



Efecto del tratamiento con hemodiálisis sobre el estrés oxidativo en pacientes con insuficiencia renal crónica

M. González Rico, M. J. Puchades, R. García Ramón, G. Sáez, M. C. Tormos y A. Miguel

Servicio de Nefrología y *Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

RESUMEN

La enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de morbi-mortalidad de los pacientes con enfermedad renal crónica en tratamiento dialítico. Los llamados factores de riesgo tradicionales no son capaces de explicar la alta incidencia de estos sucesos por lo que cada vez más se está buscando nuevos factores de riesgo. Entre ellos el estrés oxidativo aumentado en estos pacientes podría ser un contribuyente importante en el riesgo cardiovascular.

Métodos: Para evaluar los efectos del tratamiento con hemodiálisis hemos realizado un estudio completo del estrés oxidativo en 15 pacientes urémicos. Hemos analizado enzimas antioxidantes representativas como la superoxidodismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, junto con el cociente entre glutatión oxidado y reducido y otros indicadores de oxidación como el malondialdehído y la 8-oxo-2'-deoxiguanosina. El análisis se ha realizado en pacientes hemodializados antes y después del tratamiento dialítico y se ha comparado con un grupo control de 16 voluntarios sanos.

Resultados: Encontramos un aumento de todos los parámetros de oxidación respecto a los del grupo control antes de la hemodiálisis con un descenso significativo tras la misma. Los parámetros antioxidantes son significativamente menores respecto a los de los controles con mejoría tras la hemodiálisis.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que la hemodiálisis por sí misma podría corregir el estado pro-oxidante de nuestros pacientes. En el trabajo se analizan los posibles mecanismos implicados en los cambios en el estrés oxidativo con la hemodiálisis.

Palabras clave: **Estrés oxidativo. Hemodiálisis. Enzimas antioxidantes. Peroxidación lipídica. GSH, 8-oxo-2'-deoxiguanosina.**

EFFECT OF OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE

SUMMARY

Background: Cardiovascular disease remains the single most common cause of excess morbidity and mortality in end-stage renal disease (ESRD) patients and the traditional risk factors can't explain the high incidence of these events.

Correspondencia: Dr. Miguel González Rico
Hospital Clínico Universitario de Valencia
Avda. Blasco Ibáñez, 17
46010 Valencia
E-mail: mgonzalezrico@wanadoo.es

New «non-traditional» risk factors are analysed in uremic patients and the increased oxidative stress is postulated to be an important contributor to uremic cardiovascular risk.

Methods: In order to evaluate the effects of the hemodialysis treatment, a complete oxidative stress study was performed in fifteen uremic patients. Representative antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), together with oxidized/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) and other oxidation indicators including malondialdehyde (MDA) and 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), were analysed to assess oxidative stress status in normal control volunteers and in uremic patients treated with hemodialysis (HD). In the latter group blood samples were taken prior and after HD to evaluate the effect of the session of HD over the oxidative markers.

Results: Low levels of antioxidant enzyme activities were observed in the uremic patients as compared with normal control subjects. HD treatment results in a significant recovery of these enzyme activities but remain lower as compared with control values. Levels of GSSG and GSH concentrations were increased and reduced respectively in uremic patients. These differences were even higher before the HD and were reduced upon treatment to levels closer to those observed in controls. MDA levels and 8-oxo-dG levels were also increased in uremic patients with the highest values observed in the pre-treated HD group. Eventhough HD treatment decreases the levels of oxidation products in mononuclear cells of uremic patients the values of the control group are not reached.

Conclusions: Our results suggest that hemodialysis by itself could correct the oxidative status in these patients. The possible mechanisms involved in the oxidative stress changes with the hemodialysis treatment will be discussed below.

Key words: **Oxidative stress. Hemodialysis. Antioxidant enzymes. Lipid peroxidation. GSH, 8-oxo-2'-deoxyguanosine.**

INTRODUCCIÓN

Los pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) presentan de tres a cinco veces más posibilidades de padecer un evento cardiovascular que la población en general^{1,2} y de 3,5 a 50 veces más los pacientes en diálisis³.

Actualmente se incide en la importancia que representa en estos pacientes, además de los factores de riesgo clásicos, la existencia de anemia, hipertensión, diabetes etc. y la asociación de fenómenos arterioscleróticos e inflamatorios unidos a un aumento del estrés oxidativo (EO)^{4,5}.

