Tabla 14. Características de los pacientes.

Características de la población		Pacientes HD convencional (n=49)		Pacientes HD on-line (n=18)	
		1ª muestra	2ª muestra	1ª muestra (convencional)	2ª muestra (on-line)
Edad (años)		$64,20 \pm 2,17$	$68,50 \pm 2,20$	$56,17 \pm 2,97$	$60,94 \pm 3,57$
Género	H%	52,2%		66,7%	
	M%	47,8%		33,3%	
Tiempo en diálisis (meses)		$40,65 \pm 8,02$		$33,39 \pm 8,73$	

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de daño genómico comparando las segundas muestras de los dos grupos, lo que sugiere que en este estudio los dos tratamientos dan resultados muy parecidos respecto a la disminución del nivel de daño basal en el DNA.

En las Figuras 31 y 32 se presentan las diferencias entre las primeras y segundas muestras tanto de los pacientes que seguían en el mismo tratamiento como para los individuos que cambiaron de técnica.

Aunque a nivel de eficacia en la reducción del daño en el DNA los dos tipos de tratamientos llegan a niveles muy parecidos, comprobamos si existía algún cambio a nivel de eficacia del tratamiento de hemodiálisis. Para ello se compararon los Kt/V (fórmula que estima la eliminación de la urea de la sangre, midiendo sus valores antes y después de la diálisis). Así, para los pacientes tratados con hemodiálisis de alto flujo se observan diferencias significativas a nivel de eficacia de la diálisis ($P = 0,008$). Estas comparaciones se presentan en la Tabla 16.

Tabla 15. Daño genómico en primeras y segundas evaluaciones de pacientes con/sin cambio de tratamiento.

	Pacientes HD on-line (n=18)		P	Pacientes HD convencional (n=49)		P
	1ª muestra (convencional)	2ª muestra (on-line)		1ª muestra	2ª muestra	
	% DNA en la cola (daño basal)	30,17 ± 3,10		14,96 ± 1,23	0,001	

Los valores en la tabla se presentan como media ± EE; t-Student para muestras pareadas.

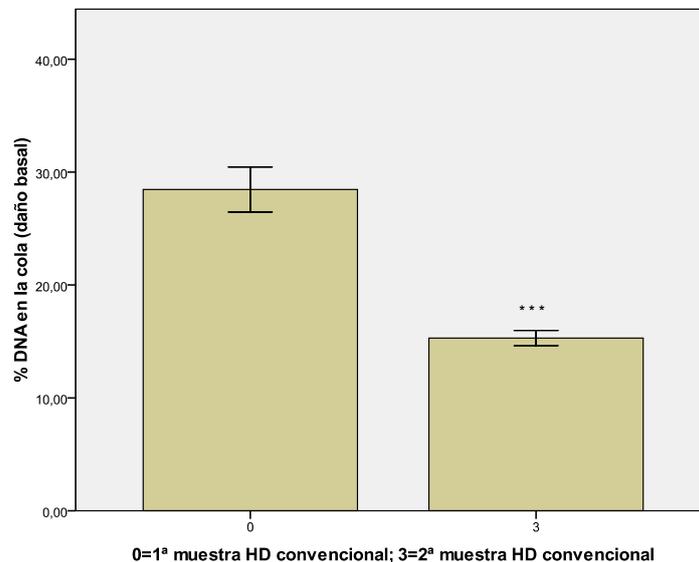


Figura 31. Comparación entre las 1ª y las 2ª muestras de los pacientes en hemodiálisis convencional. Diferencias significativas respecto al valor de la primera muestra: *** $P < 0,001$.

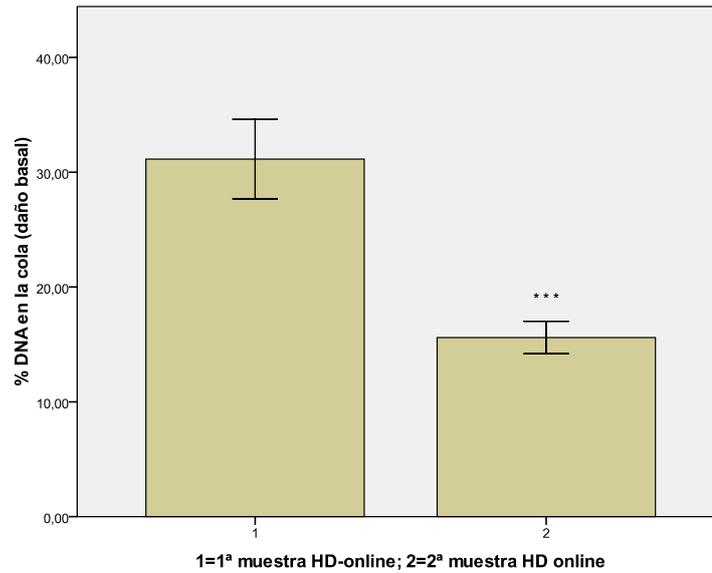


Figura 32. Comparación entre la 1ª muestra de los pacientes en hemodiálisis convencional y la 2ª muestra HD on-line. Diferencias significativas respecto al valor de la primera muestra: *** $P < 0,001$.

Tabla 16. Diferencias en la eficacia dialítica

	1ª HD	2ª on-line	<i>P</i>	1ª HD	2ª HD	<i>P</i>
Kt/V	1,43 ± 0,06	1,83 ± 0,10	0,008	1,54 ± 0,04	1,61 ± 0,03	0,054

Kt/V, eficacia dialítica;

4.4.5. Efectos de otros parámetros sobre los niveles de daño genético en los pacientes con IRC.

Para los pacientes con IRC, tanto en tratamiento de hemodiálisis como los que aún no han alcanzado el estado terminal, se comprobó si algún otro parámetro tenía efecto sobre los niveles de daño presentes en dichos pacientes.

En la población IRC/NT la presencia de patologías como el cáncer ($P = 0,864$), la enfermedad cardiovascular ($P = 0,481$), la diabetes mellitus ($P = 0,818$), la hipertensión arterial ($P = 0,236$) y la dislipemia ($P = 0,073$) parecen no tener efecto

significativo sobre los niveles de daño en el DNA medido en estos pacientes. Lo mismo sucede en el grupo de pacientes tratados con hemodiálisis, donde tampoco mostraban efecto significativo sobre los niveles de daño basal. Así, los efectos de las distintas patologías son como se indica: el cáncer ($P = 0,975$), la enfermedad cardiovascular ($P = 0,289$), la diabetes mellitus ($P = 0,170$), la dislipemia ($P = 0,673$) y la hipertensión arterial ($P = 0,603$).

Aunque el hábito de fumar, se considera un factor de riesgo para las patologías cardiovasculares y para los niveles de daño en el DNA en nuestro estudio, no se encuentra reflejado este efecto en el daño basal de los pacientes IRC/NT ($P = 0,717$) ni tampoco en los pacientes HD ($P = 0,971$).

Por lo que respecta al papel del trasplante en el grupo de pacientes en tratamiento de HD se encontraban personas con trasplante renal previo que no les había funcionado correctamente y que habían tenido que volver a dializarse. Al analizar el efecto del trasplante sobre el daño en el DNA se vió que entre los pacientes con y sin trasplante previo no se encontraron diferencias significativas en los niveles de daño basal ($P = 0,431$).

Otro factor estudiado ha sido la suplementación con L- carnitina. Así, en los pacientes en tratamiento de hemodiálisis los individuos suplementados con L-carnitina muestran más daño basal comparados con los que no reciben L-carnitina ($P < 0,001$).

La homocisteína es un aminoácido liberado como resultado de la digestión de las proteínas. Concentraciones altas en sangre se han asociado con complicaciones cardiovasculares, aterosclerosis, coagulación de la sangre, complicaciones en la diabetes etc. Dado que el control de los niveles de homocisteína normalmente se realiza con suplementación de ácido fólico (vitamina B9), en nuestro estudio observamos que en los pacientes sometidos a tratamiento de HD se detecta una correlación entre los niveles de homocisteína y la suplementación con ácido fólico. Así, los pacientes en cuya dieta se incluía la vitamina B9 mostraban niveles de homocisteína más bajos ($P = 0,010$) (Figura 33).

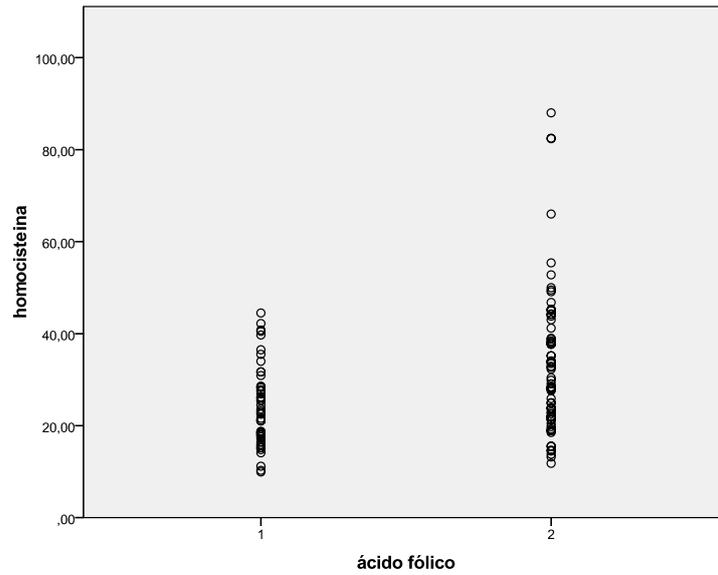


Figura 33. Relación entre los niveles de homocisteina y las suplementación con ácido fólico. 1 corresponde a pacientes + ácido fólico; 2 son los pacientes no suplementados.

Los efectos de distintas patologías sobre los niveles de daño en el DNA en los pacientes se presentan en la Tabla 17. Asimismo, en esta tabla se indican los efectos de algunos medicamentos y suplementos.

Tabla 17. Factores que afectan los niveles de daño basal en la población IRC/NT.

Patologías		n	IRC/NT	P	n	HD	P
ECV	sí	82	22,91 ± 1,22	0,481	75	29,30 ± 1,47	0,289
	no	94	21,73 ± 1,15		43	26,59 ± 2,17	
HTA	sí	159	22,58 ± 0,89	0,236	104	28,07 ± 1,29	0,603
	no	17	19,52 ± 2,05		14	30,04 ± 3,91	
Cáncer	sí	44	22,19 ± 1,68	0,864	34	28,24 ± 2,25	0,975
	no	132	22,53 ± 0,98		81	28,33 ± 1,47	
Diabetes mellitus	sí	44	22,56 ± 1,74	0,818	38	30,99 ± 2,14	0,170
	no	132	22,11 ± 0,94		80	27,28 ± 1,50	
Dislipemia	sí	104	23,40 ± 1,13	0,129	71	27,87 ± 1,56	0,673
	no	71	20,86 ± 1,19		42	28,94 ± 2,00	
Factores							
Tabaquismo	sí	91	22,42 ± 1,24	0,860	71	28,34 ± 1,57	0,971
	no	83	26,13 ± 1,18		47	28,25 ± 1,97	
Trasplante renal	sí	-	-	-	27	39,99 ± 2,71	0,431
	no	-	-		89	27,72 ± 1,37	
Medicamentos, suplementos y factores bioquímicos							
Renagel	sí	-	-	-	69	29,02 ± 1,62	0,492
	no	-	-		49	27,30 ± 1,88	
IECA	sí	133	22,79 ± 0,99	0,181	69	26,10 ± 1,93	0,135
	no	46	20,45 ± 1,43		49	29,83 ± 1,57	
Estatinas	sí	111	23,31 ± 1,09	0,093	68	27,52 ± 1,64	0,456
	no	68	20,44 ± 1,23		50	29,39 ± 1,84	
Vitamina D	sí	52	23,59 ± 1,67	0,364	53	29,15 ± 1,81	0,544
	no	116	21,89 ± 1,01		65	27,64 ± 1,67	

4.5. Daño oxidativo en los pacientes con insuficiencia renal crónica.

Un gran número de estudios afirma encontrar daño oxidativo en el desarrollo de varias patologías como la diabetes (tipo 1 y tipo 2), las patologías cardiovasculares, la incidencia de numerosos tipos de cáncer y el envejecimiento prematuro. La posibilidad de modificar el ensayo del cometa para poder medir daño oxidativo nos ha permitido evaluarlo en los pacientes con insuficiencia renal crónica, así como relacionarlo con algunas características de riesgo en esta población. Así, aplicando el uso de las enzimas específicas para la reparación (la endonucleasa III, que detecta a las pirimidinas oxidadas y la formamidopirimidina DNA glicosilasa, que detecta a las purinas oxidadas) hemos podido cuantificar el daño oxidativo.

En la Tabla 18 se presentan los valores de daño oxidativo obtenidos con las enzimas de reparación. Los resultados, calculados como la diferencia entre los valores obtenidos con estas enzimas y el daño basal, nos indica el daño oxidativo para cada grupo del estudio, respectivamente.

Tabla 18. Daño en las purinas y las pirimidinas para los grupos estudiados.

	Controles	IRC/NT	HD
Daño basal	17,72 ± 0,88	25,28 ± 0,92	28,38 ± 1,36
Daño en pirimidinas	20,45 ± 1,07	28,71 ± 0,98	33,98 ± 1,66
Daño en purinas	23,17 ± 1,02	33,45 ± 1,01	37,03 ± 1,84

Los valores se presentan como media ± EE;

4.5.1. Daño oxidativo en pirimidinas.

En la Tabla 19 se indican los valores de daño oxidativo en las pirimidinas para el grupo control y para los pacientes con insuficiencia renal crónica.

Tabla 19. Daño oxidativo en pirimidinas.

	Controles	IRC/NT	P	HD	P^a	P^b
DO en pirimidinas	4,66 ± 0,57	4,98 ± 0,35	0,919	7,86 ± 0,99	0,271	0,148

P^a, comparación entre el grupo control y los pacientes HD; *P^b*, comparación entre IRC/NT y HD; los valores se presentan como media ± EE; DO, daño oxidativo.

Como se ha observado en la tabla, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes con insuficiencia renal que aún no están en tratamiento de hemodiálisis ($P = 0,919$). Tampoco se encuentran diferencias entre los valores de los pacientes HD con la población control ($P = 0,271$). Así, los niveles de daño oxidativo en las pirimidinas de los pacientes con IRC/NT y los que se encuentran en tratamiento de HD no parecen ser diferentes ($P = 0,148$).

Aunque no llegan a ser estadísticamente significativos, los valores de daño oxidativo en las pirimidinas aumenta según el estadio de IRC, siendo mayor en la etapa de tratamiento con hemodiálisis. Los valores encontrados se presentan en la Tabla 20.

Los resultados indican que no hay diferencias significativas en los valores de daño oxidativo entre los estadios de IRC/NT; ni entre los estadios 3 y 4 ($P = 0,326$), ni entre los estadios 4 y 5 ($P = 0,647$) y entre los estadios 3 y 5 ($P = 0,902$). Los valores observados en los pacientes en tratamiento de HD tampoco eran significativamente diferentes comparados tanto con los individuos del grupo control ($P = 0,271$), como con el estadio 3 ($P = 0,378$), estadio 4 ($P = 0,110$) y estadio 5 ($P = 0,597$). Los valores de daño oxidativo en pirimidinas según el estadio de IRC, se visualizan en la Figura 34.

Tabla 20. Distribución del daño oxidativo en las pirimidinas.

	Controles (n=59)	Pacientes con IRC			
		IRC/NT (n=184)			HD (n=121)
Estadios según el FG	1 + 2 (n=59)	3 (n=87)	4 (n=76)	5 (n=21)	6 (n=121)
DO en pirimidinas	4,66 ± 0,57	5,36 ± 0,57	4,22 ± 0,37	6,09 ± 1,38	7,86 ± 0,99

DO, daño oxidativo; el estadio 6 corresponde a los pacientes que se encuentran en tratamiento de hemodiálisis; los valores se presentan como media ± EE.

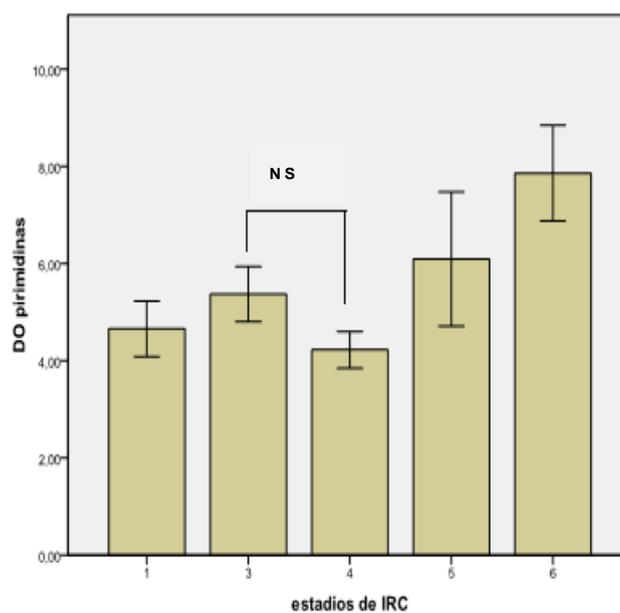


Figura 34. Distribución del daño oxidativo en pirimidinas según los estadios de IRC. La columna 6 corresponde a los pacientes que se encuentran en tratamiento de HD. NS, diferencia no significativa; prueba Mann-Whitney.

4.5.1.1. Factores moduladores del daño oxidativo en pacientes con IRC.

Los posibles efectos de la presencia de algunas enfermedades, suplementos y hábitos presentes en la población estudiada sobre el daño oxidativo en las pirimidinas para los pacientes con IRC/NT se indican en la Tabla 21. Como se observa, ninguna de las patologías presentes en este grupo afecta de manera significativa los niveles de daño oxidativo en pirimidinas.

Tabla 21. Factores que afectan los niveles de daño oxidativo en las pirimidinas en la población estudiada.

Patologías	Controles		P	IRC total	P
ECV	sí	-	-	6,67 ± 0,70	0,346
	no	-		5,47 ± 0,54	
HTA	sí	6,51 ± 1,54	0,172	5,91 ± 0,46	0,355
	no	3,42 ± 1,92		7,72 ± 1,73	
Cáncer	sí	-	-	6,54 ± 0,86	0,178
	no	-		5,95 ± 0,53	
DL	sí	6,96 ± 1,93	0,190	6,00 ± 0,59	0,360
	no	4,09 ± 0,51		6,23 ± 0,71	
DM	sí	14,79	0,200	4,96 ± 0,56	0,238
	no	4,82 ± 1,11		6,54 ± 0,58	

ECV, enfermedad cardiovascular; HTA, hipertensión arterial; DL, dislipemia; DM, diabetes mellitus;

Para los pacientes en tratamiento de hemodiálisis los niveles de daño oxidativo en las pirimidinas se encontraron relacionados con el tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina y antagonistas del receptor tipo 1 de la angiotensina 2 (IECA y ARA-2). Así, los pacientes tratados con IECA o ARA-2 mostraban valores de DO en las pirimidinas significativamente más bajos que los pacientes no tratados ($P = 0,026$). Los valores se presentan en la Tabla 22.

Para el mismo grupo de pacientes también se observó que la diabetes mellitus estaba relacionada con los niveles de DO en las pirimidinas. Así, los pacientes afectados por la enfermedad tenían una media de daño de $10,04 \pm 1,88$, mientras que los no afectados por la patología tenían una media de $6,88 \pm 1,15$. Estas diferencias llegaban al límite de la significación ($P = 0,051$), sugiriendo que en esta población hay una cierta relación entre la patología y los elevados niveles de daño oxidativo.

Tabla 22. Valores de daño oxidativo en las pirimidinas en pacientes HD sin/con tratamiento con IECA.

Mann-Whitney			
Tratamiento con IECA/ARA-2	sí	$5,29 \pm 1,00$	0,026
	no	$9,86 \pm 1,52$	

Los resultados se presentan como media \pm EE.

Otro de los factores estudiados ha sido el de la mortalidad en los pacientes en tratamiento de HD. Para comparar los valores de daño oxidativo en las pirimidinas entre las personas vivas y fallecidas en el grupo en tratamiento de HD se llevaron a cabo comparaciones mediante la prueba de Mann-Whitney. En la Tabla 23 se presentan los resultados.

Tabla 23. Valores de daño oxidativo en pirimidinas para pacientes en HD, vivos y fallecidos.

	DO en pirimidinas	<i>P</i>
Pacientes HD vivos	$6,11 \pm 0,97$	0,008
Pacientes HD fallecidos	$12,23 \pm 2,27$	

Los resultados se presentan como media \pm EE.

El análisis demuestra que el daño oxidativo en las pirimidinas en los pacientes fallecidos es aproximadamente dos veces más alto que en los pacientes vivos ($P = 0,008$). Se debe tener en

cuenta que los elevados niveles de daño oxidativo justifican una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, que en nuestro caso resultan ser la principal causa de muerte.

Ya que el tiempo en tratamiento de HD mostró ser un parámetro que modula los niveles basales de daño genético, en nuestro estudio hemos evaluado también su efecto sobre los niveles de daño oxidativo en pirimidinas. Para ello se ha separado en subgrupos la población en tratamiento de HD según el tiempo que llevaban en tratamiento sustitutivo, siguiendo el mismo criterio utilizado anteriormente. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 24.

Tabla 24. Daño oxidativo en pirimidinas según el tiempo en tratamiento de HD.

Tiempo en tratamiento	DO total
< 12 meses	8,39 ± 2,01
12-20 meses	7,86 ± 2,66
20-40 meses	4,97 ± 1,91
40-60 meses	9,19 ± 3,05
60-80 meses	6,49 ± 1,97
80 meses	11,48 ± 2,45

Se observa que el daño oxidativo en las pirimidinas de los pacientes sometidos a un periodo de tratamiento en HD entre 1,5 años y 3 años tienen los valores más bajos. En los pacientes dializados por un periodo de 3 a 5 años se produce un aumento significativo del daño oxidativo ($P = 0,016$), aumento que también se encuentra entre los pacientes tratados por más de 6 años, en comparación con los tratados por un periodo de hasta 3 años ($P = 0,004$).

Los posibles efectos del tipo de tratamiento de hemodiálisis sobre los niveles de daño oxidativo que presentan los pacientes con IRC fue otro de los factores estudiado en este trabajo. Para ello en el estudio longitudinal se analizaron tanto el efecto del tiempo en HD como el efecto de cambiar de sistema de HD.

En la Tabla 25 se presentan los valores del daño oxidativo en las pirimidinas para los pacientes en tratamiento de HD convencional y para los que han cambiado de HD convencional a HD on-line. La comparación se llevó a cabo mediante la prueba no paramétrica para muestras pareadas (Wilcoxon).

Los resultados indican que no hay diferencias entre los valores de daño oxidativo en las pirimidinas para los pacientes que siguen en tratamiento de HD estándar ($P = 0,315$), mientras que para los que han cambiado a ser tratados con la nueva técnica se observan valores mucho más bajos en la segunda evaluación, en comparación con los valores iniciales ($P = 0,028$).

Tabla 25. Daño oxidativo en las pirimidinas en los pacientes sin y con cambio de tratamiento.

Pacientes on-line (n=18)		<i>P</i>	Pacientes HD convencional (n=49)		<i>P</i>
1ª muestra (convencional)	2ª muestra on-line		1ª muestra	2ª muestra	
19,40 ± 6,44	5,21 ± 0,88	0,028	9,47 ± 1,83	5,31 ± 0,69	0,315

DO, daño oxidativo; los valores se presentan como media ± EE.

4.5.2. Daño oxidativo en las purinas.

La utilización de la enzima FPG nos permite cuantificar el daño oxidativo inducido en las purinas. En la Tabla 26 se indican los valores de daño oxidativo observado para el grupo control y para los pacientes con insuficiencia renal crónica. La distribución de los datos fue normal y el análisis se llevó a cabo mediante pruebas paramétricas.

Tabla 26. Daño oxidativo en purinas.

	Controles	IRC/NT	<i>P</i>	HD	<i>P</i> ^a	<i>P</i> ^b
DO purinas	6,57 ± 0,61	8,53 ± 0,41	0,020	11,04 ± 1,38	0,004	0,086

P^a, comparación entre el grupo control y los pacientes HD; *P*^b, comparación entre IRC/NT y HD; los valores se presentan como media ± EE; DO, daño oxidativo.

Como se observa, los niveles de daño oxidativo en purinas son significativamente más altos en los pacientes IRC/NT (*P* = 0,020) y en los pacientes en tratamiento de hemodiálisis (*P* = 0,004) respecto a los controles. Sin embargo las diferencias entre los pacientes con IRC en tratamiento de HD y los que no se encuentran en tratamiento sustitutivo no llegan a ser significativas (*P* = 0,086).