El estrés oxidativo surge de un desbalance entre la producción de sustancias derivadas de la oxidación y de los mecanismos de defensa del organismo para eliminarlas. En condiciones normales ambos sistemas se encuentran en equilibrio de modo que un aumento de la síntesis de sustancias oxidantes se acompaña de una mayor producción de sistemas antioxidantes. Este balance siempre es a favor de la parte antioxidante de forma que existe un margen de seguridad.

Cada vez existe mayor evidencia de la presencia de un estrés oxidativo en los pacientes con insuficiencia renal crónica y particularmente los sometidos a tratamiento con hemodiálisis. Esto parece ser debido a múltiples factores que incluyen un aumento de la producción de sustancias del metabolismo oxidativo (sustancias reactivas del oxígeno generadas por los leucocitos activados, metales de transición y otras toxinas de diferente peso molecular) y una disminución de las defensas antioxidantes. Asimismo influye en el estrés el uso de membranas poco biocompatibles y la pureza del agua de diálisis^{6,7}.

El EO generado de forma fisiológica o patológica produce un daño a los constituyentes celulares incluyendo los lípidos de la membrana, proteínas y ADN. Respecto al estudio del daño nuclear se ha visto que el 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OH-dG) es el producto oxidativo más abundante del ADN, que es capaz de reflejar pequeños cambios oxidativos del daño nuclear y, por tanto, se considera como un nuevo marcador para la investigación de su daño oxidativo⁸.

En el presente trabajo queremos estudiar, en una población de pacientes con IRC sometidos a HD además de los marcadores de defensa antioxidante en linfocitos, la peroxidación lipídica de las membranas mediante la determinación del Malonildialdehído (MDA) y el daño nuclear con el comportamiento de la 8-OH-dG y observar el efecto que sobre dichos marcadores ejerce una sesión de HD.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio provienen de la unidad de hemodiálisis de nuestro Hospital. Aquellos que cumplían los criterios de inclusión fueron invitados a participar y se les requirió consentimiento por escrito. Para evitar interferencias en los resultados, excluimos a los pacientes diabéticos, fumadores, mayores de 70 años, los que hubieran recibido hierro intravenoso en los dos últimos meses, los que estaban tratados con IECAS y aquellos con permanencia en diálisis menor de tres meses. Determinamos en todos la proteína C-reactiva y descartamos aquellos con sospecha de padecer procesos infecciosos o inflamatorios en el momento del estudio.

Finalmente el grupo estaba compuesto por 15 pacientes, 10 hombres y cinco mujeres con un promedio de edad de 56,90 años (39-70) y una permanencia en tratamiento de 33,71 meses.

Las causas que originaron la IRC son las habituales de una población en HD, excluyendo los diabéticos: glomerulonefritis en cuatro casos, nefritis tubulointersticial en tres, otros tres de causa vascular, una poliquistosis, una con etiología no filiada y tres por otras causas.

Todos los pacientes llevaban tratamiento con HD estándar con hemofiltros de polisulfona o poliacrilonitrilo, durante 12 horas semanales consiguiendo unos parámetros correctos de dosis de diálisis (Kt/V de Goth mínimo de 1.2).

Como controles analizamos 16 sujetos supuestamente sanos de edades y características demográficas similares al grupo de pacientes.

Métodos

En los controles y pacientes en hemodiálisis se determinaron en linfocitos los marcadores antioxidantes: Catalasa (CAT), Glutation reducido (GSH), Glutation peroxidasa (GPX) y Superoxidodismutasa (SOD) y los marcadores oxidativos: Glutation oxida-

do (GSSG) Malonildialdehído (MDA), el cociente GSSG/GSH y la 8-OH-dG, como índice de daño específico nuclear. Las mediciones se realizaron al inicio y final de la HD de mitad de semana.

Se centrifuga 1 ml de sangre total a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se almacena a -20° C hasta la determinación de malonildialdehído (MDA). Se añade un volumen equivalente de agua destilada al pellet celular y la muestra hemolizada se almacena a 4° C durante 2 horas. Utilizamos alícuotas de 200 µl para el análisis de hemoglobina y de glutatión peroxidasa (GPx). Los restantes 300 µl se mezclan con cloroformo/etanol 3:5 (volumen/volumen) y se centrifugan a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos. El sobrenadante se usa para la determinación de glutatión reducido (GSH), previa adición de 10 ml de solución PCA al 20%, y de catalasa (CAT) y superoxidodismutasa (SOD).