El primer parámetro analizado para ver su interacción con los niveles de daño oxidativo en purinas fue el estadio de la patología. Así, en la Tabla 27 se presentan los valores de daño en purinas que corresponden a los diferentes estadios de insuficiencia renal crónica.

Tabla 27. Distribución del daño oxidativo en purinas.

Controles n=59	Pacientes con IRC			
	IRC/NT n=184			HD n=121
1+2 (n=59)	3 (n=87)	4 (n=76)	5 (n=21)	6 (n=121)
6,57 ± 0,60	8,54 ± 0,61	8,14 ± 0,61	9,75 ± 1,35	11,04 ± 1,38

DO, daño oxidativo; el estadio 6 corresponde a los pacientes que se encuentran en tratamiento de hemodiálisis; los valores se presentan como media ± EE.

Comparando los niveles de daño en los diferentes estadios de IRC con los niveles de la población control, se observa que los valores del daño en las purinas son significativamente más altos en el estadio 3 (*P* = 0,024), en el estadio 5 (*P* = 0,016) y en el estadio 6 (*P* = 0,004)

que en el control. Las diferencias entre los estadios 3 y 4 no resultan ser significativas ($P = 0,646$). Estos resultados para los distintos estadios se visualizan en la Figura 35.

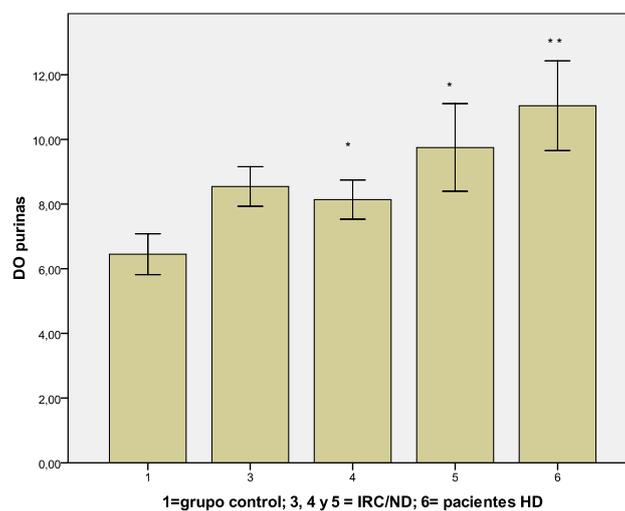


Figura 35. Distribución del daño en las purinas según el estadio de IRC. Diferencias significativas comparando los estadios de IRC con el grupo control: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

4.5.2.1. Relación entre el daño oxidativo en las purinas y distintos parámetros.

Dado que los valores de daño oxidativo en las pirimidinas para los pacientes fallecidos resultaban ser significativamente elevados, en comparación con los pacientes vivos, decidimos comprobar si esta tendencia también se mantenía para el daño oxidativo en las purinas.

Para los pacientes en tratamiento de HD se encontró que el daño oxidativo en las purinas tiene un efecto significativo sobre la mortalidad en este grupo de pacientes ($P = 0,002$). Las diferencias observadas entre los valores de DO en las purinas para los pacientes vivos y fallecidos se presentan en la Tabla 28.

Tabla 28. Relación entre el nivel de DO en purinas y la mortalidad de los pacientes HD.

	DO purinas	P
Vivos	8,68 ± 1,11	0,042
Exitus letalis	18,98 ± 4,64	

Los valores se presentan como media ± EE.

Como se observa en la tabla, el valor medio del DO en las purinas para los pacientes fallecidos es más de dos veces el valor que corresponde a los pacientes vivos, y este incremento es significativo ($P = 0,042$).

Otro factor a tener en cuenta respecto a su relación con el daño oxidativo en purinas, es el tiempo transcurrido de tratamiento en HD. Para ver ese efecto hemos separado en subgrupos la población en tratamiento de HD, según el tiempo que llevaban en tratamiento sustitutivo. Los resultados de daño oxidativo obtenidos para cada subgrupo se indican en la Tabla 29.

Tabla 29. Daño oxidativo en purinas según el tiempo en tratamiento de HD.

Tiempo en HD	DO purinas
< 12 meses	11,82 ± 2,66
12-20 meses	13,46 ± 6,34
20-40 meses	7,07 ± 1,45
40-60 meses	11,65 ± 4,05
60-80 meses	11,03 ± 2,73
80 meses	12,57 ± 3,09

Los valores se presentan como media ± EE.

A pesar del valor anormal observado para el periodo 20-40 meses, los niveles de DO en purinas se mantienen estables conforme aumenta el período que los pacientes llevan en tratamiento sustitutivo. Así, nuestro estudio indica que no se han encontrado diferencias significativas entre los valores que corresponden a cada subgrupo.

El cambio del tipo de tratamiento de HD puede ser un factor modulador de los niveles de daño oxidativo observados. Para determinar los efectos de este cambio de protocolo de tratamiento se ha analizado el papel que tiene el cambio de sistema de HD sobre los niveles de daño oxidativo en purinas. En la Tabla 30 se presentan los valores observados del daño oxidativo en las purinas para los pacientes cuya evaluación se ha repetido al cabo de aproximadamente un año, ya sea sin cambio de tratamiento o cambiando al tratamiento on-line.

Tabla 30. Daño oxidativo en purinas en los pacientes sin/con cambio de tratamiento.

Pacientes on-line (n=18)		P	Pacientes HD (n=49)		P
1ª muestra convencional	2ª muestra on-line		1ª muestra HD	2ª muestra HD	
9,15 ± 2,86	3,31 ± 0,46	0,038	5,63 ± 1,24	4,31 ± 0,56	0,339

Como se observa en la tabla los pacientes que seguían en tratamiento de HD convencional no mostraron cambios en los niveles de daño oxidativo en purinas en la segunda evaluación ($P = 0,339$). Sin embargo, los pacientes que habían cambiado de hemodiálisis estándar a hemodiálisis online mostraban una disminución significativa en el DO en purinas en su segunda evaluación ($P = 0,038$). Estos resultados demuestran que la HD online da mejores resultados con respecto a los niveles de DO, en comparación con la HD estándar.

4.5.3. Daño oxidativo total.

Una vez presentados los valores de daño oxidativo afectando a pirimidinas y purinas, independientemente, parece interesante repetir el análisis considerando todo el daño oxidativo presente en los pacientes (suma de ambos daños). Así, cuando se mira la distribución de los

niveles de DO total se ve que este parámetro sigue una distribución normal y, por tanto, los análisis se llevaron a cabo utilizando pruebas paramétricas.

En la Tabla 31 se indican los valores de daño oxidativo total (formados como suma de los valores de DO en las purinas y DO en las pirimidinas), tanto para el grupo control como para los pacientes con insuficiencia renal crónica en total y por separado para los IRC/NT y los pacientes en tratamiento de HD.

Tabla 31. Daño oxidativo total en el grupo control y los pacientes con IRC.

Controles	IRC total	<i>P</i>	IRC/NT	<i>P</i> ^a	HD	<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^c
12,06 ± 1,19	16,42 ± 1,05	0,086	14,13 ± 0,68	0,143	20,29 ± 2,55	0,004	0,022

P^a, comparación entre el grupo control y los pacientes IRC/NT; *P*^b - comparación entre el grupo control y los pacientes HD; *P*^c, comparación entre el grupo IRC/NT y HD; los valores se presentan como media ± EE.

Aunque las diferencias en los niveles de daño oxidativo total entre el grupo control y la población total con IRC no llegan a ser significativamente diferentes (*P* = 0,086) sin embargo los niveles del grupo HD resultan ser significativamente más altos, tanto comparados con el grupo control (*P* = 0,004), como respecto al grupo IRC/NT (*P* = 0,022). Los pacientes con IRC que aún no están sometidos al tratamiento de HD no muestran incrementos significativos de daño oxidativo con respecto al grupo control (*P* = 0,143). Este efecto del desarrollo de la patología se observa mejor en la Tabla 32 donde se indican los valores de DO total en los diferentes estadios de la IRC.

Tabla 32. Valores DO total según el estadio de IRC.

	Controles n=59	Pacientes con IRC			
		IRC/NT n=184			HD n=121
Estadios según FG	1+2 (n=59)	3 (n=87)	4 (n=76)	5 (n=21)	6 (n=121)
DO total (purinas+pirimidinas)	12,06 ± 1,19	14,48 ± 0,99	13,06 ± 0,89	16,13 ± 2,53	20,29 ± 2,55

DO, daño oxidativo; el estadio 6 corresponde a los pacientes que se encuentran en tratamiento de hemodiálisis; los valores se presentan como media ± EE.

Cuando se estudiaron los niveles de daño oxidativo total en relación con el estadio de IRC (Figura 36) se encontró que el daño aumentaba ligeramente en cada estadio (excepto en el estadio 4 donde se observa una disminución no significativa comparando con el estadio 3 ($P = 0,300$), una tendencia que ya se había observado en el DO en las purinas y el DO en las pirimidinas por separado. A pesar de este incremento, no se encontraron diferencias significativas entre los controles y los pacientes en el grupo con el estadio 3 ($P = 0,128$), el estadio 4 ($P = 0,491$), ni el estadio 5 ($P = 0,158$). Tan solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el DO total del grupo control y los pacientes en HD ($P = 0,004$).

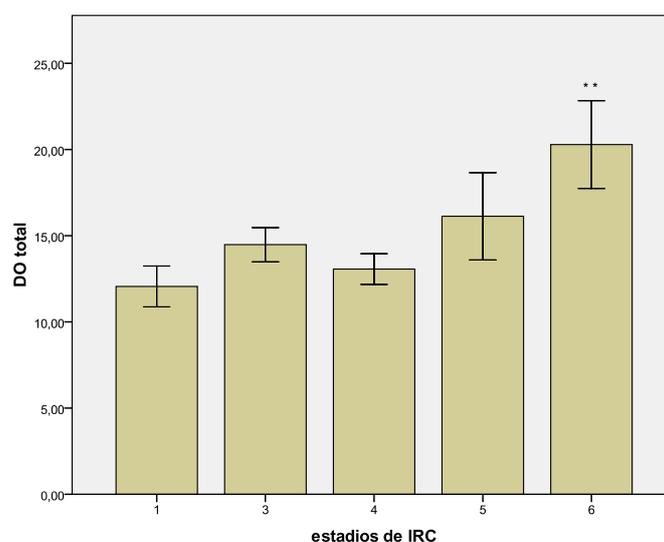


Figura 36. Distribución del DO total según el progreso de la IRC; 1, grupo control (estadios 1 + 2); 3, 4 y 5, estadios de IRC/NT; 6, pacientes tratados con HD; Diferencias significativas comparando los estadios de IRC con el grupo control: ** $P < 0,01$.

4.5.3.1. Relación entre el daño oxidativo total y distintos parámetros.

Dado que en los pacientes con IRC sometidos a tratamiento de HD se encontró una correlación significativa entre el daño oxidativo (en purinas y en pirimidinas) y la mortalidad, este efecto también se ha analizado en relación con el daño oxidativo total. Los valores obtenidos al analizar este parámetro se presentan en la Tabla 33.

Tabla 33. Daño oxidativo en pacientes vivos y fallecidos.

	DO total	<i>P</i>
Vivos	15,71 ± 2,19	0,023
Exitus letalis	33,96 ± 7,17	

Como se puede observar, los pacientes que habían fallecido durante el estudio resultaron ser los que presentaban niveles de DO total significativamente más elevados, en comparación con los pacientes en tratamiento de HD que seguían vivos ($P = 0,023$).

Por otro lado se ha estudiado si la edad o el género jugaban algún papel relevante en los niveles de daño oxidativo. Del análisis de estos factores se concluye que los niveles de DO total no se encuentran relacionados ni con el género ($P = 0,473$), ni con la edad ($P = 0,686$), en la población estudiada.

Dado que el tiempo en tratamiento en HD ha mostrado influenciar los niveles de daño genético, se ha analizado su efecto sobre los valores de daño total oxidativo. Así, en la Tabla 34 se indican los valores de daño oxidativo total, según el tiempo que los pacientes llevan en tratamiento de hemodiálisis.

Tabla 34. Niveles de daño oxidativo total según el tiempo en tratamiento.

Tiempo en HD	DO total
< 12 meses	21,22 ± 4,78
12-20 meses	23,13 ± 9,72
20-40 meses	13,75 ± 3,87
40-60 meses	23,05 ± 7,64
60-80 meses	17,93 ± 5,13
80 meses	23,67 ± 5,13

Los valores se presentan como media ± EE.

Como se observa, no parece que el tiempo en HD sea un parámetro importante a la hora de modular los niveles de daño oxidativo total. Para su mejor visualización, en la Figura 37 se presentan los niveles de DO total según el tiempo que los pacientes llevan en tratamiento de hemodiálisis.

Aunque hay una clara disminución en el daño oxidativo total en los pacientes tratados con HD por un periodo de entre 20-40 meses, esta disminución no parece tener un sentido claro, teniendo en cuenta la línea de ajuste en la figura.

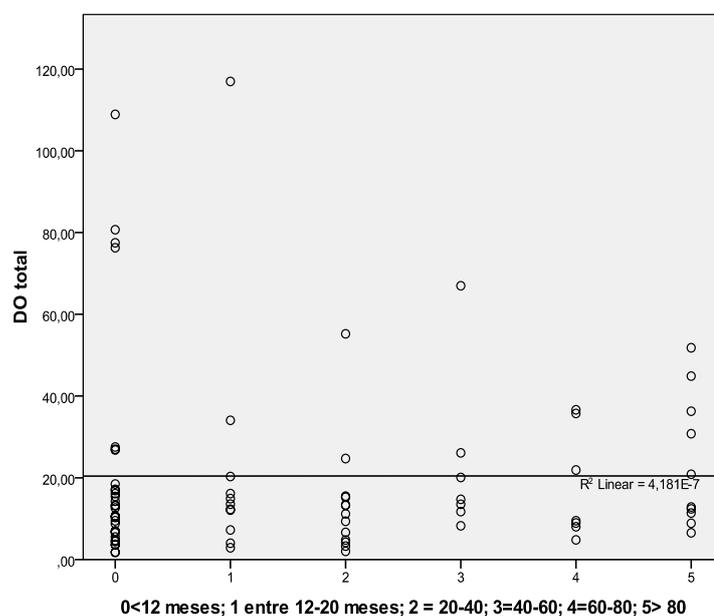


Figura 37. Distribución del daño oxidativo total según el tiempo en tratamiento de HD.

El efecto del tiempo y el cambio del sistema de hemodiálisis han sido otros factores estudiados para ver su papel modulador del daño oxidativo total. Así, en la Tabla 35 se indican los valores del daño oxidativo total para los pacientes muestreados de nuevo al cabo de un año aproximadamente, independientemente de si se mantuvieron en HD convencional o si cambiaron a un sistema de hemodiafiltración on-line.

De los resultados obtenidos se desprende que en el grupo de pacientes que durante el tiempo de seguimiento habían seguido en el mismo tratamiento de HD convencional no se observaron diferencias entre la primera y la segunda muestra ($P = 0,472$). Sin embargo, en el caso de los pacientes que habían cambiado de tratamiento de HD convencional a HD on-line los valores de DO total eran mucho más bajos después de unos meses de tratamiento con la nueva técnica ($P = 0,036$). Estos resultados indican que el tratamiento con la hemodiafiltración on-line podría estar reduciendo significativamente el daño oxidativo total, mientras la HD estándar no llega a influir sobre el estatus oxidativo de los pacientes con insuficiencia renal crónica.

Tabla 35. Daño oxidativo total en los pacientes sin y con cambio de tratamiento.

Pacientes on-line (n=18)		<i>P</i>	Pacientes HD (n=49)		<i>P</i>
1ª muestra convencional	2ª muestra on-line		1ª muestra HD	2ª muestra HD	
21,52 ± 6,74	9,04 ± 1,46	0,036	12,32 ± 2,90	11,21 ± 1,44	0,472

4.5.3.2. Otros factores relacionados con el daño oxidativo total

De las enfermedades más frecuentes en la población y algunos de los tratamientos que reciben los pacientes, algunos resultaron estar relacionadas con los niveles de DO total. Así, los pacientes con diabetes mellitus en tratamiento de HD mostraban valores de DO total mucho más altos comparados con los individuos que no sufrían de la enfermedad ($P = 0,022$). Se ha observado que el tratamiento con los inhibidores de la enzima conversiva de la angiotensina disminuye el estrés oxidativo. En el grupo de pacientes en HD también parece afectar a los niveles de DO total, así en los pacientes tratados con los fármacos que actúan sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona se observan niveles de daño oxidativo significativamente reducidos comparados con los pacientes no tratados con este fármaco ($P = 0,040$).

En la Tabla 36 se presentan los factores que resultaron estar relacionadas con los niveles de DO total en la población de los pacientes HD.

Tabla 36. Relación entre el daño oxidativo total y algunos factores disponibles para la población IRC.

Factores		HD DO total	P	IRC/NT DO total	P	
Patologías						
DM	sí	27,26 ± 5,56	0,022	sí	14,65 ± 1,60	0,886
	no	20,41 ± 2,78		no	13,98 ± 0,74	
ECV	sí	23,19 ± 3,79	0,366	sí	13,89 ± 0,91	0,907
	no	15,70 ± 2,58		no	14,35 ± 0,99	
HTA	sí	19,82 ± 2,66	0,619	sí	13,61 ± 0,70	0,057
	no	24,54 ± 8,98		no	17,75 ± 2,21	
Cáncer	sí	19,74 ± 3,88	0,328	sí	14,50 ± 1,42	0,998
	no	20,48 ± 3,18		no	13,94 ± 0,75	
Factores						
Tabaquismo	sí	20,78 ± 3,65	0,306	sí	14,68 ± 0,94	0,294
	no	19,47 ± 3,08		no	13,53 ± 0,98	
Trasplante renal	sí	16,73 ± 3,11	0,895	sí	-	-
	no	21,46 ± 3,25		no	-	
Medicamentos y suplementos						
IECA/ARA 2	sí	13,85 ± 2,41	0,040	sí	14,14 ± 0,82	0,755
	no	25,04 ± 3,93		no	14,12 ± 1,18	
L- carnitina	sí	21,07 ± 3,22	0,444	sí	-	-
	no	25,49 ± 3,80		no	-	
Estatinas	sí	19,76 ± 3,60	0,143	sí	14,28 ± 0,83	0,608
	no	20,96 ± 3,57		no	13,87 ± 1,19	
Renagel	sí	19,74 ± 3,05	0,773	sí	-	-
	no	25,05 ± 4,52		no	-	
Vitamina D	sí	18,03 ± 2,81	0,923	sí	13,37 ± 1,06	0,616
	no	22,24 ± 4,08		no	14,40 ± 0,87	

DM, diabetes mellitus; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, ARA 2, antagonistas del receptor tipo 1 de la angiotensina 2.

4.6. Inestabilidad genómica en los pacientes con IRC en tratamiento de hemodiálisis.

Tanto en los niveles de daño basal como en los de daño oxidativo se observan grandes diferencias interindividuales, independientemente del grupo en el que se haya clasificado al paciente. Nuestra hipótesis para explicar estas diferencias es que éstas se deben a la diferente capacidad de estos individuos de reparar el daño en el DNA. Por tanto, la capacidad diferencial de reparar daño oxidativo puede ser un valor a tener en cuenta para explicar muchas de las diferencias observadas.

Para medir esta capacidad se seleccionó un grupo de 21 pacientes, de acuerdo con el nivel de daño genómico que presentaban. Así, 11 de ellos eran los que presentaban los niveles más bajos dentro del grupo de pacientes HD, mientras los otros 10 eran aquellos que mostraban los valores de daño genómico más altos ($P < 0,001$). El promedio de la edad de los pacientes con daño bajo es de $58,72 \pm 5,60$ años, que es ligeramente más alto que el promedio de edad del grupo de daño alto $55,60 \pm 5,40$ años ($P = 0,694$). Entre los dos grupos estudiados se observaron diferencias significativas para el tiempo que llevaban en tratamiento sustitutivo ($P < 0,001$). Así, los de daño alto llevaban $88,80 \pm 9,66$ meses, mientras que los de daño bajo llevaban $30,00 \pm 4,83$ meses. Entre estos pacientes ninguno padecía algún tipo de cáncer y la proporción hombres/mujeres estaba equilibrada. Las características de los pacientes seleccionados y los niveles de daño basal que presentaban se indican en la Tabla 37.

Después de realizar el ensayo se obtuvieron los valores de reparación neta indicados en la Tabla 38.

Puesto que los valores obtenidos para los dos grupos estudiados con el ensayo de reparación seguían una distribución normal, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante pruebas paramétricas.

Cuando se llevó a cabo la comparación con la prueba t-Student, entre la capacidad de reparación del DNA de los pacientes que mostraban daño bajo y la de los que mostraban daño alto, se encontraron diferencias significativas ($P = 0,020$) entre los dos grupos, es decir, los individuos que formaban parte del grupo con bajos valores de daño basal resultaban ser los que tenían mayor capacidad de reparar.

Tabla 37. Características de la población estudiada y resultados obtenidos mediante el ensayo de reparación.

Características		Grupo daño bajo (n=11)	Grupo daño alto (n=10)
Edad (años)		58,73 ± 5,60	55,60 ± 5,40
Género	Hombres	6	5
	Mujeres	5	5
Tiempo en tratamiento de diálisis (meses)		30,00 ± 4,83	88,80 ± 9,67
Daño % DNA basal		12,04 ± 1,41	37,75 ± 2,90***

Los valores en la tabla se presentan como media ± EE; *** $P < 0,001$, significativamente más alto que el valor observado en el grupo de daño bajo.

Tabla 38. Valores de reparación neta para los dos grupos estudiados.

n	Grupo daño bajo (reparación neta)	n	Grupo daño alto (reparación neta)	P
11	18,13 ± 1,13	10	12,73 ± 1,84	0,020

Los valores se presentan como media ± EE y se calculan según la fórmula indicada anteriormente.

Dado que la capacidad de reparar podría verse influenciada por distintos parámetros se llevó al cabo un análisis lineal general univariante para detectar la existencia de estos factores, tanto en el grupo de daño bajo como en el grupo de daño alto. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 39.

Tabla 39. Modelo lineal general con la capacidad de reparar del grupo de daño bajo como variable dependiente.

Factores	Grupo daño bajo			Grupo daño alto		
	F	P	R ² /R ² ajustado	F	P	R ² /R ² ajustado
Edad	0,019	0,894	0,002/-0,109	2,501	0,152	0,238/0,143
Género	0,065	0,820	0,007/-0,103	5,761	0,043	0,419/0,346

En el grupo de pacientes con daño bajo, la capacidad de reparación del daño en el DNA no está afectada por los factores edad y género. En cambio, para el grupo con daño alto, mientras que la edad no parece afectar la capacidad de reparar, el género sí que muestra tener un cierto efecto ($P = 0,043$). Así, los hombres en este grupo muestran una menor capacidad de reparar ($9,15 \pm 1,20$) comparando con el valor de reparación obtenido en las mujeres ($16,31 \pm 2,73$).

Otro factor que es interesante relacionar con la capacidad de reparar es el tiempo en tratamiento de hemodiálisis. Se observa que en el caso de la población incluida en el ensayo de reparación, en el grupo de daño bajo se encontraban pacientes que estaban tratados con HD por un periodo de entre 14 y 72 meses mientras que los pacientes del grupo de daño alto se encontraban en tratamiento de HD por un periodo de entre 50 y 126 meses. Las diferencias entre el tiempo en tratamiento de HD entre los dos grupos era muy significativo ($P < 0,001$). Se clasificó la población según el tiempo que llevaban los pacientes en tratamiento, aplicando un punto de corte a los 40 meses de tratamiento en HD, a continuación realizamos la prueba t - Student. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 40.

Se observa que los pacientes que llevaban más de 40 meses en tratamiento de HD resultaron ser los que presentan una capacidad de reparar daño en el DNA significativamente reducida, en comparación con los pacientes que estaban en tratamiento por menos de 40 meses. En la Figura 38 se presenta la distribución de la capacidad de reparar según el tiempo en tratamiento.

Tabla 40. Comparación en la capacidad de reparar entre pacientes que están en tratamiento de HD por más o menos de 40 meses.