La sangre total heparinizada se diluye con medio salino y las células mononucleares se aíslan mediante centrifugación de Ficoll-Hypaque seguido de tres lavados⁹. El porcentaje de linfocitos de la suspensión celular es del 80-90%. El contenido de glutatión reducido (GSH) de las células se determina según un método previamente descrito¹⁰. Para el análisis del glutatión oxidado (GSSG), las muestras son tratadas y analizadas con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según método ya descrito^{11,12}. El MDA también se analiza con HPLC¹³. El contenido proteico de la muestra se mide con el método de Bradford¹⁴.

La actividad total de SOD se midió según el método de Mc Cord y Fridovich¹⁵, basado en la capacidad de los aniones superóxido para la reducción del citocromo C oxidado y la inhibición de ésta en presencia de la enzima tisular. Como fuente de aniones superóxido se utiliza la descomposición catalítica de la xantina por parte del enzima xantinaoxidasas. Se mide la disminución de la reducción del citocromo C mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 546 nm. Se define una unidad de SOD como la concentración de enzima capaz de disminuir en un 50% la velocidad de reducción del citocromo C oxidado, expresándose el resultado en u/mg de proteína.

La actividad de Catalasa (CAT) se determinó según el método de Clairbone¹⁶ basado en la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno a través de la CAT, medido por espectrofotometría. Se expresa en u/g de proteína.

La actividad de glutatión peroxidasa (GPX) se determinó mediante el método de Gunzler y Flohe¹⁷. El glutatión oxidado (GSSG) formado por la acción de la GPX es instantánea y continuamente reducido

por un exceso de la actividad de la glutatión reductasa, proporcionando un nivel constante de GSH.

El ADN celular se aisló mediante el método de Gupta¹⁸, con la modificación de Muñiz¹⁹, en la que se usa el cloroformo isoamil alcohol (24:1) en lugar de fenol para la separación de las proteínas. El ADN aislado se lava dos veces con etanol al 70%, se seca y se disuelve en 200 µl de 10 mmol/l de Tris/HCl, 0,1 mmol/l de EDTA, 100 mml/l de NaCl (ph 7.0), para la digestión enzimática.

Una vez están digeridas las muestras se filtran a través de microfiltros de 0,2 µm, antes de inyectar la muestra por el HPLC. Estas muestras se separan a través de una columna de cromatografía (Waters ODS). La cantidad de 8-oxo-dG y de dG en el ADN digerido se mide mediante detector electroquímico y absorbancia UV respectivamente, según se describe anteriormente²⁰. La concentración de esta base se registra y calcula utilizando un programa informático, siendo expresada en picomoles de 8-oxo-dG/ 10⁵ dG.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS 11.5. Los valores se representan como media y desviación estándar y el intervalo de confianza al 95%. Se verificó la normalidad de la distribución de cada variable (Test Kolmogorov-Smirnov de una muestra). La diferencia entre las medias de los distintos grupos se verificó mediante Anova de un factor con el ajuste post-hoc de Bonferroni en caso de homogeneidad de las varianzas o el T3 de Dunnett en caso contrario. Para las variables cualitativas

se utilizó la Chi-cuadrado y para la diferencia entre dos grupos, a pesar de la distribución normal de la mayoría de las variables, Mann Withney dado el tamaño de la muestra. Se realizaron correlaciones múltiples bivariadas entre las distintas variables en el grupo total de pacientes mediante Rho de Spearman.

RESULTADOS

Las características demográficas de los controles y los pacientes en hemodiálisis vienen referidas en la tabla I. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto la edad, sexo, peso y en las determinaciones de prealbúmina, hemoglobina o ferritina. Todos los pacientes presentaban una proteína C reactiva inferior a 5 mg/dl.

Tabla I. Características generales de la población estudiada

Variables	Controles (n = 16)	Pacientes en HD (n = 15)	p
Edad (años)	56,18 (35-70)	56,90 (39-70)	NS
Sexo (M/F)	11/5	10/5	NS
Prealbúmina (mg/dl)	38,09 ± 2,07	35 ± 5,52	NS
Ferritina (µg/L)	258,4 (16,9-709)	411,8 (239-650)	NS
PCR	1,20	1,10	NS
Índice de comorbilidad (I. de Charlson)	0,22	3,91	< 0,05

Los valores de ferritina están expresados como mediana con rango; las demás variables continuas están expresadas como media + desviación estándar.

PCR: Proteína C- reactiva.

Utilizamos el índice de Charlson como índice de comorbilidad.

Tabla II. Actividades enzimáticas antioxidantes en linfocitos en sujetos normales y pacientes urémicos y efecto del tratamiento dialítico

	Controles (n = 16)	Pacientes en HD (n = 15)	
		aHD	dHD
CAT (U/g prot)	276,97 ± 33,29 (205,99-347,94)	110,36 ± 5,94 ^a (97,75-122,97)	251,44 ± 18,67 ^b (211,86-291,02)
GPx (U/g prot)	57,18 ± 2,04 (52,82-61,53)	25,93 ± 1,62 ^a (22,50-29,37)	44,40 ± 1,77 ^{a,b} (40,63-48,16)
SOD (U/mg prot)	5,72 ± 0,15 (5,0-6,05)	1,69 ± 0,18 ^a (1,30-2,08)	3,75 ± 0,21 ^{a,b} (3,29-4,20)

Los valores están expresados como media ± DE (intervalos de confianza al 95%).

aHD: antes de la hemodiálisis.

dHD: después de la hemodiálisis.

^ap < 0.005 versus controles.

^bp < 0.005 versus antes de la hemodiálisis.

El análisis de las actividades enzimáticas antioxidantes en linfocitos muestra diferencias significativas entre los controles y los pacientes en hemodiálisis (tabla II). Los valores antes de la HD están significativamente disminuidos respecto a los controles. El tratamiento hemodialítico produce un significativo aumento de las tres enzimas medidas que en el caso de la CAT llega a valores sin diferencias significativas con los controles sanos.

La concentración intracelular de GSH está significativamente reducida en los pacientes antes de la HD. Después de la misma, existe una recuperación del tripeptido aunque todavía inferiores a los del grupo control. La disminución de GSH se acompaña de un aumento de su producto de oxidación GSSG y por tanto se produce un aumento del cociente GSSG/GSH especialmente evidente en los pacientes antes de la HD

indicando el estado oxidativo de estos sujetos durante los periodos de no diálisis (tabla III).

En los pacientes urémicos también encontramos un aumento de la peroxidación lipídica expresada por la producción aumentada de MDA en las células circulantes. El tratamiento con HD produce una reducción de esta peroxidación.

Respecto al daño nuclear encontramos un aumento de los niveles de la 8-oxo-dG en los pacientes en HD que mejora tras la misma aunque permaneciendo por encima de los valores de los controles sanos (tabla IV).

Estudiamos la correlación entre la 8-oxo-dG y el resto de parámetros analizados encontrando una correlación negativa significativa con GSH, GPx y SOD y positiva con MDA, GSSG y el cociente GSSG/GSH (tabla V).

Tabla III. Niveles de glutatión y cociente GSSG/GSH en linfocitos de sujetos sanos y pacientes urémicos y efecto del tratamiento dialítico

	Controles (n = 16)	Pacientes en HD (n = 15)	
		aHD	dHD
GSSG (nmoles/mg prot)	0,15 ± 0,02 (0,11-0,20)	0,59 ± 0,02 ^a (0,53-0,65)	0,38 ± 0,01 ^{a,b} (0,35-0,42)
GSSG/GSH x 100	0,60 ± 0,07 (0,43-0,76)	4,26 ± 0,26 ^a (3,71-4,82)	1,86 ± 0,10 ^{a,b} (1,64-2,08)
GSH (nmoles/mg prot)	26,19 ± 1,24 (23,54-28,84)	14,23 ± 0,48 ^a (13,21-15,24)	21,15 ± 0,55 ^{a,b} (19,98-22,31)

Los valores están expresados como media ± DE (intervalos de confianza al 95%).

aHD: antes de la hemodiálisis.

dHD: después de la hemodiálisis.

^ap < 0,005 versus controles.

^bp < 0,005 versus antes de la hemodiálisis.