Tiempo en HD	Capacidad de reparar	P
≥ 40	13,27 ± 1,75	0,041
< 40	18,07 ± 1,25	

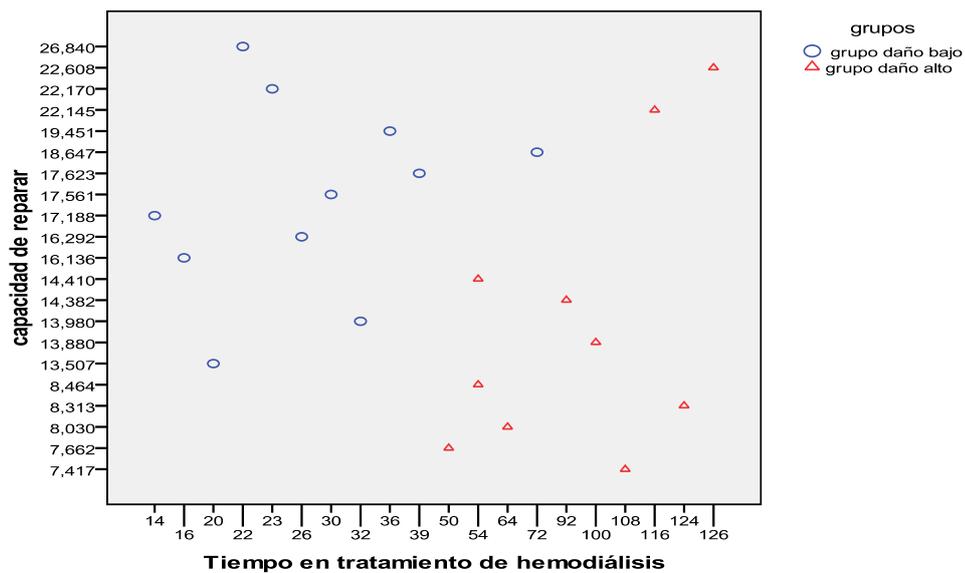


Figura 38. Relación entre la reparación neta y el tiempo en tratamiento sustitutivo para cada grupo.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La insuficiencia renal crónica es un problema de salud pública a nivel mundial. Además, la patología no está asociada solamente con problemas relacionados con el sistema urinario sino que la acumulación de sustancias nocivas en la sangre llega a afectar a otros órganos y sistemas del organismo, alterando su estado normal. Actualmente en los EE.UU., por citar un ejemplo, se encuentran afectados unos 26 millones de personas y se espera una prevalencia de la enfermedad de aproximadamente un 45% en el año 2020.

En la bibliografía se encuentran datos indicando que los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), tanto aquellos sometidos a tratamiento de hemodiálisis como los que todavía no se encuentran en tratamiento (pacientes pre-diálisis), presentan una elevada incidencia de patologías cardiovasculares, envejecimiento prematuro, patología cancerosa y elevados niveles de estrés oxidativo y carbonilo.

Esta elevada incidencia de cáncer (y también el envejecimiento) se ha relacionado con niveles elevados de daño genético y con la posible reducción en la capacidad de reparar el daño en el DNA. Se ha observado que estos pacientes acumulan gran cantidad de sustancias genotóxicas en el dializado o en el plasma, debido a la falta de eliminación de las mismas por el riñón, y que podrían ser la causa de la inestabilidad genómica en los pacientes con IRC. Es por esto que se requieren estudios para determinar si existe esta inestabilidad, así como sus posibles causas. Para estos objetivos, el ensayo del cometa se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada en la biomonitorización de poblaciones ya que permite la evaluación de roturas de simple y doble cadena, sitios álcali-lábiles y sitios AP, además de la opción que nos da de medir daño oxidativo específico aplicando el uso de las enzimas endo III y FPG.

Los estudios realizados con pacientes con IRC utilizando el ensayo del cometa generalmente se han llevado a cabo con poblaciones relativamente pequeñas, en comparación con el tamaño de la muestra utilizada en el presente trabajo. Un total de 305 pacientes con IRC en diferentes estadios de la patología es la muestra mayor utilizada en este tipo de estudios y este tamaño nos permite observar con mayor precisión los cambios del daño basal y oxidativo, según el desarrollo de la enfermedad renal, al permitir su estratificación en función de distintos parámetros. Además, la evaluación repetida de 66 pacientes, de los cuales 17 cambiaron de

tratamiento, nos ha permitido estimar los posibles efectos del tratamiento de hemodiálisis y las diferencias entre distintas técnicas de terapias sustitutivas sobre el estado general de los pacientes y su esperanza de vida.

Por otro lado, la alta incidencia de cáncer y los altos niveles de daño en el DNA observados en estos pacientes se atribuyen a la disminuida capacidad de estas personas de reparar este daño, lo que aumenta su inestabilidad genética. Por eso, utilizando una modificación del ensayo del cometa, hemos medido esta capacidad en un pequeño subgrupo de pacientes en tratamiento de HD que se encontraban sometidos a tratamiento sustitutivo por diferentes periodos de tiempo. Esto nos ha permitido observar si el tiempo en tratamiento está relacionado con la capacidad de eliminar el daño presente en el DNA.

Entre las causas más frecuentes de la IRC en la población estudiada se encuentra la nefroangioesclerosis, la glomerulonefritis y la diabetes mellitus. Estas causas, junto a la serie de datos clínico-analíticos disponibles para los pacientes se han utilizado para ver sus posibles correlaciones con el daño basal y oxidativo así como la evolución de las mismas. Por lo tanto, también hemos estudiado el efecto de patologías típicas de la IRC como la diabetes, la dislipemia, la enfermedad cardiovascular y el cáncer sobre los niveles de daño.

5.1. Daño genético en los pacientes con insuficiencia renal crónica.

El ensayo del cometa es un ensayo con una amplia aplicación en los estudios de biomonitorización de poblaciones expuestas a agentes genotóxicos, así como en aquellas expuestas a tratamientos con fármacos y/o poseyendo determinadas enfermedades. El ensayo se ha utilizado también para la evaluación de los niveles de daño en el DNA tanto en pacientes con IRC que aun no se encuentran en tratamiento de HD, como en pacientes sometidos a diferentes modalidades de tratamiento de HD. Hay que tener en cuenta, como ya se ha comentado, que la mayoría de los estudios que han evaluado daño en el DNA de pacientes con IRC se han realizados con grupos de pacientes relativamente pequeños. Hay que enfatizar que, a pesar de que el ensayo del cometa es un buen método para medir daño genético, su modificación utilizando enzimas que reconocen el daño oxidativo mejora su utilidad en los estudios llevados a cabo con pacientes con IRC, donde el estrés oxidativo ha mostrado ser un mecanismo que causa efectos secundarios (Stopper et al., 2001). En un estudio llevado a cabo

por Kan et al. (2002) se comparó el daño en el DNA de 36 pacientes en HD antes y después de suplementarles con vitamina E por 14 semanas, encontrando que el daño antes de la suplementación era mayor, indicando que la vitamina E tiene capacidad protectora. En otro estudio con sólo 5 pacientes pre-diálisis y 7 pacientes que cambian de HD a HDF se ha encontrado que el comienzo del tratamiento con HD no altera los niveles de daño en el DNA, mientras que en los que cambian el sistema de hemodiálisis (de HD a HDF) se encuentra una disminución significativa en los niveles de daño (Kobras et al., 2006). En otro estudio Schupp et al. (2006) encuentran que el daño detectado con el ensayo del cometa es más alto en los pacientes que en los controles; sin embargo, en los pacientes en HD diaria (n= 5) este valor es más bajo que el observado en los pacientes tratados con HD estándar (n= 7). Por otro lado, los cambios de pre-diálisis a HD estándar y de HD estándar a HDF no suponen ningún cambio en los niveles de daño detectado. En otro estudio del mismo grupo (Stopper et al. 2001) se investiga a un total de 69 pacientes con IRC y se encuentra que el daño en el DNA incrementa conforme se desarrolla la IRC siendo mayor en los pacientes tratados con HD por más de 10 años. Cuando analizan el daño observado en los pacientes sometidos a HDF se observa que éstos muestran valores que se hallan entre los encontrados para los pacientes pre-diálisis y los tratados con HD. Finalmente, Muller et al. (2004) han llevado a cabo un estudio comparando 12 controles con 21 pacientes en tratamiento de HD, encontrando que los niveles de daño son significativamente más altos en los pacientes.

Para evaluar el daño genético en los pacientes con IRC también se han utilizado otros biomarcadores diferentes del ensayo del cometa. Así, la técnica de intercambios entre cromátidas hermanas (SCE, *sister chromatid exchanges*) se ha utilizado en varios estudios con pacientes con insuficiencia renal crónica. El primer estudio se llevó a cabo por Cengiz et al. (1988), y se realizó con 44 pacientes con IRC y 24 controles. Los resultados muestran que la uremia aumenta la presencia de cromosomas estructuralmente anormales y que estos cambios citogenéticos pueden desempeñar un papel en el aumento del riesgo de cáncer. Por otra parte Lialiaris et al. (2010) investigan la frecuencia de SCE en 32 pacientes con IRC y 18 controles. En este estudio el aumento en la frecuencia de SCE se evaluó como un índice de daño en el DNA, mientras que la reducción en los valores de los índices de proliferación celular se tomó como un índice de ralentización celular, y las alteraciones del índice mitótico como un marcador de citotóxicidad. En comparación con los controles vieron que la frecuencia de SCE aumenta en los pacientes con IRC mientras que los índices mitóticos se encuentran reducidos. En otro estudio (Pernice et al., 2006) se evaluaron los SCE en 30 pacientes en HD (AFB) y 25

controles. Las frecuencias de SCE fueron mayores en los pacientes que en los controles, tanto en las muestras pre-dialíticas, como en las post-diálisis; sin embargo, en las muestras tomadas 24 h después de la diálisis los valores observados eran aún más altos. En un estudio del mismo grupo con el mismo número de pacientes y controles se observó de nuevo que los SCE son mayores en los pacientes (Buemi et al., 2006). Por último, en un trabajo más reciente de Karaman y Keskinler (2009) se confirma que los SCE en 34 pacientes con IRC se encuentran significativamente elevados en comparación con 30 controles.

Otro biomarcador analizado en los pacientes con IRC ha sido las alteraciones en el DNA mitocondrial. Así, Liu et al. (2001) trabajaron una delección de 4977 bp en el DNA mitocondrial de 162 pacientes (125 en HD y 37 en DP) y 236 controles, y encontraron que la inestabilidad en el genoma mitocondrial de los pacientes con IRC terminal es significativamente más alta que en los controles. De manera similar Lim et al., (2002) encuentran que la delección ocurre con mayor frecuencia en los pacientes en comparación con los controles.

El ensayo de micronúcleos (MN), siendo un método que mide daño en el DNA fijado, se considera un biomarcador que también ofrece la posibilidad de medir daño genético (Alati et al., 1989; Trosic et al., 2004; Thierens y Vral, 2009), por lo que se ha utilizado en distintos estudios en pacientes con IRC. En un estudio con 20 pacientes en HD, 20 pacientes en DP y 40 controles (Roth et al., 2008) se observa que los pacientes en HD tienen una frecuencia significativamente más alta de MN que en los controles pero no respecto a los pacientes tratados con DP. Esto se confirma en un estudio posterior (Schupp et al., 2006), donde también se encuentra que la frecuencia de MN es más alta en los pacientes que en los controles, y que en los pacientes en HD diaria (n= 5) es más baja en comparación con los pacientes tratados con HD estándar (n= 7); además, en este estudio se observa que los cambios de pre-diálisis a HD estándar y de HD estándar a HDF no supone ninguna variación en la frecuencia de MN. Así, en el primer estudio (Fragedaki et al., 2005) se encontró que la frecuencia de MN es significativamente más alta en pacientes en HD en comparación con los 12 controles y más baja en los 13 pacientes en HD diaria que en los que se mantenían en HD estándar. Resultados similares son los encontrados por Schupp et al. (2008) quienes encuentran que los pacientes en tratamiento de HD diaria (n= 15) tienen disminuida la frecuencia de MN, en comparación con los tratados con HD estándar (n= 13). Un enfoque algo distinto es el del trabajo de Stopper et al. (2008) quienes encuentran en 27 pacientes con IRC en tratamiento de HD una disminución en la frecuencia de MN después de la suplementación con ácido fólico y vitamina B₁₂. Por su parte,

Sandoval et al. (2010) encuentran que la frecuencia de MN en 201 pacientes con IRC es significativamente más alta en comparación con la de 57 controles.

El daño genómico se puede medir indirectamente como alteraciones en la capacidad de reparar el daño en el DNA. En pacientes urémicos se ha utilizado el ensayo de determinación de la síntesis de DNA no programada (Malachi et al., 1993) encontrándose que los pacientes con IRC no en diálisis tienen disminuida la capacidad de reparación después de irradiar sus células con radiación gamma y UV. Sin embargo, esto no se observa en los pacientes HD. Herman et al. (2008) utilizan el ensayo FADU (*Fluorometric Assay of DNA Unwinding*) para medir roturas de doble cadena en los linfocitos de los pacientes en HD y encuentran que su reparación aumenta después de la sesión de HD. Además, utilizando la enzima FPG demuestran que una parte muy importante del daño inducido es oxidativo.

Como se observa en la gran mayoría de los estudios realizados con pacientes con insuficiencia renal crónica estos trabajos incluyen relativamente pocos pacientes. En este sentido nuestro estudio se ha llevado a cabo con una población significativamente más grande en comparación con las poblaciones encontradas en la bibliografía hasta el momento.

5.1.1. Daño genético en pacientes con IRC medido mediante el ensayo del cometa.

En nuestro estudio se han evaluado los niveles de daño en el DNA de un total de 305 pacientes en diferentes estadios de IRC, así como en 59 controles. Los resultados obtenidos muestran claramente que el daño en el DNA se encuentra significativamente elevado en los pacientes en comparación con los controles. Sin embargo, en nuestra población no se han encontrado diferencias significativas entre los valores correspondientes a los pacientes pre-diálisis y los que se encuentran en tratamiento de HD.

Un aspecto importante de este trabajo ha consistido en juzgar el papel que distintos parámetros característicos de la patología juegan en la aparición del daño en el DNA. Esta aproximación ha sido posible gracias al elevado número de pacientes incluidos en el estudio. El filtrado glomerular (FG) es un parámetro ampliamente utilizado para la clasificación del funcionamiento renal, y en nuestro estudio hemos encontrado una correlación negativa entre los valores de FG y el daño genético en los pacientes con IRC que aún no se encuentran en tratamiento de HD. Es decir cuanto menos funcionan los riñones, mayor es el daño en el DNA

Dado el elevado número de pacientes, nuestra población estaba compuesta por individuos con diferentes niveles de disfunción renal. Así, 87 pacientes (estadio 3) tenían filtrado glomerular (FG) entre 30 - 59 mL/min/1,73 m², 76 pacientes (estadio 4) entre 15-29 mL/min/1,73 m² y 21 pacientes (estadio 5) < 15 mL/min/1,73 m². Además, 121 se encontraban en tratamiento de HD. Nuestros resultados indican que el nivel de daño en el DNA aumenta con el progreso de la patología renal y este es un resultado no observado en ningún estudio previo. Los valores del daño en el estadio 3, 4 y 5 y de los pacientes en HD son significativamente más altos en comparación con los controles. No se observaron diferencias significativas entre estadios 3, 4, 5 y pacientes en HD.

Otra manera de evaluar la función renal son los niveles de creatinina en sangre. La creatinina aumenta con el desarrollo de la insuficiencia renal y afecta a los niveles de daño en el DNA de los pacientes con IRC/NT. Analizando los valores de daño en el DNA según el estadio de IRC resultó existir una relación significativa entre los niveles de creatinina en el estadio 5 de IRC/NT y los niveles de daño en el DNA, justo en la etapa antes de empezar el tratamiento sustitutivo. Estos resultados sugieren que el desarrollo de la IRC está relacionado con un aumento de los niveles de daño detectados en el DNA, que por otro lado coincide con los resultados preliminares observados en otros estudios (Stopper et al., 2000; Muller et al., 2004).

La albúmina es la proteína más abundante en sangre y tiene muchas propiedades fisiológicas y bioquímicas ya que participa en el mantenimiento de la presión osmótica coloidal y puede influir en la integridad microvascular y en aspectos de la vía inflamatoria (Quinlan et al., 2005). Para los pacientes en estadios 3, 4 y 5 de la patología se encontró una correlación negativa entre las concentraciones de albúmina en sangre y los niveles de daño en el DNA. Es decir, cuanto más se acercaban los valores de albúmina a los normales menos daño en el DNA se observaba, lo que concuerda con la evolución de la patología.

Existen varios estudios que afirman que la suplementación con vitamina B₁₂ reduce los niveles de daño en el DNA. Así, Fenech et al. (1998) encuentran una relación negativa entre la frecuencia de MN en mujeres suplementadas con B₁₂. En otro estudio (Mahrous, 2009) se confirman estos resultados, dado que encuentran que la suplementación con vitamina B₁₂ reduce la frecuencia de MN, sobre todo en los individuos con valores iniciales muy altos. Milic et al. (2010), utilizando como biomarcador la frecuencia de MN, encuentran también que la frecuencia más alta de MN se corresponde con el grupo con menores concentraciones de vitamina B₁₂; resultados que no se han podido confirmar con el ensayo del cometa. Además,

está comprobado que el déficit de vitamina B₁₂ puede causar daño en los cromosomas, incrementando la formación de MN tanto *in vivo* (Kazimirova et al., 2006) como en células humanas *in vitro* (Fenech, 2001). En nuestro estudio, los pacientes con IRC no en tratamiento de HD se encontraban suplementados con diferentes dosis de vitamina B₁₂, resultando que los pacientes que recibían dosis más altas eran los que mostraban niveles de daño en el DNA significativamente más bajos, en comparación con los pacientes que recibían dosis más bajas.

El déficit de ácido fólico y otras vitaminas solubles puede ser resultado del mismo tratamiento de HD. La hiperhomocisteinemia empieza a aparecer con el deterioro de la función renal y se considera un factor para la mortalidad de los pacientes con IRC terminal y el desarrollo de problemas cardiovasculares (Sanchez et al., 2007). Se ha sugerido en varios estudios que los niveles de homocisteína se pueden disminuir significativamente con la aplicación sólo de ácido fólico o en combinación con otras vitaminas (como la vitamina B₆ y B₁₂) (Chauveau et al., 1996; Tremblay et al., 2000; Armada et al., 2001). En nuestro estudio también hemos encontrado una correlación negativa entre el ácido fólico y la homocisteína; así, los pacientes suplementados con ácido fólico mostraban niveles de homocisteína significativamente más bajos.

Las distintas patologías que se encuentran presentes en los pacientes con IRC como el cáncer, la enfermedad cardiovascular, la dislipemia, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial parecen no tener efecto significativo sobre los niveles de daño basal en el DNA, tanto en los pacientes tratados con HD como en los pacientes con IRC en diferentes estadios que aún no están en tratamiento de HD. De estos valores, quizás el más sorprendente es la falta de incremento de daño en los pacientes con historia de cáncer, ya que en general, estos pacientes presentan elevados niveles de daño (Smith et al., 2003; Halazonetis et al., 2008).

5.2. Daño oxidativo en los pacientes con insuficiencia renal crónica.

Una elevada presencia de especies reactivas de oxígeno puede ocasionar daño en las estructuras celulares, incluyendo los lípidos, las proteínas y el DNA (Schupp et al., 2010). El estrés oxidativo lo podemos definir como el desequilibrio entre la generación de oxidantes y la actividad de los sistemas anti-oxidantes. Esto quiere decir, incrementos en los niveles de aquellos oxidantes como el anión radical superóxido, el radical hidroxilo y la producción de peroxidación de lípidos, así como de las defensas antioxidantes como la superóxido dismutasa,

la catalasa, el glutatión (GSH), la peroxidasa, la GSH-S-transferasa, los tioles, el tocoferol, el ascorbate y los carotenoides, entre otros.

En la enfermedad renal existen evidencias clínicas y experimentales que indican que entre las manifestaciones de la insuficiencia renal crónica se da un aumento en los niveles de radicales libres y estrés oxidativo (Tarnag et al., 2000). Además, se observan niveles incrementados de estrés oxidativo en pacientes que se encuentran en tratamiento de HD por periodos largos (Ferretti et al., 2008).

Así, en un estudio con 78 pacientes en estadios entre 1 y 4 de IRC se observa que el estrés oxidativo está aumentado (medido con ensayo inmunoenzimático) y que el estado antioxidante total (medido con métodos cromatográficos) disminuye conforme los valores de FG bajan (Dounousi et al., 2006). Los estudios de Oberg et al. (2004) confirman que el estrés oxidativo está significativamente elevado en un grupo de 60 pacientes en estadios entre 3 y 5 de IRC y también encuentran que la proteína C reactiva (como marcador de inflamación) tiene niveles significativamente elevados en pacientes con enfermedad cardiovascular y en los que no reciben IECA. Además, también los pacientes con diabetes muestran niveles elevados de estrés oxidativo y éste también se ha visto que está relacionado con el estado inflamatorio asociado a la insuficiencia renal crónica y con el tratamiento de hemodiálisis (Witko-Sarsat et al., 2003).

La existencia de niveles elevados de estrés oxidativo en la insuficiencia renal se confirma por los niveles altos de productos de la oxidación de proteínas, lípidos y carbohidratos (Miyata et al., 2000). Así, los AGEs se consideran marcadores de la oxidación de proteínas que se forman a través de reacciones de deshidratación, condensación y eliminación de los productos de Amadori (Schwedler et al., 2001).

También se ha señalado que el mismo tratamiento de hemodiálisis contribuye a los niveles altos de estrés oxidativo y a los reducidos niveles de antioxidantes (Galle, 2001). El aumento del estrés oxidativo durante el tratamiento de hemodiálisis se encuentra relacionado con el tipo de filtros utilizados en el tratamiento y distintos autores sugieren que el uso de membranas sintéticas y biocompatibles podrían reducir el efecto pro-oxidante del tratamiento (Descamps-Latscha et al., 2001). En su trabajo, Miyazaki et al. (2000) observan incrementos en los niveles de LDL oxidadas después de una sesión de hemodiálisis realizada con membranas de celulosa; sin embargo, Koschack et al. (2003) no encuentran relación entre los niveles de LDL oxidados

con el tipo de membrana utilizado, pero sí que observan que los niveles de antioxidantes en el plasma se reducen cuando se utilizan dializadores hechos de celulosa regenerada (*Cuprophan*).

Dado que se ha observado la existencia de considerables niveles de estrés oxidativo en los pacientes con IRC en el etapa en el que aún no están incluidos en tratamiento de hemodiálisis (Puchades Montesa et al., 2009), se sugiere que el estrés oxidativo puede tener un papel fundamental en el desarrollo y el mantenimiento de la IRC (Modlinger et al., 2004). Así, los EROs aumentan de manera gradual en función del deterioro renal, observándose una relación inversa entre diferentes marcadores de estrés oxidativo y el filtrado glomerular (Dounousi et al., 2006; Quiroz et al., 2008). Por su parte, Rutkowski et al. (2006) afirman en su estudio que los niveles de estrés oxidativo aumentan cuando empeora el síndrome urémico.

En nuestro estudio se ha observado que los pacientes con IRC, tanto los tratados con hemodiálisis como los que aún no se encuentran en tratamiento sustitutivo, muestran valores de daño oxidativo en las purinas significativamente más altos en comparación con los controles. Sin embargo, cuando se mide el daño oxidativo en las pirimidinas no se encontraron diferencias entre los pacientes con IRC y los controles. A nivel de daño oxidativo total resulta que los pacientes en tratamiento de HD muestran valores significativamente más altos que los valores de los controles y también más altos en comparación con los pacientes con IRC que aún no se encuentran en tratamiento sustitutivo, lo que confirma la asociación entre daño oxidativo y evolución negativa de la patología. Esto está de acuerdo con lo encontrado por Papaioannou et al. (2008) quienes indican que el estrés oxidativo aumenta con la progresión de la IRC siendo mayor en los pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis. Estos valores los obtuvieron en un estudio realizado con 20 controles y 127 pacientes en diferentes estadios de insuficiencia renal crónica.

Comparando los niveles de daño oxidativo según las etapas de desarrollo de la insuficiencia renal, a nivel de daño oxidativo en las pirimidinas, no se encontraron diferencias significativas conforme bajaban los valores del filtrado glomerular. Por el contrario, el daño oxidativo en las purinas se ha encontrado significativamente elevado en los estadios 3 y 5 de la enfermedad, así como en los pacientes que se encontraban en tratamiento de HD. Aunque, el daño oxidativo total aumenta conforme disminuye el FG, no se llegan a encontrar diferencias significativas respecto al control excepto para los pacientes que se encuentran en tratamiento de HD.

Por lo que respecta a otros indicadores de daño oxidativo, Kolagal et al. (2009) encuentran que en 51 pacientes con IRC, que aun no se encuentran en tratamiento de HD, los niveles de MDA (malondialdehído, un marcador para el estrés oxidativo) estaban significativamente elevados en comparación con los controles. Asimismo, en otro estudio con 150 pacientes con diferentes estadios de IRC se observa que los valores de la peroxidación lipídica aumentan progresivamente del estadio 2 al estadio 5, sugiriendo que el estrés oxidativo puede estar involucrado en el desarrollo de la patología (Nagane et al., 2009).