Tabla IV. Peroxidación lipídica y daño en el ADN en sujetos sanos y pacientes urémicos y efecto del tratamiento dialítico

	Controles (n = 16)	Pacientes en HD (n = 15)	
		aHD	dHD
MDA (nmoles/mg prot)	0,15 ± 0,018 (0,11-0,19)	0,50 ± 0,03 ^a (0,42-0,58)	0,34 ± 0,01 ^{a, b} (0,31-0,37)
8-oxo-dG/10 ⁶ dG	2,97 ± 0,16 (2,62-3,32)	6,62 ± 0,23 ^a (6,13-7,11)	5,10 ± 0,21 ^{a, b} (4,63-5,56)

Los valores están expresados como media ± DE (intervalos de confianza al 95%).

aHD: antes de la hemodiálisis.

dHD: después de la hemodiálisis.

^ap < 0,005 versus controles.

^bp < 0,005 versus antes de la hemodiálisis.

Tabla V. Correlación entre 8-OH-dG y otros marcadores oxidativos en pacientes en diálisis

	r*	p
GSH	- 0,552	0,001
GSSG	0,330	0,035
GSSG/GSH x 100	0,552	0,001
SOD	- 0,531	0,001

* Coeficiente de correlación de Spearman.

DISCUSIÓN

Está claramente constatado que los pacientes con IRC presentan un aumento del EO, producido por una disminución de las defensas antioxidantes y un aumento de los factores prooxidantes^{4,21-23}. Se han dado diversas explicaciones fisiopatológicas a este hecho; algunos lo atribuyen a malnutrición e hipalbuminemia por presentar, en estos casos, una disponibilidad disminuida de grupos «tioles», otros al «estado urémico» *per se* con la retención de solutos que pueden potenciar su patogenicidad y otros a la asociación de factores comórbidos como la edad avanzada, diabetes, fenómenos inflamatorios e infecciosos^{24,25}. Además, cuando estos pacientes urémicos reciben tratamiento con una técnica depurativa extrarrenal como la HD se potencia el aumento del EO por diferentes razones entre las que destacan la utilización de membranas sintéticas poco biocompatibles y no usar agua de diálisis ultrapura.

Para valorar la existencia de un EO lo ideal sería poder medir los radicales libres producidos (O_2^- , OH^- , H_2O_2 , etc.), pero esto es muy difícil técnicamente debido a la vida media tan corta de estos productos y además sería muy inespecífico²⁶. Por tanto, lo mejor es medir los resultados del daño que producen estos radicales libres.

Cuando los radicales libres superan la barrera antioxidante, quedan disponibles para interactuar con las estructuras fosfolipídicas produciendo la *peroxidación lipídica*. Uno de los componentes más importantes de esta reacción es la formación de malondialdehído (MDA) cuya cuantificación nos daría una idea de la magnitud de la peroxidación lipídica. Los resultados encontrados en nuestros pacientes coinciden con los de otros muchos autores respecto a una peroxidación lipídica aumentada^{27,28}. Ahora bien, es importante destacar que no todos determinan el MDA como marcador de la peroxidación lipídica, sino otros productos como las TBARS (sustancias reactivas al ácido thiobarbitúrico)²⁹ o incluso la mieloperoxidasa³⁰. Recientemente se ha puesto en marcha la que puede ser la única técnica

disponible con suficiente sensibilidad y detección quimioluminiscente post-columna tras separación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)³¹.

La actuación de los RL sobre las proteínas produce los carboxilos proteicos, que en nuestro laboratorio no se determinan.

Finalmente los radicales libres también pueden actuar sobre el ADN del núcleo, produciendo cambios en su estructura de forma que una base guanina se oxida a guanosina y se forma un compuesto, la *8-oxo-deoxiguanosina* que puede ser cuantificada por HPLC. La aparición de esta base oxidada tiene una especial importancia porque refleja intensidad y especificidad del daño oxidativo además de tener potencial mutagénico³².

En nuestros pacientes antes de realizarse la HD, lo que representaría su «estado basal», encontramos unos niveles significativamente aumentados de 8-oxo-dG respecto a los controles sanos. Asimismo encontramos una correlación significativa con la mayoría de los otros biomarcadores. De estos resultados se podría inferir que el daño en el ADN cursa paralelo al daño del metabolismo celular lo que coincidiría con la conclusión establecida por Targn y cols.³³ en la que asevera que el aumento de la 8-oxo-dG en los linfocitos es un efecto integrado del defectuoso estado redox celular por disminución de las defensas antioxidantes y aumento de la producción de radicales libres.