Otras razones para explicar el daño oxidativo observado en la IRC podría deberse a los fármacos aplicados, como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; entre éstos se encuentran fármacos como el enalapril, el captopril, el fosinopril, el lisinopril, etc. O los antagonistas del receptor tipo 1 de la angiotensina II como el losartan, valsartan, telmisartan, irbesartan, etc. Estos medicamentos se administran a los pacientes con insuficiencia renal crónica para controlar la hipertensión arterial y actúan reduciendo la presión capilar glomerular, bloqueando los efectos tisulares proliferativos de la angiotensina II, lo que supone un efecto antiproteinúrico y protector renal añadido a la propia acción antihipertensiva (Luño, 2002). En nuestro caso, el tratamiento con IECA o ARA-2 en la población estudiada resultó reducir significativamente los niveles de daño oxidativo en las pirimidinas y el daño oxidativo total en comparación con los niveles que mostraban los pacientes que no se medicaban con estos fármacos.

Varios estudios confirman los resultados que hemos obtenido, tanto en pacientes como en modelos animales. En ratones se ha comprobado que el efecto del enalapril disminuye la oxidación lipídica en los riñones y el corazón, y sugiere que puede tener efecto sobre el status oxidante/antioxidante de los tejidos (de Cavanagh et al., 2001). Un estudio realizado con 165 pacientes en tratamiento de diálisis peritoneal tratados con IECA obtiene una importante reducción en la mortalidad de estos pacientes (Fang et al., 2008); mientras que otro estudio llevado a cabo con 11 pacientes en tratamiento de hemodiálisis tratados con IECA (enalapril) y 11 controles se encuentra que los tratados tienen algunas defensas antioxidantes incrementadas en comparación con los pacientes no tratados (de Cavanagh et al., 1999).

Como se ha comentado, se considera que los niveles elevados de estrés oxidativo es una característica de los pacientes afectados por diabetes e insuficiencia renal. En estas patologías el estrés carbonilo, formado por la producción excesiva de compuestos carbonilos activos o bien por la falta de eliminación del cuerpo de éstos, también actúan aumentando el estrés oxidativo

(Atanasiu et al., 2006). Así, el elevado estrés oxidativo y las reducidas defensas antioxidantes en los pacientes con diabetes e IRC aceleran la prevalencia de aterosclerosis y otras complicaciones crónicas. Además, cabe mencionar que la diabetes es la principal causa de la insuficiencia renal a nivel mundial, y la mortalidad de los pacientes en tratamiento de HD con diabetes es mucho más alta que en los pacientes que no sufren de diabetes, debido a la alta incidencia de enfermedad cardiovascular (Williams, 2009; Satirapoj, 2010; Wang, 2011). Bagatini et al. (2008) también encuentran que los pacientes con diabetes en HD muestran más daño en el DNA en comparación con los controles, observando que la sesión de hemodiálisis aumenta significativamente el daño, que posteriormente se reduce con el paso del tiempo, posiblemente debido a la reparación, que en el estudio previo de Blasiak et al. (2004) se sugiere que puede encontrarse deficiente en estos pacientes.

La presencia de la diabetes mellitus en la población de pacientes con IRC en tratamiento con hemodiálisis resultó tener efecto sobre los niveles de daño oxidativo. Así, los pacientes afectados por la patología mostraban valores de daño oxidativo total significativamente más altos que los que no la padecían. Esto estaría de acuerdo con el estudio de Dursun et al. (2005a) quienes en un estudio llevado a cabo con 20 pacientes con diabetes, 20 pacientes con IRC en tratamiento de HD, 20 pacientes con diabetes y en tratamiento HD y 20 controles encuentran que los niveles de estrés oxidativo, como resultado de la peroxidación lipídica, son elevados en todos los grupos de pacientes, pero más elevados en los 20 pacientes con diabetes en tratamiento de HD. Asimismo, en otro trabajo del mismo grupo (Dursun et al., 2005b) se observa que las proteínas carboniladas se encuentran elevadas en los pacientes con diabetes y que el tratamiento de HD causa un incremento adicional de estos niveles en los pacientes, antes y después de la diálisis, en comparación con pacientes con diabetes no en tratamiento de diálisis.

5.3. Niveles de mortalidad en el grupo de pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis.

La insuficiencia renal en su etapa final, cuando requiere la aplicación del tratamiento de hemodiálisis como terapia sustitutiva, es un problema de carácter médico, económico y social. Aunque la terapia sustitutiva previene la muerte causada por la acumulación de sustancias nocivas, como consecuencia de la disminuida función renal, la población de pacientes con IRC

en tratamiento de HD sigue mostrando problemas de supervivencia causados por complicaciones relacionados con la patología renal. Generalmente para los pacientes en tratamiento de HD se calcula una supervivencia alrededor de 7- 11 años o menos, dependiendo de su edad (Elsharif, 2011). La realización no estricta de las sesiones de hemodiálisis resultan ser un factor que influye negativamente a la mortalidad (Saran et al., 2003).

En los últimos 30 años se han introducido cambios que han mejorado significativamente el tratamiento de hemodiálisis, como mejoras en las máquinas, la metodología (nuevas técnicas convectivas como la HDF on-line pre y post-dilucional), la introducción de nuevos tipos de membranas más biocompatibles y el aumento del control durante el tratamiento; cambios que han llevado a la disminución en la mortalidad de estos pacientes, en comparación con la que se observaba en los años 80. A pesar de todo esto el nivel de mortalidad de estos pacientes se sigue considerando bastante alto, comparándolo con la población general. Se considera también que la mortalidad de los pacientes en tratamiento sustitutivo varía según la región en la que residen. Una comparación llevada a cabo con 142 pacientes en HD en los EE.UU., 101 pacientes en Europa y 61 en Japón muestra mayor mortalidad en los pacientes americanos (21,7%), seguidos por los europeos (15,6%) y los japoneses (6,6%), resultados obtenidos durante un año de seguimiento (Goodkin et al., 2003). Un estudio previo comparando la mortalidad en las mismas regiones, pero utilizando un número mucho más grande de pacientes con IRC en tratamiento de HD y durante un periodo de 5 años, también muestra mayor supervivencia en los pacientes de Japón, seguidos por los pacientes de Europa y los EE.UU. (Held et al., 1990). Por lo que respecta a España, el informe de diálisis y trasplante de la Sociedad Española de Nefrología y Registros Autonómicos del año 2000, señala un nivel de letalidad entre los pacientes en tratamiento de HD igual al 13,4% (Amenabar et al., 2000).

El nuestro estudio, el grupo de pacientes cuya supervivencia hemos analizado está compuesto por 121 pacientes en tratamiento convencional de hemodiálisis (tres veces por semana, realizando las sesiones de HD con una duración de 3 horas). En los últimos tres años hemos observado un nivel de mortalidad igual al 31,9% a nivel de todo el grupo estudiado. Varios estudios muestran también un porcentaje elevado de mortalidad en los pacientes sometidos a tratamiento de HD. Así, el seguimiento de un grupo de 103 pacientes en Libia muestra un 51,4% de mortalidad por un periodo de 5 años de tratamiento (Buargub, 2008), teniendo en cuenta también que el riesgo de mortalidad se encuentra más elevado con la progresión del deterioro renal (Raymond et al., 2007).

Entre las causas más frecuentes de la alta mortalidad en estos pacientes destacan:

a) La enfermedad cardiovascular.

Las tasas de mortalidad por enfermedad cardiovascular en los pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis es de 20 a 40 veces mayor que en la población general (Collins et al., 2001). A nivel mundial las enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular presentan la principal causa de mortalidad entre los pacientes con insuficiencia renal (entre un 10-30% más que en la población que no presenta IRC) (Parfrey y Foley, 1999; Sarnak y Levey, 2000; London et al., 2003; Weiner et al., 2004; Dhingra et al., 2011). En nuestro estudio el mayor porcentaje de mortalidad (55,3%) resultó ser consecuencia de problemas cardiovasculares, incluyendo en este término la enfermedad cardiovascular, el infarto agudo de miocardio, la bradiarritmia, la isquemia vascular y la enfermedad arterial periférica.

b) El estado inflamatorio.

La IL6 es un mediador en los procesos de inflamación y es crucial en el inicio de la respuesta inmunitaria induciendo la liberación de proteínas de la fase aguda como la proteína C reactiva (PCR). Los niveles de IL6 y de PCR además de indicadores de inflamación, se encuentran relacionados con la patogenia de las enfermedades cardiovasculares (Kanda y Takahashi, 2004) y también se encuentran elevados en los pacientes en tratamiento de HD (Haubitz et al., 1996).

La PCR es una herramienta de diagnóstico e indicador de procesos de inflamación. También se ha demostrado que el descenso de sus niveles está asociado con una mayor probabilidad de supervivencia (Reny et al., 2002; Claeys et al., 2002). En un estudio llevado a cabo con 19 pacientes en HD (Spittle et al., 2001) se observaron diferencias significativas en la supervivencia a lo largo de 3 años entre los pacientes con valores altos y bajos de proteína C reactiva. Por otro lado, en una población de 280 pacientes en HD un 58% de la mortalidad observada se debe a eventos cardiovasculares y ésta mortalidad está relacionada con elevados niveles de PCR (Zimmermann et al., 1999).

Así, la proteína C reactiva (PCR) es un indicador general de infección e inflamación y, por tanto, puede utilizarse para determinar el riesgo de sufrir enfermedades cardíacas y, aunque no es un factor determinante, los niveles de proteína C reactiva pueden ser un índice que ayude a orientar algunos diagnósticos e indicar el riesgo de sufrir enfermedades cardíacas. Los valores normales de PCR son los menores de 10 mg/L. La media de los valores para los pacientes en

tratamiento de HD incluidos en nuestro estudio es de $13,29 \pm 2,30$ (media \pm EE), mientras que el valor correspondiente a los pacientes que siguen vivos es de $8,97 \pm 1,77$, pero la media de los pacientes que han fallecido es de $22,95 \pm 6,05$. Así, analizando los posibles factores implicados en la mortalidad de los pacientes en HD se ha encontrado una correlación positiva con los niveles de PCR ($P = 0,005$), sugiriendo de esta manera que se podría utilizar como predictor de la mortalidad para la población estudiada. Varios estudios realizados con pacientes en tratamiento de hemodiálisis muestran que los niveles de PCR entre otros indicadores de inflamación, están relacionados con la mortalidad causada por enfermedades cardiovasculares (Maggiore et al., 2005; Tripepi et al., 2005; Honda et al., 2006). Es interesante resaltar el hecho de que los valores de daño genético medido mediante el ensayo del cometa en estos pacientes resultan ser significativamente más altos en los pacientes que han fallecido.

c) La edad avanzada de los pacientes en HD.

En los últimos años se observa una tendencia de incluir pacientes con edad muy avanzada (mayores a 75 años) en tratamientos de hemodiálisis, debido por un lado al envejecimiento de la población en general y al mejor mantenimiento durante el periodo pre-diálisis. En Nueva Zelanda, por ejemplo, los pacientes mayores a 75 que necesitan tratamiento sustitutivo ha incrementado un 396% entre los años 1991-2001 (Madhan, 2004). No es extraño pues que la mortalidad para los pacientes mayores sea mucho más elevada que la de los pacientes más jóvenes. Así, ésta es de 17,3% en el grupo de 45-64, mientras que en el grupo de 65-84 es de 30,8% (McDonald y Russ, 2002) quienes muestran también que los pacientes en HD presentan tasas de mortalidad más elevadas que los pacientes en DP.

La alta tasa de mortalidad presente en el tratamiento sustitutivo hace que este tratamiento no proporcione una elevada calidad de vida, lo que genera la duda de si estos individuos deberían ser incluidos en programas de tratamiento sustitutivo o sí se debería optar por una terapia conservativa (Gómez, 2008). Un estudio de Murtagh y colaboradores, hecho con pacientes mayores de 75 años, comparando la supervivencia entre pacientes tratados con HD y en tratamiento conservativo, muestra que ajustando los resultados a la comorbilidad y a la presencia de cardiopatía isquémica no se aprecia ninguna ventaja del tratamiento sustitutivo (Murtagh et al., 2007). Analizando los niveles de mortalidad en los pacientes que participaron en nuestro estudio se encuentra que los paciente fallecidos eran significativamente mayores ($68,89 \pm 1,99$ años) en comparación con los pacientes vivos ($60,05 \pm 1,67$ años) y el efecto de la edad sobre la supervivencia de este grupo también era significativo ($P = 0,003$).

d) El tiempo en tratamiento de HD y la mortalidad.

En diferentes estudios se ha observado una cierta relación entre el tiempo y la modalidad de tratamiento en hemodiálisis, el género y la tasa de mortalidad de los pacientes. Así, Bradley (1987) observa que los pacientes en tratamiento de HD por períodos largos tienen menos probabilidad de sobrevivir por más de 15 años, en comparación con pacientes que han estado en HD y han sido trasplantados. Otro estudio (Harris y Brown, 1998) confirma que las complicaciones, la morbilidad y la mortalidad son muy altas después de 10 años de tratamiento de diálisis.

En nuestro estudio el tiempo en tratamiento de hemodiálisis se han encontrado que está relacionado con la mortalidad de estos pacientes ($P = 0,009$). Así, los pacientes fallecidos resultaron ser los que llevaban más tiempo en tratamiento sustitutivo ($46,61 \pm 6,84$ meses), mientras que los pacientes vivos se encontraban tratados por menos tiempo ($33,37 \pm 5,16$ meses).

5.4. Efecto del tiempo y el tipo de tratamiento de HD.

Dado que ya se ha demostrado que los pacientes con IRC muestran valores de daño basal y oxidativo significativamente mayores en comparación con los pacientes con IRC/NT y los controles, es interesante comprobar si el tiempo y el tipo de tratamiento sustitutivo tienen alguna influencia sobre los niveles de daño en el DNA.

Los 121 pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento convencional de hemodiálisis que fueron evaluados en nuestro estudio mostraban una variación muy amplia en el tiempo que llevaban en tratamiento sustitutivo. Separándolos en varios subgrupos, cuyos valores de daño en el DNA comparamos posteriormente, observamos que los pacientes tratados con la terapia sustitutiva por un periodo menor a un año muestran niveles de daño en el DNA significativamente menores en comparación con los pacientes tratados por un periodo superior a 2 años. Stopper et al. (2001) encuentran que los niveles de daño son mayores en los pacientes tratados con hemodiálisis en comparación con los controles y con los pacientes con IRC que no se encuentran en tratamiento sustitutivo. En su estudio, ellos también encuentran que los pacientes en HD por un periodo mayor a 120 meses (10 años) presentan niveles de daño en el DNA significativamente elevados en comparación con los pacientes tratados por menos tiempo.

Respecto al daño oxidativo que presentan estos pacientes, conforme aumenta el tiempo en tratamiento, se han encontrado las siguientes correlaciones: los valores más bajos de daño oxidativo en las pirimidinas se presentan por los pacientes que habían estado sometidos a tratamiento de HD por un periodo de entre 20-40 meses. Un aumento en el daño oxidativo en las pirimidinas se observa para los pacientes sometidos a tratamiento de HD por un periodo de entre 3 y 6 años. El daño oxidativo en las purinas muestra un valor bajo para los pacientes en tratamiento por un periodo de 20-40 meses, aunque no significativo en comparación con los pacientes en tratamiento más largo. El daño oxidativo total estudiado según el tiempo en tratamiento de HD de estos pacientes también se encuentra disminuido para el tratamiento con duración de 20-40 meses, aunque tampoco muestra diferencias significativas con los valores de daño oxidativo de los pacientes tratados por periodos más largos.

Köken y colaboradores (2004) comparan a 69 pacientes en tratamiento de HD convencional estratificados en subgrupos según el tiempo que llevaban en tratamiento de hemodiálisis. En su estudio encuentran que la concentración de PCs (proteínas carboniladas) en el plasma de los pacientes en tratamiento por menos de 24 meses se mantiene baja, mientras que los pacientes tratados por más de 2 años muestran un aumento notable. Para los grupos SH (sulfhidrilos), que actúan como antioxidantes extravasculares y se consumen en los estados de estrés oxidativo, encuentran una correlación negativa con relación al tiempo de tratamiento, es decir unos valores altos en los pacientes tratados por menos de 24 meses y una disminución gradual conforme aumentan el tiempo. Estos autores sugieren que el tiempo en tratamiento de HD puede ser un factor independiente que contribuye al estrés oxidativo y carbonilo que acompañan al estado de uremia en los pacientes en tratamiento de hemodiálisis (Köken et al., 2004).

Otro efecto asociado al tiempo en tratamiento es el observado por Boxall et al. (2006) quienes descubren una relación entre el tiempo en tratamiento y un elevado acortamiento telomérico. Esto estaría de acuerdo con los resultados de Ramirez et al. (2005), quienes observaron que los pacientes en tratamiento de HD tienen un 40% de acortamiento telomérico más, en comparación con los controles. Esta inestabilidad genómica está de acuerdo con los resultados de Roth et al. (2008) quienes evalúan el daño en 20 pacientes en tratamiento de HD mediante el ensayo de MN y encuentran una relación entre el tiempo en tratamiento y la frecuencia de MN. Así, observan frecuencias significativamente más bajas en pacientes tratados por menos de 6 años, mientras que los pacientes tratados por más de 7 años muestran frecuencias mucho más elevadas.

El efecto del tiempo en tratamiento de HD es discutible puesto que mientras que algunos estudios encuentran aumento del daño en el DNA en la terapia sustitutiva a largo plazo (Stopper et al., 1999), otros no encuentran dicha asociación (Stopper et al., 2001; Kan et al., 2002).

a) Comparación entre dos modalidades del tratamiento de hemodiálisis (HD-HD; HD-HD-OL).

Como se ha indicado anteriormente en el apartado de Introducción, las posibles técnicas de tratamiento de la insuficiencia renal terminal son la hemodiálisis, la diálisis peritoneal y el trasplante renal. Los métodos de reemplazo renal extracorpóreo son la hemodiálisis, la hemofiltración y la hemodiafiltración.

Dado que existe cierta controversia sobre las ventajas/inconvenientes de los distintos tipos de HD en nuestro trabajo hemos analizado los efectos de sustituir el tipo de HD. Los pacientes que han participado en nuestro estudio se han tratado con hemodiálisis convencional. Este tratamiento se realiza tres veces por semana y tiene una duración de tres y media-cuatro horas. Esta es la modalidad de hemodiálisis más ampliamente utilizada y la más económica. Durante el proceso, el flujo sanguíneo es de 300 mL/min y el flujo del líquido de diálisis es de 500 mL/min. Este sistema elimina bien las moléculas de pequeño tamaño pero tiene dificultades para eliminar las moléculas de mediano tamaño. En 18 de estos pacientes hemos cambiado el tratamiento convencional por un tratamiento de hemodiafiltración on-line. En este caso el flujo de líquido de diálisis es de 600 mL/min, y el filtro utilizado es de alta permeabilidad. En ambas modalidades hemos utilizado membranas sintéticas.

Para los 49 pacientes tratados con HD convencional durante su primera y segunda muestra se encontró una disminución significativa en los niveles del daño basal en el DNA entre la primera y la segunda muestra. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de daño oxidativo en purinas ni en pirimidinas, ni respecto al daño oxidativo total.

Por lo que respecta a los 18 pacientes que anteriormente se trataban con HD convencional y que pasaron a ser tratados con HDF on-line, varios estudios destacan que este tratamiento presenta algunas ventajas como puede ser una mejor eliminación de la urea, el fosfato, la β_2 -microglobulina, así como una reducción de la hipotensión y una mejora a nivel de la anemia, incluso un efecto positivo en la supervivencia de los pacientes (Ronco y Cruz, 2007; Tomo y

Shinoda, 2011; Locatelli et al., 2011). Otra ventaja atribuida a este tratamiento convectivo frente a la técnica convencional reside en la preservación de la función renal residual de los pacientes (Hyodo y Koutoku, 2011).

En los pacientes que investigamos se ha observado una disminución en el daño basal que es altamente significativa. Estos resultados confirman lo que se ha encontrado en otros estudios, que también indican haber encontrado disminución en el daño en el DNA después del cambio de HD estándar a HDF on-line, cambios significativos confirmados con el ensayo del cometa pero no con el ensayo de micronúcleos (Kobras et al., 2006; Schupp et al., 2006; Sandoval et al., 2010).

Respecto al cambio de los niveles de daño oxidativo la HDF ha mostrado en diferentes estudios que mejora el estado de estrés oxidativo de los pacientes y que también modula la micro inflamación (Calo et al., 2009). En comparación con el tratamiento de HD convencional, la HDF muestra ciertas ventajas respecto a la reducción de la peroxidación lipídica, a la concentración de AGEs, y también de productos de la glicación avanzada ligados a proteínas (Gerdemann et al., 2002; Vaslaki et al., 2006; Calò et al., 2007; Filipopoulos et al., 2008; Gonzáles-Díes et al., 2008). También, la enzima NADPH (que posiblemente está relacionada con el elevado nivel de estrés oxidativo) se encuentra menos expresada en pacientes en tratamiento con HDF (Calò et al., 2007). También se ha comprobado que los niveles de 8-oxodG medidos después de una sesión de HDF son menores en comparación con la sesión de HD convencional y asimismo la técnica HDF causa menos estrés oxidativo (Gonzáles-Díes et al., 2008; Calò et al., 2009). En los pacientes de nuestro estudio que habían cambiado de tratamiento HD convencional a HDF se ha observado una disminución significativa en el daño oxidativo tanto en las purinas como en las pirimidinas, así como en daño oxidativo total. Estas diferencias no se observaron para el daño oxidativo en el grupo de pacientes que seguía en tratamiento convencional, sugiriendo de esta manera que en la población estudiada el tratamiento convectivo muestra claramente mejores resultados frente la técnica estándar.

b) Calidad del tratamiento.

Cabe mencionar que en los últimos años el desarrollo de las técnicas de filtración de la sangre de los pacientes con IRC se asocia no sólo con la eliminación de las sustancias nocivas,^o como consecuencia de la disfunción renal, sino también con la mejora de la calidad de vida y el bienestar de estos pacientes. Es importante valorar la disminución de las manifestaciones

clínicas y de las diversas complicaciones de la patología, a la vez que se obtiene una buena depuración, tolerancia y biocompatibilidad. Esto ofrece al paciente una mejor calidad de vida y supervivencia a través de la diálisis adecuada (Gozzer et al., 2006). Por eso el parámetro Kt/V (valores normales $\geq 1,3$), que es un indicador de la adecuación de la diálisis, se estudió en los pacientes cuya evaluación fue repetida al cabo de un año. Así, la diferencia entre el Kt/V de la primera y la segunda muestra de los pacientes en tratamiento de HD convencional no había cambiado, mientras que en el caso de los pacientes que habían cambiado de tratamiento, la mejora en la segunda muestra era altamente significativa. Esto concordaría con los estudios de Maduell et al. (2002) quienes observaron un porcentaje de reducción de la osteocalcina (5,800 Da) del 4% con hemodiálisis de bajo flujo, 54% con alto flujo y un 71% con hemodiafiltración on-line (26,8 L de volumen de reinfusión). Otro compuesto como la beta(2)-microglobulina no se puede eliminar con la hemodiálisis de bajo flujo debido a su tamaño (11,800 Da), pero diferentes estudios afirman que la misma se elimina en un 62,7% y un 72,7% con la hemodiafiltración online (Kerr et al., 1992; Lornoy et al., 1998) y que disminuye significativamente en los primeros meses de tratamiento con HDF on-line (Wizemann et al., 2000). El estudio europeo DOPPS (Dialysis Outcomes and Practice Pattern Study), encuentra que los pacientes en tratamiento con HDF tienen un 35% de riesgo de mortalidad más bajo que los pacientes tratados con HD de bajo flujo (Canaud et al., 2006).

5.5. Inestabilidad genética en los pacientes con IRC en tratamiento de hemodiálisis.

La detección y reparación del daño en el DNA impide el posible desarrollo de una serie de enfermedades. Sin embargo, cuando esta reparación no es eficiente, puede conducir a la inestabilidad genómica y el desarrollo de procesos neoplásicos. La estabilidad del genoma de todos los organismos está bajo la constante amenaza de agentes tanto de origen endógeno como exógeno, que pueden modificar las propiedades del DNA. Como defensa contra estas acciones los organismos han desarrollado distintos mecanismos de reparación. La reparación por escisión de bases (BER) es la vía predominante para hacer frente a una amplia gama de lesiones resultantes de la oxidación, la alquilación y la desaminación, que modifican las bases individuales (Baute y Depicker, 2008). BER es el mecanismo predominante para la reparación de lesiones causadas por los radicales libres (Slupphaug et al., 2003).

En la práctica existen varios ensayos que permiten la detección de la capacidad de reparación de daño en el DNA. El ensayo del UDS (*Unscheduled DNA Synthesis*) mide la incorporación de la [³H] timidina en el DNA en ausencia de replicación en células tratadas con agentes genotóxicos (Lambert et al., 1979). Probablemente la manera más fácil de observar el proceso de reparación, es la evaluación del daño y la monitorización de su eliminación a lo largo del tiempo. Para realizar esto, el ensayo más ampliamente utilizado es el ensayo del cometa. Este enfoque para la observación de la cinética de reparación de roturas del DNA se ha utilizado en distintos trabajos (Jaloszynski et al., 1997; Leprat et al., 1998; Schmezer et al., 2001). En nuestro estudio sobre los niveles de reparación en pacientes con IRC se ha utilizado el ensayo de reparación *in vitro*, que permite la evaluación de la capacidad de un extracto celular incubándolo con nucleoides que llevan un daño específico (Collins, 2004).

Como se ha comentado repetidamente los pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento sustitutivo se consideran una población con elevada inestabilidad genética y alta incidencia de diferentes tipos de cáncer, inducidos por numerosos factores. Asimismo, independientemente de si los pacientes se encuentran o no en tratamiento sustitutivo, varios estudios encuentran una alta incidencia de patologías cancerosas en estos pacientes en comparación con la población general (Curtis, 1982; Maisonneuve et al., 1999; Denton et al., 2002; Peces y Garrancho, 2004; Wada et al., 2006; Khochikar, 2007).

Son distintos los estudios que asumen que los niveles de daño pueden ser el resultado de alteraciones en la capacidad de reconocer y/o eliminar las lesiones presentes en el DNA. Así, se ha observado una capacidad de reparación del daño en el DNA disminuida al igual que reducidas defensas antioxidantes (Vamvakas et al., 1998). Esto se ha observado tanto en pacientes con IRC/NT como para los que se encuentran en tratamiento sustitutivo por un periodo de tiempo considerable (Malachi et al., 1993; Vamvakas et al., 1996).

Para comprobar las diferencias significativas que se observaban entre los niveles de daño basal en el DNA dentro de nuestra población de pacientes en tratamiento de hemodiálisis convencional hemos llevado a cabo un estudio novedoso para determinar la capacidad de reparación por escisión de bases. Para evitar el sesgo que pudieran suponer las diferencias de edad en la capacidad de reparar, se incluyeron sólo pacientes con edades similares y la proporción hombres-mujeres se mantuvo equilibrada. Dado que en la bibliografía se muestra que los pacientes con cáncer presentan una disminuida capacidad de reparar el daño en el

DNA (Abrahams et al., 1998; Rusin et al., 2009), en nuestro estudio de reparación excluimos a los pacientes que padecían cáncer.

Los resultados del ensayo de reparación han mostrado que los pacientes que llevaban poco tiempo en tratamiento tenían la capacidad de reparación del daño en el DNA mucho más alta, en comparación con los pacientes de daño alto y tratamiento sustitutivo más largo. Así, nuestro estudio muestra que los pacientes que llevan más tiempo en tratamiento sustitutivo tienen niveles de daño basal más altos y una capacidad de reparación significativamente reducida. Para estos pacientes se ha encontrado que los sometidos a tratamiento por más de 3 años tienen la capacidad de reparar daño en el DNA significativamente reducida. En su estudio, Vamvakas y colaboradores (1996), encontraron que al iniciar el tratamiento de hemodiálisis observaban una tendencia a aumentar la capacidad de reparación que, transcurrido un cierto tiempo llega a reducirse significativamente; de esta manera estos autores sugieren que existe una relación entre el periodo de tratamiento y la capacidad de reparación.

Los cambios en la capacidad de reparación BER se han estudiado en varios experimentos. La evaluación de los niveles y la cinética de sitios AP, después de inducir daño en el DNA, muestra que tanto fibroblastos humanos senescentes como linfocitos aislados de donantes mayores, presentan un elevado nivel de sitios AP, en comparación con lo que se observa en células jóvenes (Atamna et al., 2000). De la misma manera, después del tratamiento con MMS y con H₂O₂, los niveles de sitios AP aumentan rápidamente en las células jóvenes, sugiriendo una deficiencia en la actividad de la DNA glicosilasa. Por otro lado, Goukassian et al. (2000) encuentran una disminución significativa en la capacidad de reparar dímeros de timina y fotoproductos con la edad de los pacientes. Sin embargo, aunque éste y otros estudios han encontrado relación entre la edad y la capacidad de reparar en nuestro estudio no hemos encontrado correlación entre la edad de los pacientes y su capacidad de reparar.

Respecto a las diferencias en la capacidad de reparar dependiendo del género se encuentran resultados contradictorios en la literatura. Así, mientras Collier et al. (2005) encuentran que la reparación incompleta por escisión de bases aumenta significativamente de manera dosis-dependiente con la exposición al humo de tabaco en los hombres, Janssen et al. (2001) no encuentran diferencias entre la actividad de la OGG1, enzima involucrada en la reparación BER, entre los linfocitos de hombres y de mujeres. De la misma manera tampoco se han encontrado diferencias en la capacidad de reparar según el género en el estudio de Muller et al. (2002). En nuestro estudio observamos que, dentro del grupo de pacientes de daño alto, cuya

reparación resultó estar reducida, se encontró que los hombres tenían la capacidad de reparación significativamente más baja que la capacidad de reparación de las mujeres del mismo grupo. Este es un resultado interesante dados los pocos estudios que incluyen el efecto del género como factor modulador de la capacidad reparadora.

Así, como resumen de este trabajo en la población estudiada se confirma que los niveles de daño basal y daño oxidativo en el DNA de los pacientes con IRC aumenta con el desarrollo de la patología siendo mayor en comparación con los controles. Otro aspecto destacable es que la modalidad del tratamiento de hemodiálisis también se encuentra relacionada con los niveles de daño observados en este estudio. Finalmente nuestro estudio indica la presencia de elevada mortalidad y reducida capacidad de reparar lesiones en el DNA en los pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Después del análisis de los datos obtenidos en este estudio, en respuesta a los objetivos propuestos, y tras la discusión de los resultados se puede concluir lo siguiente:

1. El daño genético medido en la población de pacientes con insuficiencia renal crónica se encuentra significativamente elevado en comparación con el de la población control.

2. El daño basal en el DNA aumenta con la evolución de la enfermedad renal, relacionándose de forma negativa con los valores del filtrado glomerular y siendo mayor en los estadios 5 y en los pacientes en tratamiento de hemodiálisis. Los valores de creatinina como un buen indicador de la función renal, se encuentran también relacionados con los niveles de daño en el DNA de los pacientes con IRC.

3. Los niveles de daño oxidativo observados en los pacientes en tratamiento de HD son significativamente mayores que los observados en los controles y en los pacientes IRC/ND. Dado que no se observan diferencias entre los distintos estadios de IRC/ND se sugiere que el tratamiento sustitutivo está implicado en el aumento del daño oxidativo.

4. De los suplementos que recibe la población estudiada, la vitamina B₁₂ resultó estar asociada con la presencia de niveles más bajos de daño en el DNA en los pacientes IRC/NT. Asimismo, el tratamiento con IECA/ARA-2 disminuye el daño oxidativo.

5. La elevada tasa de mortalidad en los pacientes IRC sometidos a tratamiento de HD está relacionada con la avanzada edad de los pacientes, con los niveles de la proteína C reactiva como marcador de inflamación, con el tiempo en tratamiento sustitutivo y con la presencia de elevados niveles de daño basal y oxidativo en el DNA.

6. El daño basal es más bajo en los pacientes sometidos a HD por menos de un año, respecto a los que llevan más de 3 años en tratamiento sustitutivo.

7. El cambio de la HD convencional a la HDF on-line redujo significativamente los niveles de daño oxidativo (en purinas, las pirimidinas y a nivel del daño oxidativo total), mientras que esta reducción no se ha observado en los pacientes que han continuado sometidos a tratamiento convencional.

8. El daño basal en el DNA no parece verse afectado por las patologías presentes en los pacientes con IRC (como el cáncer, las patologías cardiovasculares, la dislipemia, etc.). Sin embargo, los niveles de daño oxidativo se han encontrado significativamente altos en los pacientes en HD que padecían diabetes mellitus.

9. Se ha encontrado que las diferencias en los niveles de daño observado entre los pacientes sometidos a tratamiento de HD están relacionadas con su capacidad de reparar el daño presente en el DNA. Asimismo, se observa una asociación significativa entre tiempo en HD, nivel de daño y nivel de reparación.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams P.J., Houweling A., Cornelissen-Steijger P.D., Jaspers N.G., Darroudi F., Meijers C.M., Mullenders L.H., Filon R., Arwert F., Pinedo H.M., Natarajan A.P., Terleth C., Van Zeeland A.A., van der Eb A.J. (1998). Impaired DNA repair capacity in skin fibroblasts from various hereditary cancer-prone syndromes. *Mutat. Res.*, 407(2): 189-201.
- Akmal M. (2001). Hemodialysis in diabetic patients. *Am. J. Kidney. Dis.*, 38 (4 Suppl 1): S195-199.
- Alapetite C., Benoit, A., Moustacchi, E., Sarasin, A. (1997). The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *J. Invest. Dermatol.*, 108(2): 154-159.
- Alati T., Eckl P., Jirtle R.L. (1989). An *in vitro* micronucleus assay for determining the radiosensitivity of hepatocytes. *Radiat. Res.*, 119(3): 562-568.
- Altintas N.D., Aybar Turkoglu M., Bozkurt B., Iskit A.T., Karakaya G., Kalyoncu A.F. 2009. Successful heparin desensitization after anaphylactic shock due to heparin. *Tuberk. Toraks.*, 57(1): 68-72.
- Amenabar J.J., García-López F., Robles N.R., Saracho R. (2000). Report on dialysis and transplantation of the Spanish Society of Nephrology for 1998. *Nefrología*, 20(6): 34-42.
- Anderson D., Wei Yu T., McGregor D.B. (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, 13(6): 539-555.
- Andrés A. (2010). Indications and contraindications for living kidney donations. *Nefrología*, 30 (2): 30-38.
- Annuk M., Fellstrom B., Akerblom O., Zilmer K., Vihalemm T., Zilmer M. (2001). Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin. Nephrol.*, 56(4): 308-314.

- Armada E., Pérez Melón C., Otero A., Gayoso P., Rodríguez M., Morcillo E., J. (2001). Effect of folic acid supplementation on total homocysteine levels in hemodialysis patients. *Nefrología*, 21(2): 167-173.
- Aronson D., Rayfield E.J. (2002). How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc. Diabetol.*, 1:1.
- Ash S.R. (2008). Advances in tunneled central venous catheters for dialysis: Design and Performance. *Semin. Dial.*, 21(6): 504–515.
- Atamna H., Cheung I., Ames B.N. (2000). A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(2): 686-691.
- Atanasiu V., Stoian I., Capusa C., Mircescu G., Maracine M., Lupescu O., Virgolici B., Muscurel C., Manolescu B. (2006). Oxidative stress parameters in hemodialysis patients with or without diabetes. *Rom. J. Intern. Med.*, 44(4): 433-442.
- Azqueta A., Lorenzo Y., Collins A.R. (2009). *In vitro* comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. *Mutagenesis*, 24(4): 379-381.
- 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(2): 111-115.
- Barroso S., Martínez J.M., Martín M.V., Rayo I., Caravaca F. (2006). Accuracy of indirect estimates of renal function in advanced chronic renal failure patients. *Nefrología*, 26(3): 344-350.
- Batló A.S., Batló J.S. (2001). *Semiología médica y técnica exploratoria*. Elsevier Masson. 8ª edición; capítulo 5: 568-574.
- Baute J., Depicker A. (2008). Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 43(4): 239-276.
- Berkun Y., Haviv Y.S., Schwartz L.B., Shalit M. (2004). Heparin-induced recurrent anaphylaxis. *Clin. Exp. Allergy.*, 34(12): 1916-1918.

- Bermúdez R.M., García S.G., Surribas D.P., Castela A.M., Sanjuán J.B. (2011). Documento de Consenso: Recomendaciones sobre la valoración de la proteinuria en el diagnóstico y seguimiento de la Enfermedad Renal Crónica. SEQC y S.E.N, 20-33.
- Berndt S.I., Huang, W.Y., Fallin M.D., Helzlsouer K.J., Platz E.A., Weissfeld J.L., Church, T.R., Welch R., Chanock S.J., Hayes R.B. (2007). Genetic variation in base excision repair genes and the prevalence of advanced colorectal adenoma. *Cancer Res.*, 67(3): 1395-1404.
- Bianchi R., Mariani G., Toni M.G., Carmassi F. (1978). The metabolism of human serum albumin in renal failure on conservative and dialysis therapy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31(9): 1615-1626.
- Blasiak J., Arabski M., Krupa R., Wozniak K., Zadrozny M., Kasznicki J., Zurawska M., Drzewoski J. (2004). DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat. Res.*, 554(1-2): 297-304.
- Bohlender J.M., Franke S., Stein G., Wolf G. (2005). Advanced glycation end products and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 289(4): F645-F659.
- Borrego-Utiel F.J., Barrio P.P., Bañasco V.P., Perales M.C.S, Cortés M.J.G., Liébana A., Borrego-Hinojosa J., Serrano P., Marcos S.G. (1996). Catéteres femorales como acceso vascular para hemodiálisis crónica en pacientes ambulatorios. *Nefrología*, 16(5): 432-438.
- Boxall M.C., Goodship T.H., Brown A.L., Ward M.C., von Zglinicki T. (2006). Telomere shortening and haemodialysis. *Blood Purif.*, 24(2): 185-189.
- Böyum A. (1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 97:7.
- Bradley E.L. (1987). Long-term results of pancreatojejunostomy in patients with chronic pancreatitis. *Am. J. Surg.*, 153(2): 207-213.
- Buargub M.A. (2008). 5-year mortality in hemodialysis patients: a single center study in Tripoli. *Saudi. J. Kidney. Dis. Transpl.*, 19(2): 268-273.

- Buemi M., Floccari F., Costa C., Caccamo C., Belghity N., Campo S., Pernice F., Bonvissuto G., Coppolino G., Barilla A., Criseo M., Crasci 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(5-6): 569-574.
- Burden A.C., McNally P.G., Feehally J., Walls J. (1992). Increased incidence of end-stage renal failure secondary to diabetes mellitus in Asian ethnic groups in the United Kingdom. *Diabet. Med.*, 9(7): 641-645.
- Cabrera S.S. (2004). Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 24 (6), Capítulo 2: 27-35.
- Cakir B., Kirbas I., Cevik B., Ulu E.M., Bayrak A., Coskun M. (2008). Complications of continuous ambulatory peritoneal dialysis: evaluation with CT. *Diagn. Interv. Radiol.*, 14(4): 212-220.
- Calò L.A., Naso A., Carraro G., Wratten M.L., Pagnin E., Bertipaglia L., Rebeschini M., Davis P.A., Piccoli A., Cascone C. (2007). Effect of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate on oxidative stress in dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 22(5): 1413-1419.
- Calò L.A., Naso A., Davis P.A. (2009). Hemodiafiltration and oxidative stress in dialysis patients. *Blood. Purif.*, 28(1): 59-60.
- Calò L.A., Naso A., Davis P.A., Pagnin E., Corradini R., Tommasi A., Sereni L., Ragazzi E. (2011). Hemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate: effect on heme-oxygenase-1 and inducible subunit of nitric oxide synthase and implication for oxidative stress and inflammation. *Artif. Organs.*, 35(2): 183-187.
- Cameron J.S. (1999). Lupus Nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10(2): 413-424.
- Canaud B., Bragg-Gresham J.L., Marshall M.R., Desmeules S., Gillespie B.W., Depner T., Klassen P., Port F.K. (2006). Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS. *Kidney. Int.*, 69(11): 2087-2093.

- Cederberg H., Henriksson J., Binderup M.L. (2010). DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. *Mutagenesis*, 25(2): 133-138.
- Cengiz K. (2002). Increased incidence of neoplasia in chronic renal failure (20-year experience). *Int. Urol. Nephrol.*, 33(1): 121-126.
- 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(1): 55-67.
- Chauveau P., Chadefaux B., Coude M., Aupetit J., Kamoun P., Jungers P. (1996). Long-term folic acid (but not pyridoxine) supplementation lowers elevated plasma homocysteine level in chronic renal failure. *Miner. Electrolyte. Metab.*, 22(1-3): 106-109.
- Claeys R., Vinken S., Spapen H., ver Elst K., Decochez K., Huyghens L., Gorus F. K. (2002). Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock: clinical and biological correlates. *Crit. Care. Med.*, 30(4): 757-762.
- Cockcroft D.W., Gault M.H. (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16(1): 31-41.
- Collier A.C., Dandge S.D., Woodrow J.E., Pritsos C.A. (2005). Differences in DNA-damage in non-smoking men and women exposed to environmental tobacco smoke (ETS). *Toxicol. Lett.*, 158(1): 10-19.
- Collins A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 26(3): 249-261.
- Collins A.R., Dusinská M., Gedik C.M., Stětina R. (1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health. Perspect.*, 104(3): 465-469.
- Collins A.R., Dusinska M., Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Raslova K., Vaughan N. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30(2): 139-146.

- Collins A.R., Dusinska M., Horvathova E., Munro E., Savio M., Stetina R. (2001). Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis*, 16(4): 297-301.
- Collins A.J., Li S., Ma J.Z., Herzog C. (2001). Cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Am. J. Kidney. Dis.*, 38(4 Suppl 1): S26-29.
- Connor J.T. (1989). The artificial kidney in North America: George Murray and the Canadian connection. *Biomed. Instrum. Technol.*, 23(5): 384-387.
- Coresh J., Selvin E., Stevens L.A., Manzi J., Kusek J.W., Eggers, P., Van Lente, F., Levey, A. S. (2007). Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*, 298(17): 2038-2047.
- Curtis J.R. (1982). Cancer and patients with end-stage renal failure. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, 284(6309): 69-70.
- Daugirdas J.T., Blake P.G., Todd S. (2000). Manual de diálisis. 3ª edición. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Chapter 3, Hemodialysis Apparatus: 32-33.
- De Boeck M., Touil N., De Visscher G., Vande P.A., Kirsch-Volders M. (2000). Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutat. Res.*, 469(2): 181-197.
- de Cavanagh E.M., Ferder L., Carrasquedo F., Scrivo D., Wassermann A., Fraga C.G., Inserra F. (1999). Higher levels of antioxidant defenses in enalapril-treated versus non-enalapril-treated hemodialysis patients. *Am. J. Kidney. Dis.*, 34(3): 445-455.
- de Cavanagh E.M., Inserra F., Toblli J., Stella I., Fraga C.G., Ferder L. (2001). Enalapril attenuates oxidative stress in diabetic rats. *Hypertension*, 38(5): 1130-1136.
- Degenhardt T.P., Grass L., Reddy S., Thorpe S.R., Diamandis E.P., Baynes J.W. (1997). Technical note. The serum concentration of the advanced glycation end-product N epsilon- (carboxymethyl) lysine is increased in uremia. *Kidney. Int.*, 52(4): 1064-1067.

- Delgado Y.P., Molina Y.S., Augier M.M., Sánchez L.V., López E.L. (2006). Supervivencia y complicaciones de los catéteres para hemodiálisis: nuestra experiencia. *Rev. Cubana. Cir.*, 45(3-4).
- Denton M.D., Magee C.C., Ovuworie C., Mauiyyedi S., Pascual M., Colvin R.B., Cosimi A.B., Tolkoff-Rubin N. (2002). Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: a pathologic analysis. *Kidney. Int.*, 61(6): 2201-2219.
- Derakhshanfar A., Gholyaf M., Niayesh A., Bahiraii S. (2009). Assessment of frequency of complications of arterio venous fistula in patients on dialysis: a two-year single center study from Iran. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.*, 20(5): 872-875.
- Descamps-Latscha B., Druke T., Witko-Sarsat V. (2001). Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin. Dial.*, 14(3): 193-199.
- Dhingra R., Gaziano J.M., Djousse L. (2011). Chronic kidney disease and the risk of heart failure in men. *Circ. Heart. Fail.*, 4(2): 138-144.
- Dirkes S. (2011). Acute kidney injury: not just acute renal failure anymore? *Crit. Care. Nurse.*, 31(1): 37-50.
- Domínguez E., Peláez E., Gándara A., Pereira A. (1999). Supervivencia de las fístulas arteriovenosas para hemodiálisis. Factores pronósticos. *Nefrología*, 9(2): 143-146.
- Domínguez-Gil B., Pascual J. (2008). Living donor renal transplant in Spain: a great opportunity. *Nefrología*, 28(2): 143-147.
- Dorland (2005). *Diccionario enciclopédico ilustrado de Medicina*. Edición 3, Madrid, Salinders-Elsevier; pp 70.
- Dounousi E., Papavasiliou E., Makedou A., Ioannou K., Katopodis K.P., Tselepis A., Siamopoulos K.C., Tsakiris D. (2006). Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am. J. Kidney. Dis.*, 48(5): 752-760.
- Dursun E., Dursun B., Suleymanlar G., Ozben T. (2005a). Effect of haemodialysis on the oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. *Acta. Diabetol.*, 42(3): 123-128.

- Dursun E., Timur M., Dursun B., Suleymanlar G., Ozben T. (2005b). Protein oxidation in Type 2 diabetic patients on hemodialysis. *J. Diabetes. Complications.*, 19(3): 142-146.
- Dusinska M., Collins A.R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3): 191-205.
- Edwards M.S., Craven T.E., Burke G.L., Dean R.H., Hansen K.J. (2005). Renovascular disease and the risk of adverse coronary events in the elderly: a prospective, population-based study. *Arch. Intern. Med.*, 165(2): 207-213.
- Elsharif M.E. (2011). Mortality rate of patients with end stage renal disease on regular hemodialysis: A single center study. *Saudi J. Kidney. Dis. Transpl.*, 22(3): 594-596.
- El-Zein R.A., Monroy C.M., Cortes A., Spitz M.R., Greisinger A., Etzel C.J. (2010). Rapid method for determination of DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes amongst smokers. *BMC Cancer*, 10: 439.
- Evans A.R., Limp-Foster M., Kelley M.R. (2000). Going APE over ref-1. *Mutat. Res.*, 461(2): 83-108.
- Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339(1): 37-59.
- Fang W., Oreopoulos D.G., Bargman J.M. (2008). Use of ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers and survival in patients on peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 23(11): 3704-3710.
- Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R.H., Mann M., Mersch-Sundermann V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 566(3): 209-229.
- Fenech M. (2001). The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat. Res.*, 475(1-2): 57-67.
- Fenech M., Aitken C., Rinaldi J. (1998). Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis*, 19(7): 1163-1171.

- Ferretti G., Bacchetti T., Masciangelo S., Pallotta G. (2008). Lipid peroxidation in hemodialysis patients: effect of vitamin C supplementation. *Clin. Biochem.*, 41(6): 381-386.
- Filiopoulos V., Hadjiyannakos D., Metaxaki P., Sideris V., Takouli L., Anogiati A., Vlassopoulos D. (2008). Inflammation and oxidative stress in patients on hemodiafiltration. *Am. J. Nephrol.*, 28(6): 949-957.
- Fragedaki E., Nebel M., Schupp N., Sebekova K., Volkel 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(9): 1936-1943.
- Friedlander M.A., Wu Y.C., Schulak J.A., Monnier V.M., Hricik D.E. (1995). Influence of dialysis modality on plasma and tissue concentrations of pentosidine in patients with end-stage renal disease. *Am. J. Kidney. Dis.*, 25(3): 445-451.
- Friedlander M.A., Wu Y.C., Elgawish A., Monnier V.M. (1996). Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis. *J. Clin. Invest.*, 97(3): 728-735.
- Frutos M.A., Cabello M. (2010). Patient information: what type and when should it be provided? *Nefrología*, 30(2): 39-46.
- Galle J. (2001). Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16(11): 2135-2137.
- García-Cortés M.J., Viedma G., Sánchez Perales M.C., Borrego F.J., Borrego J., Pérez del Barrio P., Gil Cunquero J. M., Liebana A., Pérez Banasco V. (2005). Fistulae or catheter for elderly who start hemodialysis without permanent vascular access? *Nefrología*, 25(3): 307-314.
- García-Conde J., Sánchez J.M., Macías J.G. (2003). *Patología general, Semiología clínica y fisiopatología*, Madrid, McGraw-Hill/ Interamericana De España, S.A., 2ª edición, capítulo 59, Insuficiencia renal crónica: 511-519.