El *glutation* es un tiol tripeptídico que se encuentra en el interior de todas las células animales y que es probablemente el antioxidante celular más importante. El glutatión oxidado (GSSG) es muy tóxico para las células por lo que el organismo tiende a la reducción del GSSG a GSH mediante la glutatión-reductasa. Así, la medida del cociente GSSG/GSH se considera un estimador fiable del grado de estrés oxidativo celular^{31,34}.

Respecto a los mecanismos antioxidantes, hemos determinado la tríada enzimática compuesta por la *superoxidodismutasa* (SOD), la *catalasa* (CAT) y la *glutatión peroxidasa* (GPx). Nuestros pacientes presentan niveles descendidos de las tres enzimas antes de realizarse la HD.

Los efectos que una sesión de HD pueda producir sobre el EO es tema de controversia. Para algunos autores la HD agravaría el EO debido a la activación de células inflamatorias causada por el uso de membranas bioincompatibles y por pérdidas netas de antioxidantes solubles en agua^{8,35,36} o por una generación de radicales libres^{37,38}. En sentido contrario se señala la disminución de MDA con la HD^{39,40} y destacan los trabajos realizados por Himmelfarb y cols.^{41,42} en los que demuestran el efecto beneficioso de la HD sobre

los principales aminotioles plasmáticos (Cisteína, Homocisteína, Cistenil-glicina y Glutation) importantes marcadores de la oxidación. Biasioli y cols.⁴³ estudian el efecto que ejercen durante una hemodiálisis el uso de distintos tipos de membrana y además de observar una disminución del EO a lo largo de la HD con membranas más biocompatibles, realiza determinaciones postdiálisis, con mejoría de los distintos marcadores y a los 30 minutos después de finalizar en donde los valores de MDA tienden a asemejarse a los valores prediálisis.

Nuestros resultados obtenidos en los pacientes en HD tras una sesión dialítica coinciden con estos últimos y muestran que los valores tanto de los marcadores antioxidantes como los prooxidantes mejoran tras la HD aunque sigan siendo diferentes significativamente con los controles. De acuerdo con estos resultados se puede deducir que las diferencias encontradas entre ambos grupos se deberían a la existencia de solutos oxidantes que se eliminaran por la HD. A este respecto Roselaar y cols.⁴⁴ demuestran la presencia de un oxidante dializable en el plasma de pacientes en HD y por tanto encuentran una mejoría del EO tras la HD.

Es necesario realizar trabajos prospectivos en pacientes tratados con HD con determinaciones prediálisis, postdiálisis y a las 24 horas para poder realizar un perfil oxidativo entre dos sesiones de hemodiálisis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a una Beca de Post-Formación y Ayuda a la Investigación en Nefrologías de la SEN (expediente AYU-SEN 2/00).

BIBLIOGRAFÍA

1. Luke RG: Chronic renal failure—a vasculopathic state. *N Engl J Med* 339: 841-843, 1998.
2. Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D'Amico M, Del Vecchio L, Limido A, Malberti F, Spotti D: Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. *Nephrol Dial Transplant* 15 (Supl. 5): S69-S80, 2000.
3. Brunner FP, Selwood NH: Profile of patients on RRT in Europe and death rates due to major causes of death groups. The EDTA Registration Committee. *Kidney Int* (Supl. 38): S4-15, 1992.
4. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zocalli C: Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1272-1280, 2003.
5. Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, Smetana S: Comparison of hemostatic factors and serum malondialdehyde as predictive factors for cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 34 (3): 438-444, 1999.
6. Canaud B, Cristol J, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc J, Vaussenat F: Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif* 17 (2-3): 99-106, 1999.
7. Morena M, Cristol JP, Canaud B: Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. *Blood Purif* 18 (3): 191-9, 2000.
8. Targ DC, Huang TP, Wei YH, Lin TY, Chen HW, Wen Chen T, Yang WC: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 36 (5): 934-944, 2000.
9. Berthold F: Isolation of human monocytes by Ficoll density gradient centrifugation. *Blut* 43 (6): 367-71, 1981.
10. Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H: Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 32: 2529-34, 1983.
11. Navarro J, Obrador E, Pellicer JA, Asensi M, Viña J, Estrela JM: Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med* 22: 1203-09, 1997.
12. Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Viña J: A high-performance liquid chromatographic method for measurements of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 217: 323-28, 1994.
13. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN Jr, Sunderman FW Jr: Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thio-barbituric acid adduct. *Clin Chem* 33: 214-20, 1987.
14. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54, 1976.
15. McCord JM, Fridovich I: The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243: 5753-60, 1968.
16. Clairborne A: Catalase activity. En: Green-Wald RA, ed. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc; 1986: 283-4.
17. Gunzler WA, Flohe L, Clairborne A: Glutathione peroxidase. En: Green-Wald RA, ed. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc; 1986: 285-90.
18. Gupta RC: Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6943-7, 1984.
19. Muñoz P, Valls V, Pérez Broseta C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR, Sáez GT: The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* 18: 747-55, 1995.
20. Shigenaga MK, Aboujaoude EN, Chen Q, Ames BN: Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 234: 16-33, 1994.
21. Haugen E, Nath KA: The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 17: 58-65, 1999.
22. Himmelfarb J, Hakim RM: Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 593-598, 2003.
23. Annuk M, Fellström B, Akerblom O, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M: Oxidative stress in pre-uremic patients. *Clin Nephrol* 56: 308-314, 2001.
24. Halliwell B, Gutteridge JM: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8, 1990.
25. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM: The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 62: 1524-1538, 2002.

26. Galli F, Ronco C: Oxidant stress in hemodialysis. *Nephron* 84: 1-5, 2000.
27. Martín-Mateo M, Sánchez-Portugal M, Iglesias S, De Paula A, Bustamante J: Oxidative stress in chronic renal failure. *Renal Fail* 21: 155-167, 1999.
28. Fiorillo C, Olivier C, Rizzuti G, Nediani C, Pacini A, Nassi P: Oxidative stress and antioxidants defenses in renal patients receiving regular haemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 36 (3): 149-53, 1998.
29. Nourooz-Zadeh J: Effect of dialysis on oxidative stress in uraemia. *Redox Rep* 4 (1-2): 17-22, 1999.
30. Maruyama Y, Lindholm B, Stenvinkel P: Inflammation and oxidative stress in ESRD –the role of myeloperoxidase. *J Nephrol* 17: 72-76, 2004.
31. Oliva MR, Muñoz P, Valls V, Iradi A, Catalá MD, Cañete-Nicolás C: Radicales libres y modificación oxidativa del ADN. Implicaciones en la carcinogénesis experimental y humana. En: Cascales M. Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo. Real Academia de Farmacia. Monografía IV: Fundación José Casares Gil; 1997, pp. 127-58.
32. Kasai H: Análisis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 387 (3): 147-63, 1997.
33. Tarng DC, Wen Chen T, Huang TP, Chen CL, Liu TY, Wei YH: Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 13: 1321-1330, 2002.
34. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen At, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B: Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 21: 845-853, 1996.
35. Bohm V, Tiroke K, Schneider S, Sperschneider H, Stein G, Bitsch R: Vitamin C status of patients with chronic failure, dialysis patients and patients after renal transplantation. *Int J Vitam Nutr Res* 67: 262-266, 1997.
36. Hegbrant J, Hultkvist Bengtsson U: Vitamin C and E as antioxidants in hemodialysis patients. *Int J Artif Organs* 22: 69-73, 1999.
37. Wratten ML, Tetta C, Ursini F, Sevanian A: Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. *Kidney Int (Supl. 76): S126-S132*, 2000.
38. Nguyen AT, Lethias C, Zingraff J, Herbelin A, Naret C, Descamps-Latscha B: Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected *in vivo* and *in vitro* with microamounts of whole blood. *Kidney Int* 28: 158-167, 1985.
39. Samouilidou E, Grapsa E: Effect of dialysis on plasma total antioxidant capacity and lipid peroxidation products in patients with end-stage renal failure. *Blood Purif* 21: 209-212, 2003.
40. Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, Smetana S: Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int* 56: 1078-1083, 1999.
41. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E: Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 58: 2571-2578, 2000.
42. Himmelfarb J, McMenamin E, McMonagle E: Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 61: 705-716, 2002.
43. Biasioli S, Schiavon R, Petrosino L, Cavallini L, Cavalcanti G, De Fanti E, Zambello A, Borin D: Role of cellulosic and non-cellulosic membranes in hyperhomocysteinemia and oxidative stress. *ASAIO J* 46: 625-634, 2000.
44. Roselaar SE, Nazhat NB, Winyard PG, Jones P, Cunningham J, Blake DR: Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy. *Kidney Int* 48: 199-206, 1995.