- Gedik C.M., Ewen S.W., Collins A.R. (1992). Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62(3): 313-320.
- Gerdemann A., Wagner Z., Solf A., Bahner U., Heidland A., Vienken J., Schinzel R. (2002). Plasma levels of advanced glycation end products during haemodialysis, haemodiafiltration and haemofiltration: potential importance of dialysate quality. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 17(6): 1045-9.
- Gómez Dos Santos V., Burgos F.J. (2005). Litiasis en el origen de insuficiencia renal crónica. *Nefrología*, 25(4): 82-88.
- Gómez J.M.L., (2008). Avances en hemodiálisis clínica: accesos vasculares y pacientes de edad avanzada. *Nefrología*, 28(5): 67-70.
- Gómez-Pavón J., Gálvez Barrón C., Baztán Cortés J.J., Ruipérez Cantera I. (2010). Comparison of equations to estimate the glomerular filtration in people aged 75 or older without known renal disease. *Med. Clin. (Barc.)*, 134(8): 346-349.
- González-Díez B., Cavia M., Torres G., Abaigar P., Muniz P. (2008). Effect of a hemodiafiltration session with on-line regeneration of the ultrafiltrate on oxidative stress. Comparative study with conventional hemodialysis with polysulfone. *Blood Purif.*, 26(6): 505–510.
- Goodkin D.A., Bragg-Gresham J.L., Koenig K.G., Wolfe R.A., Akiba T., Andreucci V.E., Saito A., Rayner H.C., Kurokawa K., Port F.K., Held P.J., Young E.W. (2003). Association of comorbid conditions and mortality in hemodialysis patients in Europe, Japan, and the United States: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14(12): 3270-3277.
- Goukassian D., Gad F., Yaar M., Eller M.S., Nehal U.S., Gilchrest B.A. (2000). Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J.*, 14(10): 1325-1334.
- Gozzer P.A., Rosas M.L.C., Domínguez L.M. (2006). Manejo de indicadores de KtV y la calidad de Hemodiálisis en los pacientes. *Rev. Ciencias Salud*, 1(1): 92-96.

- Gruss E., Portolés J., Jiménez P., Hernández T., Rueda J.A., Cerro Lasala J.M., Tato A., Gago M.C., Martínez S., Velayo P. (2006). Prospective monitoring of vascular access in hemodialysis by means of a multidisciplinary team. *Nefrología*, 26(6): 703-710.
- Guerra C. (1997). Oxidantes-antioxidantes en reumatología. *Rev. Perú Reum.*, 3(1): 35-40.
- Guerra J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos Antioxidantes. *An. Med. Interna (Madrid)*, 18(6): 326-335.
- Haghdoost S., Czene S., Naslund I., Skog S., Harms-Ringdahl, M. (2005). Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress *in vivo* and *in vitro*. *Free Radic. Res.*, 39(2): 153-162.
- Halazonetis T.D., Gorgoulis V.G., Jiri Bartek J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 319 (5868): 1352-1355.
- Halliwell B., Glutteridge J.M.C. (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Oxford. Oxygen is poisonous-an introduction to oxygen toxicity and freeradicals. 2 edition: 1-20.
- Harris S.A. Brown E.A. (1998). Patients surviving more than 10 years on haemodialysis. The natural history of the complications of treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 13(5): 1226-1233.
- Harrison D., Griendling K.K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, 91(3A): 7A-11A.
- Hart J.R., Glebov O., Ernst R.J., Kirsch I.R., Barton J.K. (2006). DNA mismatch-specific targeting and hypersensitivity of mismatch-repair-deficient cells to bulky rhodium (III) intercalators. *PNAS.*, 103(42): 15359-15363.
- Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, Grünert-Fuchs M, Speit G. (1994). Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis*, 9(3): 269-272.
- Hartmann A., Plappert U., Poetter F., Suter W. (2003). Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res.*, 536(1-2): 27-38.

- Harvey J.N. (2003). Trends in the prevalence of diabetic nephropathy in type 1 and type 2 diabetes. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 12(3): 317-322.
- Haubitz M., Brunkhorst R., Wrenger E., Froese P., Schulze M., Koch K.M. (1996). Chronic induction of C-reactive protein by hemodialysis, but not by peritoneal dialysis therapy. *Perit. Dial. Int.*, 16(2): 158-162.
- Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell. Res.*, 18(1): 27-47.
- Held P.J., Brunner F., Odaka M., Garcia J.R., Port F.K., Gaylin, D. S. (1990). Five-year survival for end-stage renal disease patients in the United States, Europe, and Japan, 1982 to 1987. *Am. J. Kidney. Dis.*, 15(5): 451-457.
- Hellman B., Vaghef H., Boström B. (1995). The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res. /DNA Repair*, 336(2): 123-131.
- Hellman B., Vaghef H., Friis L., Edling C. (1997). Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 69(3): 185-192.
- 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(3): c188-193.
- Himmelfarb J., Hakim R.M. (2003). Oxidative stress in uremia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 12(6): 593-598.
- Holden R.M., Harman, G.J., Wang M., Holland, D., Day A.G. (2008). Major bleeding in hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 3(1): 105-110.
- Honda H., Qureshi A.R., Heimbürger O., Barany P., Wang K., Pecoits-Filho R., Stenvinkel P., Lindholm B. (2006). Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am. J. Kidney. Dis.*, 47(1): 139-148.

- Horvathova E., Slamenova D., Hlincikova L., Mandal T.K., Gabelova A., Collins A.R. (1998). The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutat. Res.*, 409(3): 163-171.
- Hung R.J., Hall J., Brennan P., Boffetta P. (2005). Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a huge review. *Am. J. Epidemiol.*, 162(10): 925-942.
- Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C. (2001). Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer*, 34 (2): S7-15.
- Hyodo T. Koutoku N. (2011). Preservation of residual renal function with HDF. *Contrib. Nephrol.*, 168: 204-212.
- Jackson A.L., Loeb L.A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.*, 477(1-2): 7-21.
- Jaloszynski P., Kujawski M., Czub-Swierczek M., Markowska J., Szyfter K. (1997). Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutat. Res.*, 385(3): 223-233.
- Janssen K., Schlink K., Gotte W., Hippler B., Kaina B., Oesch, F. (2001). DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat. Res.*, 486(3): 207-216.
- Janssen M.J., Van der Meulen J. (1996). The bleeding risk in chronic haemodialysis: preventive strategies in high-risk patients. *Neth. J. Med.*, 48(5): 198-207.
- Johnstone E.C, Lind M.J., Griffin M.J., Boddy A.V. (2000). Ifosfamide metabolism and DNA damage in tumour and peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients. *Cancer Chemoth. Pharm.*, 46(6): 433-441.
- 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(1-2): 151-159.

- Kanda T. Takahashi T. (2004). Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn. Heart. J.*, 45(2): 183-193.
- Karaman A., Keskinler F. (2009). Genomic damage in patients with chronic renal failure. *Turkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 29(6): 1392-1397.
- Kazimirova A., Barancokova M., Krajcovicova-Kudlackova M., Volkovova K., Staruchova M., Valachovicova M., Paukova V., Blazicek P., Wsolova L., Dusinska M. (2006). The relationship between micronuclei in human lymphocytes and selected micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. *Mutat. Res.*, 611(1-2): 64-70.
- KDOQI - Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease. (2002). Evaluation, classification and stratification. Part 5. Evaluation of laboratory measurements for clinical assessment of kidney disease. Guideline 4. Estimation of GFR.
- Kerr P.B., Argiles A., Flavier J.L., Canaud B., Mion C.M. (1992). Comparison of hemodialysis and hemodiafiltration: a long-term longitudinal study. *Kidn. Int.*, 41(4): 1035-1040.
- Khochikar M.V. (2007). Is incidence of prostate cancer higher in patients with end stage renal disease? *Indian. J. Urol.*, 23(1): 82.
- Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnstrom G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, 363(2): 89-96.
- 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.*, 29(1): 10-17.
- Koken T., Serteser M., Kahraman A., Gokce C., Demir S. (2004). Changes in serum markers of oxidative stress with varying periods of haemodialysis. *Nephrology (Carlton)*, 9(2): 77-82.
- Kolagal V., Karanam S.A., Dharmavarapu P.K., D'Souza R., Upadhya S., Kumar V., Kedage V., Muttigi M.S., Shetty J.K., Prakash M. (2009). Determination of oxidative stress markers and their importance in early diagnosis of uremia-related complications. *Indian. J. Nephrol.*, 19(1): 8-12.

- Kopjar N., Garaj-Vrhovac V., Milas I. (2002). Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratog. Carcinog. and Mutag.*, 22(1): 13-30.
- Koschack J., Hoschel K., Irle E. (2003). Differential impairments of facial affect priming in subjects with acute or partially remitted major depressive episodes. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 191(3): 175-181.
- Kregel K.C., Zhang H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292(1): R18-36.
- Krokan H.E., Standal R., Slupphaug G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem. J.*, 325 (Pt 1): 1-16.
- Kuan Y., Hossain M., Surman J., El Nahas A.M., Haylor J. (2005). GFR prediction using the MDRD and Cockcroft and Gault equations in patients with end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20(11): 2394-2401.
- Lambert B., Ringborg U., Skoog L. (1979). Age-related decrease of ultraviolet light-induced DNA repair synthesis in human peripheral leukocytes. *Cancer. Res.*, 39(7 Pt 1): 2792-2795.
- Leprat F., Alapetite C., Rosselli F., Ridet A., Schlumberger M., Sarasin A., Suarez H.G., Moustacchi E. (1998). Impaired DNA repair as assessed by the "comet" assay in patients with thyroid tumors after a history of radiation therapy: a preliminary study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 40(5): 1019-1026.
- Li Z., Su B.H., Mi X.H., Liu X.R., Fan J.M. (2006). Inflammation, oxidative stress and carbonyl stress in uremic patients. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, 37(1): 123-125.
- Lialiaris T., Mavromatidou P., Digkas E., Passadaki T., Mpountoukas P., Panagoutsos S., Vargemezis V. (2010). Chromosome instability in patients with chronic renal failure. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.*, 14(1): 37-41.

- Lim P.S., Ma Y.S., Cheng Y.M., Chai H., Lee, C.F., Chen T.L., Wei, Y.H. (2002). Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in skeletal muscle of patients with chronic uremia. *J. Biomed. Sci.*, 9(6 Pt 1): 549-560.
- 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(3): 561-565.
- Locatelli F., Manzoni C., Del Vecchio L., Di Filippo S., Pontoriero, G., Cavalli A. (2011). Management of anemia by convective treatments. *Contrib. Nephrol.*, 168: 162-172.
- London G.M., Guerin A.P., Marchais S.J., Metivier F., Pannier B., Adda H. (2003). Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 18(9): 1731-1740.
- Lornoy W., Beacus I., Billiouw J.M., Sierens L., van Malderen P. (1998). Remarkable removal of beta-2-microglobulin by on-line hemodiafiltration. *Am.J. Nephrol.*, 18(2): 105-108.
- Luño J. (2002). Efecto del tratamiento combinado con IECAs y ARAs sobre la proteinuria y función renal en pacientes con glomerulonefritis crónica. *Nefrología*, 22(2):41-43.
- Maccarrone M., Ullrich V. (2004). Redox regulation in disease and ageing. *Cell Death Differ.* 11(8): 949-951.
- Madhan K. (2004). The epidemic of elderly patients with dialysis-requiring end-stage renal disease in New Zealand. *N. Z. Med. J.*, 117(1195): 1-7.
- Maduell F, Navarro V, Cruz MC, Torregrosa E, García D, Simón V, Ferrero JA. (2002). Osteocalcin and myoglobin removal in on-line hemodiafiltration versus low and high-flux hemodialysis. *Am. J. Kidney. Dis.*, 40(3): 582-589.

- Maduell F., Pozo C., García H., Sánchez L., Hdez-Jaras J., Albero M.D., Calvo C., Torregrosa I., Navarro V. (1999). Change from conventional haemodiafiltration to on-line haemodiafiltration. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 14(5): 1202-1207.
- Maggiore U., Cristol J.P., Canaud B., Dupuy A.M., Formica M., Pozzato M., Panichi V., Consani C., Metelli M.R., Sereni L., De Nitti C., David S., Tetta C. (2005). Comparison of 3 automated assays for C-reactive protein in end-stage renal disease: clinical and epidemiological implications. *J. Lab. Clin. Med.*, 145(6): 305-308.
- Mahrous H.S. (2009). Effects of age, gender, folate and vitamin B12 status on DNA damage. *Bull. Alex. Fac. Med.*, 45(1): 195-200.
- Maisonneuve P., Agodoa L., Gellert R., Stewart J.H., Bucciante 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(9173): 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(2): 385-389.
- Manda G., Nechifor M.T., Neagu T.M. (2009). Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Current Chem. Biol.*, 3(1): 342-366.
- Mann S.J. Pickering T.G. (1992). Detection of renovascular hypertension. State of the art: 1992. *Ann. Intern. Med.*, 117(10): 845-853.
- Marnett L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3): 361-370.
- Martín R., Sánchez M., (2006). Procedimientos Nefro-Urológicos: *Nature Clinical Practice Nephrology IX*, 143.
- McCarthy P.J., Sweetman, S.F., McKenna, P.G., and McKelvey-Martin, V. J. (1997). Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 12(4): 209-214.

- McDonald S., Russ G. (2002). New patients. Anzdata Registry Report. Australia and New Zealand dialysis and transplant registry. Adelaide, South Australia. Editors: Stephen P McDonald and Graeme Russ. 8-13.
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P., Collins R.A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.*, 288(1): 47-63.
- McKenna D.J., McKeown S.R., McKelvey-Martin V.J. (2008). Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*, 23(3): 183-190.
- Meerwaldt R., Zeebregts C.J., Navis G., Hillebrands J.L., Lefrandt J.D., Smit A.J. (2009). Accumulation of advanced glycation end products and chronic complications in ESRD treated by dialysis. *Am. J. Kidney. Dis.*, 53(1): 138-150.
- Milic M., Rozgaj R., Kasuba V., Orescanin V., Balijsa M., Jukic I. (2010). Correlation between folate and vitamin B and markers of DNA stability in healthy men: preliminary results. *Acta. Biochim. Pol.*, 57(3): 339-345.
- Mitra S., Boldogh I., Izumi T., Hazra T.K. (2001). Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.*, 38(2-3): 180-190.
- Miyamae Y., Iwasaki K., Kinae N., Tsuda S., Murakami M., Tanaka M., Sasaki Y.F. (1997a). Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat. Res.*, 393(1-2): 107-113.
- Miyamae Y., Zaizen K., Ohara K., Mine Y., Sasaki Y. F. (1997b). Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat. Res.*, 393(1-2): 99-106.
- Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Y. F., Kobayashi, H., Igarashi-Soga, M., Shimoi, K., Hayashi, M. (1998). Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutat. Res.*, 418(2-3): 131-140.

- Miyata T., van Ypersele de Strihou 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(2): 389-399.
- Miyata T., Kurokawa K., van Ypersele de Strihou C. (2000). Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney. Int.*, 58(76): S120-125.
- Miyazaki H., Matsuoka H., Itabe H., Usui M., Ueda S., Okuda S., Imaizumi T. (2000). Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin E-coated dialyzer. *Circulation*, 101(9): 1002-1006.
- MMWR Recomm.Rep. (2001). 50(RR-5): 1-43.
- Modlinger P.S., Wilcox C.S., Aslam S. (2004). Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin. Nephrol.*, 24(4): 354-365.
- Molina F.T., Rodríguez C.R. (2008). Indicaciones para el inicio de técnicas de depuración extrarrenal. *Nefrología, Guías S.E.N. Supl. 3*, 101-104.
- Molina M.C.R. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Rev. Quim. Viva*, 2(1): 17-28.
- Møller P., Knudsen L.E., Loft S., Wallin H. (2000). The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9(10): 1005-1015.
- Monteith D.K., Vanstone J. (1995). Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. *Mutat. Res.*, 345(3-4): 97-103.
- 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(10): 1093-1100.
- Müller W.U, Bauch T., Streffer C., D von Mallek D. (2002). Does radiotherapy affect the outcome of the comet assay? *Brit. J. Radiol.*, 75(895): 608-614.
- Murray J.E., Lang S., Miller, B.F. (1955). Observations on the natural history of renal homotransplants in dogs. *Surg. Forum.*, 5: 241-244.

- Murtagh F.E., Marsh J.E., Donohoe P., Ekbal N.J., Sheerin N.S., Harris F.E. (2007). Dialysis or not? A comparative survival study of patients over 75 years with chronic kidney disease stage 5. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 22(7): 1955-1962.
- Nagane N.S., Ganu J.V., Gandhi R. (2009). Oxidative stress, serum homocysteine and serum nitric oxide in different stages of chronic renal failure. *Biomed. Res.*, 20(1): 71-74.
- National Chronic Kidney Disease Fact Sheet, (2010). pp 1-4.
- <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheets/kidney.htm>
- Oberg B.P., McMenamin E., Lucas F.L., McMonagle E., Morrow J., Ikizler T.A., Himmelfarb J. (2004). Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney. Int.*, 65(3): 1009-1016.
- Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.*, 122(1): 86-94.
- Olive P.L., Wlodek D., Durand R.E., Banath J.P. (1992). Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell. Res.*, 198(2): 259-267.
- Oliveira C.M.C., Kubrusly M., Mota R.S., Silva C.A.B., Oliveira V.N. (2010). Malnutrition in chronic kidney failure: what is the best diagnostic method to assess? *J. Bras. Nefrol.*, 32(1): 55-68.
- O'Riordan E., Lambe, D., O'Donoghue D.J., New J., Foley, R.N. (2003). Variation in dialysis patient mortality by Health Authority. *QJM: Inter. J. Med.*, 96(10): 739-745.
- Östling O., Johanson K.J., (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123(1): 291-298.
- Palyvoda O., Polańska J., Wygoda A., Rzeszowska-Wolny J. (2003). DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta. Biochim. Pol.*, 50(1):181-190.

- Papaioannou G., Nianios G., Mitrogiannis C., Fyhrie D., Tashman, S., Yang K.H. (2008). Patient-specific knee joint finite element model validation with high-accuracy kinematics from biplane dynamic Roentgen stereogrammetric analysis. *J. Biomech.*, 41(12): 2633-2638.
- Parfrey P.S. Foley R.N. (1999). The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10(7): 1606-1615.
- Peces R. Garrancho J.M. (2004). Neoplasias in chronic renal failure. *Nefrología*, 24(1): 40-46.
- Periz L.A., Sanmartín E.F. (2001-2007). 500 cuestiones que plantea el cuidado del enfermo renal. Elsevier Masson, Barcelona, Capítulo 10. Complicaciones asociadas a la hemodiálisis: 154-157.
- 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(5): 613-620.
- Pham-Huy L.A, He H., Pham-Huyc C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.*, 4(2): 89-96.
- Pineda S.E. (2007). Glomerulonefritis. *Rev. Paceaña Med. Fam.*, 4(6): 136-143.
- Piperakis S.M., Petrakou E., Tsilimigaki S. (2000). Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 36(3): 243-249.
- Poonepalli A., Banerjee B., Ramnarayanan K., Palanisamy N., Putti T.C., Hande M.P. (2008). Telomere-mediated genomic instability and the clinico-pathological parameters in breast cancer. *Genes, Chrom. Cancer*, 47(12): 1098–1109.
- 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. Jour. Radial. Oncol.*, 55(5): 1216-1225.

- Povirk L.F., Steighner R.J. (1989). Oxidized apurinic/aprimidinic sites formed in DNA by oxidative mutagens. *Mutat. Res.*, 214(1): 13-22.
- Puchades Montesa M.J., González Rico M.A., Solis Salguero M. A., Torregrosa Maicas I., Tormos Muñoz M.C., Saez Tormo G., Juan García I., Miguel Carrasco A. (2009). Study of oxidative stress in advanced kidney disease. *Nefrología*, 29(5): 464-473.
- Putchá N., Allon M. (2007). Management of hyperkalemia in dialysis patients. *Semin. Dial.*, 20(5): 431-439.
- Quinlan G.J., Martin G.S., Evans T.W. (2005). Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, 41(6): 1211-1219.
- Quirós P.L., Ceballos M., Remón C., Hernández Romero M.C., Benavides B., Pérez Pérez-Ruilópez M.A., Lozano A., Aznar E., Rivero M., Fernández Ruiz E. (2005). Systemic arterial hypertension in primary chronic glomerulonephritis: prevalence and its influence in the prognosis. *Nefrología*, 25(3): 250-257.
- Quiroz Y., Ferrebuz A., Romero F., Vaziri N.D., Rodríguez-Iturbe B. (2008). Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 294(2): F336-344.
- Rajeswari N., Ahuja Y.R., Malini U., Chandrashekar S., Balakrishna N., Rao K.V., Khar A. (2000). Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis*, 21(4): 557-561.
- Ramírez R., Carracedo J., Soriano S., Jimenez R., Martín-Malo A., Rodríguez M., Blasco M., Aljama P. (2005). Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis. *Am. J. Kidney. Dis.*, 45(2): 353-359.
- Rampazzo E., Bertorelle R., Serra L., Terrin L., Candiotti C., Pucciarelli S., Del Bianco P., Nitti D., De Rossi A. (2010). Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *British Journal of Cancer* 102(8): 1300-1305.

- Rao K.S., Xu Y., Shaw E., Parton J.W. (2004). Mutagenicity testing applied for regulation of developing products. *Current Separat.*, 20(4): 141-144.
- Raymond N.T., Zehnder D., Smith S.C., Stinson J.A., Lehnert H., Higgins R.M. (2007). Elevated relative mortality risk with mild-to-moderate chronic kidney disease decreases with age. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 22(11): 3214-3220.
- Rayner H.C., Besarab A., Brown W.W., Disney A., Saito A., Pisoni R.L. (2004). Vascular access results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS): performance against Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) Clinical Practice Guidelines. *Am J Kidney Dis*, 44 (5 Suppl 2): 22-26.
- Reny J.L., Vuagnat A., Ract C., Benoit M.O., Safar M., Fagon J.Y. (2002). Diagnosis and follow-up of infections in intensive care patients: value of C-reactive protein compared with other clinical and biological variables. *Crit. Care. Med.*, 30(3): 529-535.
- Rhoades R.A., Bell D.R. (2009). *Medical Physiology- principles for clinical medicine*, 3 edition, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins: 391-442.
- Ribes A. (2004). Fisiopatología de la insuficiencia renal crónica. *An. Cir. Card. Vasc.*, 10(1): 8-76.
- Rigonato J., Mantovani M.S., Jordão B.Q. (2005). Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genet. Mol. Biol.*, 28(3): 1415-4757.
- Robles N.R., Calero R., Rengel M., Valderrabano F. (1990). Hemodialysis and cancer. *Nephron*, 54(3): 271-272.
- Rocha P.N., Sallenave M., Casqueiro V., Campelo Neto, B., Presidio S. (2010). Reason for "choosing" peritoneal dialysis: exhaustion of vascular access for hemodialysis? *J. Bras. Nefrol.*, 32(1): 23-28.
- Rojas E., López M.C., Valverde M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 722(1-2): 225-254.

- Ronco C. Cruz D. (2007). Hemodiafiltration history, technology, and clinical results. *Adv. Chronic. Kidney. Dis.*, 14(3): 231-243.
- Roth J.M., Restani R.G., Goncalves T.T., Sphor S.L., Ness A.B., Martino-Roth M.G., Garcias GL. (2008). Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test. *Genet. Mol. Res.*, 7(2): 433-443.
- Rufino J.M., García C., Vega N., Macia M., Hernández D., Rodríguez A., Maceira B., Lorenzo V. (2011). Current peritoneal dialysis compared with haemodialysis: medium-term survival analysis of incident dialysis patients in the Canary Islands in recent years. *Nefrología*, 31(2): 174-184.
- Rusin P., Olszewski J., Morawiec-Bajda A., Przybyłowska K., Kaczmarczyk D., Golinska A., Majsterek I. (2009). Role of impaired DNA repair in genotoxic susceptibility of patients with head and neck cancer. *Cell. Biol. Toxicol.*, 25(5): 489-497.
- Rutkowski P., Malgorzewicz S., Slominska E., Renke M., Lysiak-Szydłowska W., Swierczynski J., Rutkowski B. (2006). Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. *J. Ren. Nutr.*, 16(3): 190-193.
- Rybicki B.A., Conti, D.V., Moreira, A., Cicek M., Casey G., Witte, J.S. (2004). DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 13(1): 23-29.
- Rydberg B., Johanson KJ. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF. Eds. *DNA Repair Mechanisms*. New York. Academic Press; 456-468.
- Sahu S.C. (1990). Oncogenes, oncogenesis, and oxygen radicals. *Biomed. Environ. Sci.*, 3(2): 183-201.
- Salinas F.O. (2010). Seguimiento del donante vivo a corto, medio y largo plazo. *Nefrología*; 30 (2): 100-105.

- Sánchez C., Planells E., Aranda P., de la Cruz A.P., Asensio C., Mataix J., Llopis J. (2007). Vitamin B complex and homocysteine in chronic renal failure. *Nutr. Hosp.*, 22(6): 661-671.
- Sandoval S.B., Stoyanova E., Coll E., Pastor S., Reyes J., Andres, E., Ballarin J., Xamena N., Marcos R. (2010). Genetic damage in chronic renal failure patients is associated with the glomerular filtration rate index. *Mutagenesis*, 25(6): 603-608.
- Saran R., Bragg-Gresham J.L., Rayner H.C., Goodkin D.A., Keen M.L., Van Dijk P.C., Kurokawa K., Piera L., Saito A., Fukuhara S., Young E.W., Held P.J., Port F.K. (2003). Nonadherence in hemodialysis: associations with mortality, hospitalization, and practice patterns in the DOPPS. *Kidney Int.*, 64(1): 254-262.
- Sarnak M.J., Levey A.S. (2000). Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm. *Am. J. Kidney. Dis.*, 35(4 Suppl 1): S117-131.
- Satirapoj B. (2010). Review on pathophysiology and treatment of diabetic kidney disease. *J. Med. Assoc. Thai.*, 93(6): S228-241.
- Schild A.F., Perez E., Gillaspie E., Seaver C., Livingstone J., Thibonnier A. (2008). Arteriovenous fistulae vs. arteriovenous grafts: a retrospective review of 1,700 consecutive vascular access cases. *J. Vasc. Access.*, 9(4): 231-235.
- Schmezer P., Rajaei-Behbahani N., Risch A., Thiel S., Rittgen W., Drings P., Dienemann H., Kayser K.W., Schulz V., Bartsch H. (2001). Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 16(1): 25-30.
- Schupp N., Schinzel R., Heidland A., Stopper H. (2005). Genotoxicity of advanced glycation end products: involvement of oxidative stress and of angiotensin II type 1 receptors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1043(1): 685-695.
- 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(1): 28-32.

- Schupp N., Schmid U., Heidland A., Stopper H. (2008). New approaches for the treatment of genomic damage in end-stage renal disease. *J. Ren. Nutr.*, 18(1): 127-133.
- Schupp N., Heidland A., Stopper H. (2010). Genomic damage in endstage renal disease- contribution of uremic toxins. *Toxins*, 2(10): 2340-2358.
- Schupp N., Queisser N., Wolf M., Kolkhof P., Barfacker L., Schafer S., Heidland A., Stopper H. (2010). Aldosterone causes DNA strand breaks and chromosomal damage in renal cells, which are prevented by mineralocorticoid receptor antagonists. *Horm. Metab. Res.*, 42(6): 458-465.
- Schwedler S., Schinzel R., Vaith P., Wanner C. (2001). Inflammation and advanced glycation end products in uremia: simple coexistence, potentiation or causal relationship? *Kidney. Int. Suppl.*, 59(78): 32-36.
- 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(1): 56-66.
- Seeberg E., Eidec L., Bjøråsc M. (1995). The base excision repair pathway. *Trends. Biochem. Sci.*, 20(10): 391-397.
- Sheila S.D., O'Shea V.L., Kundu S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147): 941-950.
- Singh N.P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.*, 455(1-2): 111-27.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schnieder E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175(1): 184-191.
- Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., Brant L., Schneider E.L. (1990). DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 237(3-4): 123-130.
- Singh N.P., Stephens R.E. (1997). Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat. Res.*, 383(2): 167-175.

- Slupphaug G., Kavli B., Krokan H.E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, 531(1-2): 231-251.
- Smith T.R., Miller M.S., Lohman K.K., Case L.D., Hu J.J. (2003). DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis.*, 24(5): 883-889.
- Soroka N., Silverberg, D.S., Greeland M., Birk Y., Blum M., Peer G., Iaina, A. (1998). Comparison of a vegetable-based (soya) and an animal-based low-protein diet in predialysis chronic renal failure patients. *Nephron*, 79(2): 173-180.
- Spanswick V.J., Hartley J.M., Ward T.H., Hartley J.A. (1999). Measurement of drug-induced DNA interstrand crosslinking using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Meth. Mol. Med.*, 28: 143-154.
- Spanswick V.J., Hartley J.M., Hartley J.A. (2010). Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay. *Methods. Mol. Biol.*, 613: 267-82.
- Speit G., Vasquez, M., Hartmann, A. (2009). The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutat. Res.*, 681(1): 3-12.
- Spittle M.A., Hoenich N.A., Handelman G.J., Adhikarla R., Homel P., Levin N.W. (2001). Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney. Dis.*, 38(6): 1408-1413.
- Stolic R.V., Trajkovic G.Z., Krstic N.J., Stolic D.Z., Subaric-Gorgieva G. (2011). Correlation of mortality and location of arteriovenous fistula in hemodialysis patients. *Int. J. Artif. Organs.*, 34(1): 26-33.
- Stolzmann K.L., Camponeschi J.L., Remington P.L. (2005). The increasing incidence of end-stage renal disease in Wisconsin from 1982-2003: an analysis by age, race, and primary diagnosis. *WMJ*, 104(8): 66-71.

- 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(3): 433-437.
- 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(2): 296-301.
- Stopper H., Schupp N., Bahner U., Sebekova K., Klassen A., Heidland A. (2004). Genomic damage in end-stage renal failure: potential involvement of advanced glycation end products and carbonyl stress. *Semin. Nephrol.*, 24(5): 474-478.
- 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(10): 3272-3279.
- Stöwas J.C., Davis R.G., Leal P., Fuente J.C.O., Rodríguez J., Herrer V.C.W. (2002). Aspectos quirúrgicos en el uso del catéter de Tenckhoff. *Rev. Cir. Infantil.*, 12(3): 181-184.
- Strauss G.H., Peters W.P., Everson R.B. (1994). Measuring DNA damage in individual cells of heterogeneous mixtures: a novel application of an immunological typing technique. *Mutat. Res.*, 304(2): 211-216.
- Sulowicz W., Radziszewski A., Chowaniec E. (2007). Hepatitis C virus infection in dialysis patients. *Hemodial. Int.*, 11(3): 286-295.
- Szromba C. (2008). Starting Dialysis: What you need to know kidney beginnings: The magazine. <http://www.aakp.org/newsletters/KB-The-Magazine/Feature-Story/Starting-Dialysis/>.
- Tarng D.C., Huang T.P., Liu T.Y., Chen H.W., Sung Y.J., Wei Y.H. (2000). Effect of vitamin E-bonded membrane on the 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients. *Kidney. Int.*, 58(2): 790-799.
- Taylor C., Lillis C., LeMone P. (2005). *Fundamentals of nursing: the art and science of nursing care*. Lippincott Williams & Wilkins. V edition.

- Teruel J.L., Sabater, J., Galeano, C., Rivera, M., Merino, J.L., Fernández Lucas, M., Marcen, R., Ortuño, J. (2007). The Cockcroft-Gault equation is better than MDRD equation to estimate the glomerular filtration rate in patients with advanced chronic renal failure. *Nefrología*, 27(3): 313-319.
- Thierens H. Vral A. (2009). The micronucleus assay in radiation accidents. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 45(3): 260-264.
- Thornalley P.J. (1996). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.*, 27(4): 565-573.
- Thornalley P.J., Battah S., Ahmed N., Karachalias N., Agalou S., Babaei-Jadidi R., Dawnay A. (2003). Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.*, 375(Pt 3): 581-592.
- Tice R.R. (1994). The single cellgel/ comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. *Environmental mutagenesis* Phillips D.H y Venitt S. (eds) Bios. Scientific Publishers. Oxford: 315-339.
- Tice R.R., Strauss, G.H. (1995). The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells*, 13(1): 207-214.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi, H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35(3): 206-221.
- Tomo T. Shinoda T. (2011). Biocompatibility of dialysis fluid for online HDF. *Contrib. Nephrol.*, 168: 89-98.
- Tonelli M., Wiebe N., Culeton B., House A., Rabbat C., Fok M., McAlister F., Garg A.X. (2006). Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17(7): 2034-2047.
- Torres V.E., Harris P.C. (2009). Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney. Int.*, 76(2): 149-168.

- Tremblay R., Bonnardeaux A., Geadah D., Busque L., Lebrun M., Ouimet D., Leblanc M. (2000). Hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: effects of 12-month supplementation with hydrosoluble vitamins. *Kidney. Int.*, 58(2): 851-858.
- Tripepi G., Mallamaci F., Zoccali C. (2005). Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16(1): 83-88.
- Trosic I., Busljeta I., Modlic B. (2004). Investigation of the genotoxic effect of microwave irradiation in rat bone marrow cells: in vivo exposure. *Mutagenesis*, 19(5): 361-364.
- Tzamaloukas A.H., Ing T.S., Elisaf M.S., Raj D.S., Siamopoulos K.C., Rohrscheib M., Murata G.H. (2011). Abnormalities of serum potassium concentration in dialysis-associated hyperglycemia and their correction with insulin: a unique clinical/physiologic exercise in internal potassium balance. *Int. Urol. Nephrol.*, 42(4): 1015-1022.
- United States Renal Data System. *USRDS (2007) Annual Data Report*. Bethesda, MD: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services.
- Vamvakas S., Bahner U., Heidland A. (1998). Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved -editorial. *Am. J. Nephrol.*, 18(2): 89-95.
- 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(6): 3468-3473.
- Van der Weerd N.C., Penne E.L., Van den Dorpel M.A., Grooteman M.P., Nube M.J., Bots M.L., Wee P.M., Blankestijn P.J. (2008). Haemodiafiltration: promise for the future? *Nephrol. Dial. Transplant.*, 23(2): 438-443.
- Vaslaki L., Major L., Berta K., Karatson A., Misz M., Pethoe F., Ladanyi E., Fodor B., Stein G., Pischetsrieder M., Zima T., Wojke R., Gaulty A., Passlick-Deetjen J. (2006). On-line haemodiafiltration versus haemodialysis: stable haematocrit with less erythropoietin and improvement of other relevant blood parameters. *Blood Purif.*, 24(2): 163-173.

- Vassalotti J. (2006). Evaluación de la función renal. *Am. J. Kidney. Dis.*, 50(2): 169-180.
- Vaziri N.D. (2004). Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin. Nephrol.*, 24(5): 469-473.
- Vázquez I.G., Maza A.D., Mariles J.A. (2003). Fisiopatología del síndrome urémico. *Rev. Hosp. Gral. Dr. M Gea González*, 6(1): 13-24.
- Vega N., Coronel F., González-Parra E. (2005). Guías de Práctica Clínica en Diálisis Peritoneal. Tema 1. Introducción, definición de DP y objetivos. Relación con HD y trasplante. Incidencia y prevalencia de pacientes. Unidades de DP en España. S.E.N- Sociedad Española de Nefrología. pp. 13.
- Veroux M., Corona D., Veroux P. (2009). Kidney transplantation: future challenges. *Minerva. Chir.*, 64(1): 75-100.
- Vogiatzi G., Tousoulis D., Stefanadis C. (2009). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J. Cardiol.*, 50(5): 402-409.
- Wada Y., Nakanishi J., Takahashi W., Kai N., Nakayama Y., Yamashita Y., Honda J., Ueda S. (2006). Mass screening for prostate cancer in patients with end-stage renal disease: a comparative study. *BJU Int.*, 98(4): 794-797.
- Wang A.S., Ramanathan B., Chien Y.H., Goparaju C.M., Jan K.Y. (2005). Comet assay with nuclear extract incubation. *Anal. Biochem.*, 337(1): 70-75.
- Wang A.Y. (2011). Cardiovascular risk in diabetic end-stage renal disease patients. *J. Diabetes.*, 3(2): 119-131.
- Wasson G.R., McKelvey-Martin V.J., Downes C.S. (2008). The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*, 23(3): 153-162.
- Weiner D.E., Tighiouart H., Amin M.G., Stark P.C., MacLeod B., Griffit J.L., Salem D.N., Levey A.S., Sarnak M.J. (2004). Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15(5): 1307-1315.

- Wieczorowska-Tobis K., Niemir Z.I., Guzik P., Breborowicz A., Oreopoulos D.G. (2006). Difference in estimated GFR with two different formulas in elderly individuals. *Int. Urol. Nephrol.*, 38(2): 381-385.
- Williams M.E. (2009). Management of diabetes in dialysis patients. *Curr. Diab. Rep.*, 9(6): 466-472.
- Wiseman H., Halliwell B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313(1):17-29.
- Witko-Sarsat V., Gausson V., Descamps-Latscha B. (2003). Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney. Int. Suppl.*, 63(84): 11-14.
- Wizemann V., Lotz C., Techert F., Uthoff S. (2000). On-line haemodiafiltration versus low-flux haemodialysis. A prospective randomized study. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 15(1): 43-48.
- Wong P.N., Fung T.T., Mak S.K., Lo K.Y., Tong G.M., Wong Y., Loo C.K., Lam E.K., Wong A.K. (2005). Hepatitis B virus infection in dialysis patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 20(11): 1641-1651.
- Wood R.D. (1997). Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 272(38): 23465–23468.
- Yendle J.E., Tinwell H., Elliott B.M., Ashby J. (1997). The genetic toxicity of time: importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. *Mutat. Res.*, 375(2): 125-136.
- Zeiger E., Recio L., Fennell T.R., Haseman J.K., Snyder R.W., Friedman M. (2009). Investigation of the low-dose response in the in vivo induction of micronuclei and adducts by acrylamide. *Toxicol. Sci.*, 107(1): 247-257.
- 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(5): 303-306.
- Zieve D., Medical Director A.D.A.M. Health technology services. (2011). <http://www.adam.com/>

Zimmermann J., Herrlinger S., Pruy A., Metzger T., Wanner C. (1999). Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney. Int.*, 55(2): 648-658.

8.1 ANEXO I

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: Estrés oxidativo en los pacientes con insuficiencia renal crónica: efecto de la técnica de diálisis y del trasplante renal.

Yo,.....

DNI.....

Declaro:

Haber leído éste documento de información y haber sido informado correctamente. Comprendo que mi participación en este estudio es voluntaria. Comprendo que puedo no aceptar mi participación en este estudio:

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para colaborar en el estudio

Firma del/ de la participant

Información proporcionada por el/la

Dr.Dra.....

Nº.....

Firma del investigador

Barcelona, adede.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS GENÉTICAS EN SANGRE

Título del proyecto:

Responsable del proyecto:

Médico que informa

Nombre Paciente:

COMPRENDO que la decisión de participar en este proyecto es completamente voluntaria y que soy libre de participar en el mismo

DECLARO bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información para la realización de este estudio y he comprendido su significado. Me han explicado las características y objetivos del estudio y los posibles riesgos y beneficios esperados. He sido informado suficientemente y estoy de acuerdo en el tipo de estudio genético en el que voy a participar.

CONSIENTO que la Fundació Puigvert pueda utilizar estas muestras para el estudio genético de mi enfermedad, en el propio Hospital y/o en otros centros designados por éste, siempre de acuerdo con las normas éticas vigentes:

SÍ NO

CONSIENTO que la Fundació Puigvert pueda conservar y utilizar la muestra sobrante para posibles investigaciones futuras sobre mi enfermedad:

SÍ NO

DESEO ser informado de los resultados obtenidos en caso de que los hallazgos tengan una implicación para mi salud:

Sí

NO

COMPRENDO que soy libre de retirar mi consentimiento a la Fundació Puigvert para conservar y utilizar mis muestras con fines de investigación cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Barcelona, a _____ de _____ de _____

Firma del participante

Firma del médico que informa

Este consentimiento se formula de acuerdo con lo establecido en la LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica, publicada en el BOE nº 159, del 4 de julio de 2007

8.2. ANEXO II

Nephrol Dial Transplant (2010) 25: 879–885
doi: 10.1093/ndt/gfp575
Advance Access publication 4 November 2009

Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients

Elitsa Stoyanova¹, Silvia Berenice Sandoval¹, Liliana Andrea Zúñiga¹, Naouale El-Yamani¹, Elisabet Coll², Susana Pastor^{1,3}, Joselyn Reyes², Enrique Andrés², José Ballarín², Noel Xamena^{1,3} and Ricard Marcos^{1,3}

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain, ²Fundació Puigvert, Barcelona, Spain and ³CIBER Epidemiologia y Salud Pública, ISCIII, Spain

Correspondence and offprint requests to: Ricard Marcos; E-mail: ricard.marcos@uab.es

Abstract

Background. Chronic renal failure (CRF) patients present a high incidence of cardiovascular pathologies and cancer. This has been attributed to the existence of genomic instability in these patients, and consequently they should present elevated levels of genetic damage.

Methods. To determine the background levels of genetic damage and its specific levels of oxidative damage, a large population of 253 CRF patients (77 in dialysis) was analysed using the comet assay. The percentage of DNA in the tail was used as a measure of basal genetic damage. In addition, the use of endo III and FPG enzymes allowed us to determine the levels of specific oxidative damage in DNA bases.

Results. This is the first study that uses endo III and FPG enzymes to measure oxidative damage in CRF patients. Overall genetic damage, as well as specific oxidative damage, was higher in dialysis patients than in the CRF patients with different stages of uraemic state; genetic damage increased when serum creatinine levels increased. Genomic damage in dialysis patients decreased in those patients submitted to dialysis for a long time.

Conclusions. Genetic damage increases when renal function decreases, being maximum in haemodialysis patients. Although part of the observed damage can be attributed to the uraemic state itself, other individual genetic factors can influence a state of genomic instability responsible for the observed genomic damage.

Keywords: comet assay; CRF; haemodialysis treatment; oxidative damage; uraemic state

Introduction

The reactive oxygen species released by the mitochondrial respiratory chain can damage biomolecules such as lipids, proteins and nucleic acids. To avoid the damage, antioxidant defences have evolved to remove most of these oxidant agents. Even if a balance between oxidative damage and protective mechanisms is usually kept, there are specific situations in which the excessive production of free radicals, or deficiencies in antioxidant defences, leads to the appearance of oxidative stress [1].

Evidence exists indicating that end-stage renal disease is associated with oxidative stress, as a result of both increased oxidant production and decreased antioxidant defences [2–4]. In addition, patients with end-stage renal disease have been reported as a group with a high incidence of cardiovascular disease and cancer [5–7], and this could be related to increased levels of genetic damage.

Chronic kidney disease is a pathology characterized by progressive impairment of renal function over time, the glomerular filtration rate (GFR) being the best measure of kidney function. The early stages of chronic kidney disease (stages 2 and 3) are manifested by mild to moderate decreased glomerular filtration rate and are generally asymptomatic; but its diagnosis is important to treat cardiovascular risk factors, to delay progression of chronic kidney disease and to prevent cardiovascular events. Advanced stages of chronic renal disease (4 and 5) are characterized by severely decreased glomerular filtration rate accompanied by clinical complications (hypertension, anaemia, bone disease), requiring renal replacement therapy when end-stage renal disease is reached [8].

Table 1. Clinical and analytical data of the chronic renal failure patients

	CRF/HD (77)	CRF/ND ^a		Overall (176)	<i>P</i> ^b
		GFR <30 mL/min (91) CRF stages: 4-5	GFR >30-90 mL/min (85) CRF stages: 2-3		
Sex (men/women)	49 / 28	49 / 42	62 / 23	111 / 65	0.032
Age (years) ^a	61.91 ± 1.55	66.82 ± 1.35	68.55 ± 1.24	67.66 ± 0.92	0.002
BMI (Kg/m ²) ^a	24.96 ± 0.53	26.69 ± 0.47	26.92 ± 0.48	26.80 ± 0.33	0.001
Time in HD ^a (months)	51.29 ± 6.12	–	–	–	–
RT previous (yes/no)	20 / 57	–	–	–	–
CV pathology (yes/no)	62% / 38%	42% / 58%	50% / 50%	46% / 54%	0.042
Cancer (yes/no)	25% / 75%	21% / 79%	31% / 69%	25% / 75%	ns
Haemoglobin (g/L)	124.84 ± 1.74	130.21 ± 1.84	138.49 ± 17.47	134.18 ± 1.35	0.000
Cholesterol total (mmol/L)	3.89 ± 0.11	4.79 ± 0.11	4.74 ± 0.10	4.77 ± 0.07	0.000
Triglycerides (mmol/L)	1.48 ± 0.10	1.51 ± 0.06	1.44 ± 0.07	1.47 ± 0.04	ns
Albumin (g/L)	39.68 ± 0.37	41.92 ± 0.46	42.85 ± 0.48	42.36 ± 0.33	0.000
Ca x P (mmol ³ /L ³)	3.47 ± 0.13	2.93 ± 0.07	2.39 ± 0.04	2.67 ± 0.04	0.000
PTH (ng/L)	236.05 ± 25.26	168.27 ± 15.08	140.12 ± 6.92	140.12 ± 8.98	0.001
Ferritin (µg/L)	303.98 ± 27.74	202.33 ± 32.35	156.57 ± 25.15	185.65 ± 22.53	0.001
CRP (mg/L)	15.04 ± 3.41	7.19 ± 1.34	5.95 ± 1.01	6.69 ± 0.89	0.020
Homocysteine (µmol/L)	29.58 ± 1.68	22.00 ± 1.11	18.01 ± 0.80	20.43 ± 0.76	0.000
B12 (pmol/L)	447.36 ± 26.81	353.31 ± 17.95	336.58 ± 22.33	347.00 ± 13.96	0.001
Folate (nmol/L)	1185.41 ± 95.44	850.60 ± 73.71	930.71 ± 99.83	880.64 ± 59.20	0.008

^aValues are expressed as Mean ± Standard Error.

^bComparison between CRF/ND and CRF/HD (*t*-test/chi-square).

CRF (chronic renal failure), HD (haemodialysis), ND (CRF patients not on dialysis), GFR (glomerular filtration rate), BMI (body mass index), RT (renal transplantation), CV (cardiovascular), Ca x P (calcium phosphorus product), PTH (parathyroid hormone), CRP (C reactive protein), B12 (vitamin B12). *P* = statistical significance.

Oxidative stress in chronic renal failure (CRF) patients is higher than in healthy people, and in patients under haemodialysis treatment it is higher than in patients with different stages of chronic renal failure [9]. This has been attributed to several causes as uraemia [10], reduced antioxidant capacity [11] and the oxidizing effects of the haemodialysis membranes and intravenous iron infusions [12]. In addition, various advanced glycation end products (AGEs) and reactive carbonyls (RCOs), which are markedly enhanced in end-stage renal failure [13], are also known to induce oxidative stress [14].

Several markers of oxidative damage in end-stage renal disease have been used [15–17]; however, most of them are transients being metabolized, excreted or eliminated by dialysis; therefore, these biomarkers do not provide a good index of oxidative damage. In this context, DNA oxidative damage has been identified as a useful index of oxidative stress and a possible indicator of cancer risk. Among the methods to measure oxidative damage to DNA, the comet assay has been shown to be the most accurate method for measuring DNA oxidation [18]. Although the standard comet assay measures only DNA strand breaks and alkali-labile sites, its modification using bacterial enzymes acting as glycosylases, recognizing a variety of oxidized pyrimidines (endonuclease III, endoIII) or modified purines, mainly 8-oxoGua (formamidopyrimidine DNA glycosylase, FPG), allows detection of easily oxidized DNA bases [1].

To determine the levels of oxidative damage in a large group of CRF patients, the comet assay has been used. Thus, 253 patients have been evaluated to determine whether the levels of DNA oxidative damage were linked

to the severity of the pathology, as well as to determine if patients in dialysis treatment present more damage than those with different stages of CRF.

Materials and methods

Patients

The study was carried out in a total of 253 Caucasian adults. Seventy-seven were patients with chronic renal failure included in a programme of haemodialysis (HD) treatment for an average period of 37 months (range 2–259 months) and the remaining 176 were patients in different stages (2–5) of renal failure. The characteristics of all patients are indicated in Table 1, and all of them were recruited at the Puigvert Foundation, Barcelona. All haemodialysis patients underwent conventional haemodialysis for 3.5 to 4 hours, three times per week, using synthetic low permeability membranes. The percentage of patients taking vitamin supplements was higher in haemodialysis patients than in CRF not on dialysis (CRF/ND), and its distribution was as follows: 22.3% receiving folate, 16.8% receiving vitamin B and C and 34.4% receiving vitamin D.

After an informed consent was obtained from the CRF patients, blood samples were collected under protocols approved by the Ethics Committee of the Puigvert Foundation, as well as clinical data from their medical history. Blood analysis included the determination of urea, serum creatinine, sodium, potassium, calcium, phosphorus, blood glucose, cholesterol, triglycerides, albumin, haemoglobin and bicarbonate. Moreover ferritin, parathyroid hormone, C reactive protein, homocysteine, vitamin B12 and folate were analysed.

Comet assay

The comet assay was performed as previously described by Singh *et al.* [19] with minor modifications. Isolated lymphocytes from 30 µL of blood from each patient were carefully re-suspended in 140 µL of 1% low melting agarose (LMA), layered onto microscope slides pre-coated with 150 µL of 1% normal melting agarose (NMA) (dried at 65°C) and covered with a coverslip. Two gels were mounted in each slide. Coverslips were

Table 2. Genetic damage and oxidative damage observed in chronic renal failure patients

Damage	CRF/HD (77)	CRF/ND		Overall (64)	<i>P</i> ^b
		GFR<30ml/min (29)	GFR>30ml/min (35)		
%DNA in tail (lisis)	36.99 ± 1.01	29.87 ± 1.54	26.81 ± 1.68	28.22 ± 1.15	0.000
%DNA in tail (buffer)	38.76 ± 1.19	32.70 ± 1.93	31.37 ± 1.61	31.97 ± 1.24	0.000
%DNA in tail (endoIII)	46.60 ± 1.48	37.56 ± 1.92	35.44 ± 1.62	36.4 ± 1.24	0.000
%DNA in tail (FPG)	49.63 ± 2.00	42.40 ± 2.01	40.12 ± 1.59	41.16 ± 1.26	0.001
Purine induced OD (%DNA tail) fpg	11.65 ± 2.05	9.74 ± 1.09	8.77 ± 0.96	9.21 ± 0.72	0.264
Pyrimidine induced OD (%DNA tail) endo3	9.20 ± 1.38	5.06 ± 0.88	4.87 ± 0.82	4.95 ± 0.59	0.006
Total OD induction (%DNA tail)	20.37 ± 3.39	14.64 ± 1.65	12.45 ± 1.55	13.44 ± 1.13	0.056

^aValues are expressed as Mean ± Standard Error.

^bComparison between CRF/ND and CRF/HD.

CRF (chronic renal failure), ND (patients with CRF not on haemodialysis), HD (haemodialysis), GFR (glomerular filtration rate), endoIII (endonuclease III), FPG (formamidopyrimidine DNA glycosylase), OD (oxidative damage). *P* (statistical significance).

removed and lymphocytes were lysed for minimum 1 h at 4°C in a dark chamber containing a cold fresh lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl and 1% Triton X-100, adjusted to pH 10). To allow DNA denaturation, unwinding, and exposure of alkali-labile sites, slides were placed for 40 min in a horizontal gel electrophoresis tank filled with freshly cold electrophoresis solution (1 mM Na₂EDTA and 300 mM NaOH, adjusted to pH 13). Electrophoresis was performed in the same buffer for 30 min at 25 V and 300 mA. After electrophoresis, slides were neutralized with two 5-min washes with 0.4 M Tris (pH 7.5); then, were washed for 10 min with water, and stored in the dark at room temperature until scoring. Just before the microscopic analysis, slides were stained with 20 µL of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (1 µg/mL). The images were examined at 40 X magnification with a Komet 5.5 Image Analysis System (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK) fitted with an Olympus BX50 fluorescence microscope equipped with a 480-550 nm wide band excitation filter and a 590 nm barrier filter. One hundred randomly selected cells (50 cells from each of the two replicates slides) were analysed, per patient. The percentage of DNA in the tail were used as a measure of DNA damage and computed using the Komet version 5.5 Software.

Detection of induced oxidative damage

To determine the level of oxidized bases presented in the lymphocytes, after cell lysis slides were washed three times (5 min, 4°C) in an enzyme buffer solution (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0). For each patient a total of eight slides were prepared: two negative control slides, which stayed in the lysis solution until the electrophoresis, two slides treated with enzyme buffer to observe the basal DNA damage, and other two couples of slides that were treated with buffer, containing the bacterial enzymes Endo III and FPG, separately. The slides were incubated for 30 min at 37°C. After enzyme treatments, cell samples were processed as in the standard alkaline comet assay procedure.

Statistical analysis

There is no a general consensus for a standard statistic method in the analysis of comet data [20]. Nevertheless, there is the agreement that for the mean or median comet score for each sample the parameters are to be considered; if the distribution of comets in a gel is irrelevant, at least two replicate gels are needed to obtain the mean value for each sample [21].

Data are expressed as mean ± standard error. As we prove (Kolmogorov-Smirnov test) that the values of the evaluated genomic damage follow a normal distribution, parametric tests were performed for the statistical analysis. Comparisons between the two groups were analysed by using the Student *t*-test for continuous variables and by the chi-square test for discrete variables. Correlation coefficients were assessed by means of the Pearson's correlation test. All data were analysed by using the PC version 12.0 of the Statistic Package of Social Sciences (SPSS) software for Windows. Statistical significance was defined as a *P* value lower than 0.05.

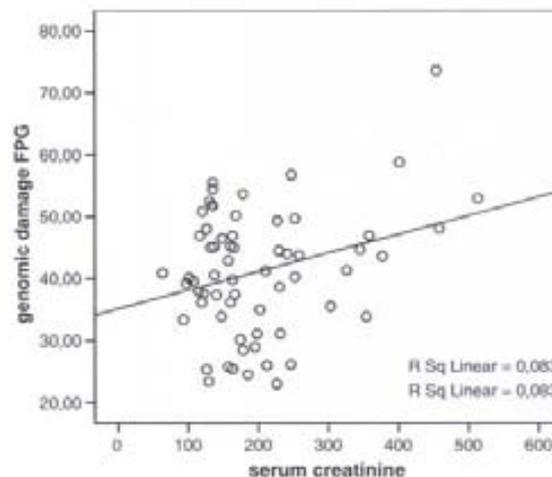


Fig. 1. Correlation between serum creatinine and genomic damage (formamidopyrimidine DNA glycosylase).

Results

The description of the population under study is shown in Table 1. As it can be observed, men are overrepresented in the samples, reflecting the high incidence of CRF in this gender, both in dialysis (HD) and CRF/ND patients. The average age for dialysis patients is 61.91 ± 1.55 years, slightly lower than in CRF/ND patients (67.66 ± 0.92). Similarly, the BMI was a bit higher in ND than in dialysis CRF patients. The classification of the CRF/ND patients, according to the glomerular filtrate rate (GFR), indicates that 91 were in stages 2-3 and 85 in stages 4-5. The time the HD patients had been enrolled in this therapy, shows a large variability, with a range covering from 2 to 259 months. As indicated in Table 1, a large proportion (20/57) of the patients undergoing dialysis was previously submitted to renal transplantation. The table also shows the high incidence of cardiovascular and cancer pathologies among the CRF patients, independent of whether or not they were submitted to HD therapy. In the haemodialysis group, the

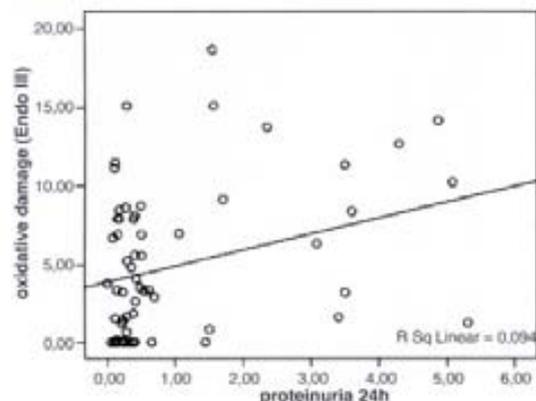


Fig. 2. Correlation between proteinuria/24 hours and oxidative damage (endonuclease III).

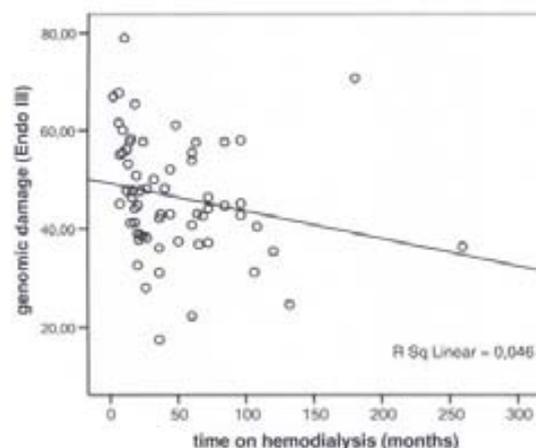


Fig. 3. Correlation between time on haemodialysis and genomic damage (endonuclease III).

causes of end-stage renal disease were vascular (21%), diabetes (16%), glomerular disease (18%), polycystic kidney disease (9%), tubulointerstitial nephritis (4%), others (6%) and unknown (26%). The causes of CRF in the group with different stages of renal insufficiency were vascular (27%), diabetes (13%), glomerular disease (11%), polycystic kidney disease (6%), tubulointerstitial nephritis (18%), others (1%) and unknown (24%).

Table 1 also shows the blood chemistry data of the three groups. In patients submitted to haemodialysis, increased values were observed for several markers (Ca x P, PTH, ferritin, B12, folate, etc). It should be taken into account that these patients were receiving different medications that included phosphate binders, vitamin D, folic acid, vitamins B and C, iron supplements and erythropoiesis-stimulating agents.

Table 2 shows the results obtained in the determination of the genetic damage observed in CRF patients. It must be indicated that only 141 CRF/ND were included in this study. Data indicate the levels of DNA damage, with and

without the addition of endo III and FPG enzymes. It was observed that DNA damage in HD patients was higher than in those that have not been submitted to HD therapy, but no differences were observed between non dialysed patients according to their GFR. Moreover, a positive correlation between serum creatinine levels and genomic damage was found (Figure 1). To determine the induced oxidative DNA damage (OD), the values obtained in the experiments only with buffer were subtracted from those obtained in the experiments done with enzymes (Table 2). It is observed that in HD patients the pyrimidine induced OD is significantly higher than the values observed in CRF/ND patients. It must be emphasized that no significant differences are observed when CRF patients are classified according to their GFR, whereas proteinuria/24 hours correlated positively with oxidative damage (Figure 2). It is also observed that the increase in the total oxidative damage in these patients is predominantly produced by damage induced in purines.

As a reference group we have included a group of 61 healthy individuals evaluated in a concurrent study carried out in our laboratory (unpublished data). The basal DNA damage for this group was 16.32 ± 1.19 , while for buffer treatments it was 18.98 ± 1.56 , and for the treatment with EndoIII and FPG 28.05 ± 1.68 and 22.84 ± 1.69 , respectively. The values for this group correspond with the values found in reference [22] and were significantly lower with respect to the results obtained for both HD and CRF/ND patients.

Associations between genetic/oxidative damage and analytical data were also evaluated. Positive correlations between calcium phosphorus product and genomic damage ($R = 0.210$, $P < 0.05$), ferritin and genomic damage ($R = 0.326$, $P < 0.01$), creatinine and genomic damage ($R = 0.288$, $P < 0.05$) and proteinuria and oxidative damage ($R = 0.307$, $P < 0.05$) were found. We also found negative correlations between haemoglobin and genomic damage ($R = -0.214$, $P < 0.05$), cholesterol total and genomic damage ($R = -0.185$, $P < 0.05$), albumin and oxidative damage ($R = -0.238$, $P < 0.01$) and time in haemodialysis and genomic damage ($R = -0.214$, $P = 0.09$) (Figure 3).

Discussion

The main finding of this study is that chronic renal failure patients exhibit an increased genomic damage demonstrated by comet assay with and without enzymes. In addition, this damage is positively associated with the progression of kidney disease, being higher in patients in haemodialysis.

The comet assay has been already used to evaluate the levels of genomic damage in both pre-dialytic and dialysed patients; nevertheless, all these previous studies have been carried out with small groups of patients, in comparison to the large size of our group. It must be pointed out that, even if the comet assay is a good biomarker to measure overall genetic damage, its complementation with the use of enzymes recognizing oxidative damage improves its usefulness in the study of CRF patients, where oxidative stress has been proposed as an important mechanism producing secondary effects [23].

In literature, genetic damage in CRF patients has also been evaluated by using biomarkers different from the comet assay. For example, in uraemic patients the frequency of sister chromatid exchanges is markedly higher than in the general population and it increases, preferentially, in those patients with several atherosclerotic plaques [24]. Micronuclei have been another way to measure genomic damage, where significant increases in both CRF and HD patients were observed [25,26].

In comet studies, Stopper *et al.* showed significant increases in the percentage of DNA in the tail in 23 CRF patients, compared to 21 healthy subjects [23]. This percentage was higher in a group of 26 patients in conventional haemodialysis. Furthermore, they showed that DNA damage was increased in those patients with high creatinine levels. Our results show that genomic damage is associated to both creatinine and proteinuria levels in plasma, which would confirm the association between the degree of renal failure, and its progression, with genomic damage. Although control donors were not specifically included in this study, we have reported data from a concurrent control carried out with healthy donors, showing significantly lower genomic damage than in both dialysis and CRF/ND patients; in addition, our reference results agree with those presented by Moller [22].

The role of dialysis on genomic damage is under discussion, since conflicting results have been published. Schupp *et al.* reported that starting standard dialysis does not induce changes in genomic damage [25], but switching to haemodiafiltration treatment reduced the percentage of DNA in the tail. Moreover daily dialysis patients showed a significantly lower degree of genomic damage, suggesting that the amelioration in the uraemic state would reduce the degree of genomic damage. The study of Schupp was carried out with a low number of patients (5-7 patients), but similar results were also obtained by Kobras *et al.* in another small group of 5 CRF patients, where the initiation of HD did not alter the genomic damage level of the patients, and switching from standard dialysis to haemodiafiltration induced a slight reduction in DNA damage [27]. In addition, the effects of time in HD is controversial because some studies found an increase of DNA damage with long treatment time [26], whereas others failed to find this association [23,28]. In 25 patients with type 2 diabetes mellitus undergoing haemodialysis, increased levels of DNA damage were obtained immediately after the haemodialysis session; but, 48 h after haemodialysis a significant damage removal was observed [29]. We have found a negative association between time in dialysis and genetic damage. This could be related to the complementary treatment with antioxidants that our patients receive, as observed in the levels of some vitamins in the biochemical analysis carried out (see Table 1), or could be the result of the correction of some blood alterations (high levels of urea, hyperphosphataemia, metabolic acidosis) and the elimination of several uraemic toxins by the technique.

Among the several reasons indicated to explain the high levels of genomic damage in CRF patients, oxidative stress is one of the most accepted. Different authors have postulated this theory and different approaches have been used to measure oxidative stress. Some authors evaluated the

oxidant effects indirectly, by using antioxidants. Thus, Kan *et al.* worked with 36 dialysis patients, evaluated before and after vitamin supplementation, in comparison with 36 controls. DNA damage determined by the Comet assay was higher in the first evaluation, but is reduced after 14 weeks of vitamin supplementation [28]. Similar results were obtained in a study with 29 patients in haemodialysis and 22 in peritoneal dialysis, where damage was reduced after oral vitamin E supplementation [30]. Oxidative damage has also been measured by using 8-OHdG, the presence of this adduct being higher in CRF patients than in controls, but highest in chronic peritoneal dialysis patients [31]. In general, oxidative stress in CRF patients is higher than in healthy people, and in patients undergoing HD it is even higher than in CRF/ND [9,32], with oxidative stress being attributed to reduced antioxidant capacity [11]. In the literature, only one study using enzymes with the comet assay on HD patients has been found. Thus, Muller *et al.* carried out a pilot study with only 21 haemodialysis patients and 12 controls using the comet assay plus FPG enzyme [12]. Although the differences in genetic damage were marginal (without FPG), these were clearly significant after FPG treatment. Since the effects were observed in blood before the dialysis session, this would indicate that it is due to the underlying disease, as well as from repeated exposure to dialysis membranes and iron infusion.

Our results clearly show the presence of significant levels of oxidative damage in both CRF and dialysis patients when comparing the results with Endo III and FPG separately. This would suggest that oxidative stress is associated to the pathology itself, not to the dialysis procedure, even if the dialysis can also induce oxidative damage. The high damage observed in haemodialysis patients can result from the dialysis process, or to the fact that those CRF patients who start haemodialysis have reached the highest levels of urea and uraemic toxins.

Individual damage values over the standard background would indicate a genetic predisposition, mainly due to the inability to adequately repair DNA lesions, or the chronic exposure to genotoxic agents. Genetic instability is characterized by a decreased ability to repair DNA lesions and this has been observed in different studies carried out with CRF patients. DNA repair was reduced in peripheral blood lymphocytes of predialysis patients after UV or γ irradiation, but it remains normal in dialytic patients [33,34]. Other studies reported reduced DNA repair ability in a subgroup of transplanted patients who also had cancer; nevertheless, in renal transplant patients without cancer, this ability did not differ from normal controls [35]. The presence of genomic instability in CRF patients has also been detected as increases of a defined deletion in the mitochondrial DNA from hair follicles [36]. This biomarker is considered useful since human mitochondrial DNA is much more susceptible to damage, due to the lack of proofreading and poor DNA repair [37]. Genomic instability has also been associated with the greater telomere shortening observed in uraemic patients [38]. This can reflect cumulative DNA exposure to oxidative stress that has been seen to affect telomere stability.

DNA damage has been related with the development of cancer, as it was demonstrated in the pioneer work of

Hagmar *et al.*, [39] for the general population. This association has also been demonstrated for the incidence of cardiovascular pathologies in the general population [40], which is supported for the monoclonal origin of cells from human atherosclerotic plaques in the general population [41,42].

In end-stage renal disease patients the relative risk of cancer is enhanced [43]. This excess of cancer risk does not distribute equally among the different organs, and it is especially higher in younger patients [6,44]. Our study seems to confirm this tendency since 25% of our patients have tumours, independent of whether or not they are undergoing haemodialysis treatment. This enhanced incidence of cancer has been associated to the existence of high levels of genomic damage in these patients [44]. The presence of increased levels of genomic damage can be interpreted as the result of proneness to genetic instability, or by the presence of genotoxic components resulting from the chronic renal pathology.

In addition, patients with chronic renal failure disease present an increased risk of cardiovascular disease, as we have also found in our study (62% in haemodialysis patients, 46% in CRF/ND patients). Traditional risk factors (hypertension, diabetes...) only in part explain the differential risk between the general population and CRF patients [45]. Oxidative stress seems to be responsible for the increase of cardiovascular disease in CRF patients, since there is a growing amount of data demonstrating that oxidative stress-induced DNA damage plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis [46]. In our study we failed to find an association between cancer or cardiovascular disease incidence and genetic damage level.

A limitation of our study is that it is cross-sectional in nature and not a prospective study. It would be very interesting to assess the evolution of genetic damage and oxidative damage in a long-term follow-up study and analyse the possible relationship with the clinical evolution of CRF patients over time.

As a conclusion, we have shown that CRF patients present increased levels of genetic damage, mainly due to oxidative damage. Genetic damage increases when renal function decreases, being maximum in haemodialysis patients. Although part of this damage can be attributed to the uraemic state itself, other factors, such as individual genetic characteristics, can influence a state of genomic instability, responsible for the observed genomic damage.

Acknowledgments. First of all we thank all the volunteers that have participated in this study. E. Stoyanova and S.B. Sandoval were supported by postgraduate fellowships from the Generalitat de Catalunya and the Universidad Autónoma de Tamaulipas, respectively. This investigation has been supported in part by the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2009SGR-725) and the Instituto de Salud Carlos III (FIS, PS09/01512).

Conflict of interest statement. None declared.

References

- Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res* 2009; 681: 24–32
- Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol* 2004; 24: 469–473
- Galle J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2135–2137
- Palleschi S, De Angelis S, Diana L *et al.* Reliability of oxidative stress biomarkers in hemodialysis patients: a comparative study. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1211–1218
- Herzog CA, Ma JZ, Collins AJ. Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 1998; 339: 799–805
- Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R *et al.* Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet* 1999; 354: 93–99
- Teschner M, Garte C, Ruckle-Lanz H *et al.* Incidence and spectrum of malignant disease among dialysis patients in north Bavaria. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127: 2497–2502
- Weiner DE. Causes and consequences of chronic kidney disease: implications for managed health care. *J Manag Care Pharm* 2007; 13 (3 Suppl): S1–S9
- Durak I, Kacmaz M, Elgun S *et al.* Oxidative stress in patients with chronic renal failure: effects of hemodialysis. *Med Princ Pract* 2004; 13: 84–87
- Roselaar SE, Nazhat NB, Winyard PG *et al.* Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy. *Kidney Int* 1995; 48: 199–206
- Mimic-Oka J, Simic T, Djukanovic L *et al.* Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1999; 51: 233–241
- Muller C, Eisenbrand G, Gradinger M *et al.* Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients. *Free Radic Res* 2004; 38: 1093–1100
- Schinzel R, Munch G, Heidland A *et al.* Advanced glycation end products in end-stage renal disease and their removal. *Nephron* 2001; 87: 295–303
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM *et al.* Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 9889–9897
- Witko-Sarfat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P *et al.* Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 1476–1478
- Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R *et al.* Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int* 2001; 59: 1960–1966
- Lucchi L, Iannone A, Bergamini S *et al.* Comparison between hydroperoxides and malondialdehyde as markers of acute oxidative injury during hemodialysis. *Artif Organs* 2005; 29: 832–837
- Gedik CM, Collins A. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J* 2005; 19: 82–84
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184–191
- Lowell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* 2008; 23: 171–182
- Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 2008; 23: 191–205
- Moller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Res* 2006; 612: 84–104
- Stopper H, Boullay F, Heidland A *et al.* Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 296–301
- Pernice F, Floccari F, Nostro L *et al.* Oxidative stress, sister chromatid exchanges and apoptosis in the pathogenesis of lymphocytopenia in ESRD patients. *J Nephrol* 2006; 19: 613–620
- Schupp N, Stopper H, Rutkowski P *et al.* Effect of different hemodialysis regimens on genomic damage in end-stage renal failure. *Semin Nephrol* 2006; 26: 28–32
- Stopper H, Meysen T, Böckenförde A *et al.* Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 433–437

27. Kobras K, Schupp N, Nehrlich K *et al.* Relation between different treatment modalities and genomic damage of end-stage renal failure patients. *Kidney Blood Press Res* 2006; 29: 10–17
28. Kan E, Undeger U, Bali M *et al.* Assessment of DNA strand breakage by the alkaline COMET assay in dialysis patients and the role of vitamin E supplementation. *Mutat Res* 2002; 520: 151–159
29. Bagatini PB, Palazzo RP, Rodrigues MT *et al.* Induction and removal of DNA damage in blood leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *Mutat Res* 2008; 657: 111–115
30. Domenici FA, Vannacchi MT, Jordao AA Jr *et al.* DNA oxidative damage in patients with dialysis treatment. *Ren Fail* 2005; 27: 689–694
31. Targ DC, Wen Chen T, *et al.* Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1321–1330
32. Herman M, Ori Y, Chagnac A *et al.* Spontaneous DNA repair increases during hemodialysis. *Nephron Clin Pract* 2008; 108: 188–193
33. Zevin D, Malachi T, Gafter U *et al.* Impaired DNA repair in patients with end-stage renal disease and its improvement with hemodialysis. *Miner Electrolyte Metab* 1991; 17: 303–306
34. Malachi T, Zevin D, Gafter U *et al.* DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients. *Kidney Int* 1993; 44: 385–389
35. Vamvakas S, Bahner U, Becker P *et al.* Impairment of DNA repair in the course of long-term hemodialysis and under cyclosporine immunosuppression after renal transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28: 3468–3473
36. Liu CS, Ko LY, Lim PS *et al.* Biomarkers of DNA damage in patients with end-stage renal disease: mitochondrial DNA mutation in hair follicles. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 561–565
37. Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 671–682
38. Boxall MC, Goodship TH, Brown AL *et al.* Telomere shortening and haemodialysis. *Blood Purif* 2006; 24: 185–189
39. Hagmar L, Brøgger A, Hamsten IL *et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res* 1987; 54: 2919–2922
40. Bono N, Rizza A, Colombo MG *et al.* Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat Res* 2001; 27: 23–30
41. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR *et al.* Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2002; 106: 927–932
42. Andreassi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003; 543: 67–86
43. Vamvakas S, Bahner U, Heidland A. Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved—editorial. *Am J Nephrol* 1998; 18: 89–95
44. Sebekova K, Wagner Z, Schupp N *et al.* Genomic damage and malignancy in end-stage renal failure: do advanced glycation end products contribute?. *Kidney Blood Press Res* 2007; 30: 56–66
45. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15S77–S80
46. Andreassi MG. DNA damage, vascular senescence and atherosclerosis. *J Mol Med* 2008; 86: 1033–1043

Received for publication: 9.3.09; Accepted in revised form: 2.10.09

