



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Facultat de Biociències
Departament de Genètica i de Microbiologia
Unitat de Genètica**

DANY GENÈTIC I LA SEVA MODULACIÓ EN PACIENTS AMB MALALTIA RENAL CRÒNICA

Tesi Doctoral

Lara Rodríguez Ribera

Setembre de 2015



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Facultat de Biociències
Departament de Genètica i de Microbiologia
Unitat de Genètica**

DANY GENÈTIC I LA SEVA MODULACIÓ EN PACIENTS AMB MALALTIA RENAL CRÒNICA

Memòria presentada per

Lara Rodríguez Ribera

Per optar al grau de Doctor en Genètica amb la menció de *Doctorat
Internacional*

Bellaterra, Setembre del 2015

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Ricard Marcos Dauder i la
Dra. Susana Pastor Benito

Dr. Ricard Marcos Dauder

Dra. Susana Pastor Benito

Lara Rodríguez Ribera

El doctorand ha estat finançat per una beca pública de “Personal docent investigador (PIF)” de la Universitat Autònoma de Barcelona i beca “ajuts per estades curta durada fora de Catalunya de la Universitat Autònoma ESTPIF2013-36” per realitzar l’estada al University college Dublin. La investigació ha estat subvencionada per la Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2014SGR-202) i pel Ministerio de Economía y Competitividad (FIS, PI12/02559).

Aquesta tesi està inscrita sota la menció de Doctorat Internacional. Per tant, per tal d'obtenir la menció de Doctor Internacional, la doctoranda ha realitzat una estada de 3 mesos de durada fora de l'Estat Espanyol, a la institució University College Dublin, per tal de realitzar els treballs d'investigació. Aquesta estada ha estat autoritzada per la Comissió Acadèmica responsable del programa de Doctorat, incorporant-se així a l'expedient i al document d'activitats de la doctoranda. A més, s'ha redactat en anglès el resum, les conclusions i els articles i s'ha presentat part de la defensa de la tesi doctoral en aquesta llengua, per ser habitual per a la comunicació científica en el seu camp de coneixement i per ser diferent a les llengües oficials de l'Estat Espanyol.

A la meva família

Voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que d'alguna o altra manera han contribuït a fer possible la realització d'aquesta tesi i que m'han acompanyat en el transcurs d'aquests anys.

En primer lloc, agrair al *Dr. Ricard Marcos* i la *Dra. Susana Pastor* per acceptar-me al seu grup d'investigació i dirigir aquest treball durant tots aquests anys. El meu agraïment també a la gent de la fundació *Puigvert*, metges i pacients, que han contribuït en aquest treball, especialment a la *Beth i la Irene* sense les quals aquest treball no hauria estat possible. Voldria agrair també a la *Dra. Tara McMorrow* per haver-me acollit al seu laboratori i al *Dr. Craig Slattery* que tant m'ha ajudat amb les seves idees a que el darrer article d'aquesta tesi hagi estat possible.

Als tècnics del laboratori *Cristian, Lourdes i Glòria* per estar sempre a prop quan el món s'ensorra de cop i ajudar a aixecar-lo amb optimisme. A l'*Anna Corral*, per la seva important col·laboració realitzada en els estudis de biomonitoratge i a la *Glòria Umbert*, per la seva ajuda sempre, especialment en aquells primers experiments *in vitro*... cap allà al 1500 a.C. on, entre altres coses, veïem fantasmes...

A la *Jessica, el Gerard, el Cristian, el Leo, la Maria&Max, l'Alba, la Miriam, la Jen, la Bernadette, la Hillary i l'Helena* i a totes les persones que han fet que el dia a dia en el laboratori fos una mica millor. Moltes gràcies a tots pels vostres ànims, la vostra alegria i el vostre pessimisme quan cal (saber que tot és un desastre però que tots estem igual, també ajuda!).

Per últim agrair a la família i amics la seva companyia i recolzament durant aquests llargs anys. Per escoltar-me sempre amb paciència tot i no entendre una paraula del que deia i pensar "que bé que s'ho passa la Lara al laboratori tot el dia disfressant-se fent westerns!".

A tots vosaltres, moltes gràcies!

ÍNDEX

Abreviatures.....	i
Índex de taules i figures	iii
Resum.....	v
Abstract	vii
I. INTRODUCCIÓ	1
1.1 El ronyó.....	1
1.1.1 La nefrona	2
1.1.2 Funcions dels ronyons.....	4
1.1.3 Determinació de la funció renal.....	4
1.2 Malaltia renal crònica (MRC).....	5
1.3 La fibrosi renal.....	6
1.3.1 Transició epiteli-mesènquima	7
1.4 Classificació de la MRC.....	8
1.5 Epidemiologia de la MRC	10
1.5.1 Etiologia de la MRC	10
1.5.2 Incidència de la MRC	11
1.5.3 Prevalença de la MRC.....	12
1.6 Prognosi i risc de progressió	13
1.6.1 Progressió de la MRC	13
1.6.2 Prevenició de la progressió de la MRC.....	14
1.7 Complicacions associades a la MRC.....	14
1.7.1 Anèmia	14
1.7.2 Alteracions en el metabolisme mineral ossi	15
1.7.3 Malaltia cardiovascular	16
1.7.4 Malnutrició.....	17
1.7.5 Altres complicacions de la MRC	18
1.8 Tractament renal substitutiu.....	19
1.8.1 Trasplantament renal.....	19
1.8.2 Diàlisi	20
1.8.2.1 Diàlisi peritoneal	21
1.8.2.2 Diàlisi extra-corpòria.....	22
1.8.2.2.1 Tècniques de diàlisi extra-corpòria	24

1.8.2.2.2 Membranes de diàlisi	25
1.8.3 Complicacions de la diàlisi.....	27
1.9 Dany en el DNA, inestabilitat genòmica i càncer en la MRC.....	28
1.9.1 Estrès oxidatiu	30
1.9.2 Estrès carbonil.....	31
II. OBJECTIUS.....	37
III. RESULTATS	41
3.1 Resum de l'article 1	45
Article 1: <i>Radiosensitivity in patients suffering from chronic kidney disease</i>	47
3.2 Resum de l'article 2	51
Article 2: <i>Time in hemodialysis modulates the levels of genetic damage in hemodialysis patients</i> ...	53
3.3 Resum de l'article 3	57
Article 3: <i>Genetic damage in patients moving from hemodialysis to online hemodiafiltration</i>	59
3.4 Resum de l'article 4	63
3.5 Resum de l'article 5	67
IV. DISCUSSIÓ.....	71
V.CONCLUSIONS.....	89
Conclusions (versió anglesa).....	91
VI. BIBLIOGRAFIA	95
VII. ANNEXOS.....	123
7.1 Annex 1 - article 4.....	123
7.2 Annex 2 - article 5.....	125

ABREVIATURES

8-OHdG	8-hidroxi-deoxiguanosina
AGEs	<i>Advanced glycation end products</i> , Productes finals de glicació avançada
ALEs	<i>Advanced lipoxidation end products</i> , Productes finals de lipoxidació avançada
BER	<i>Base excision repair</i> , reparació per escissió de bases
CDK-EPI	<i>Chronic kidney disease epidemiology collaboration</i> , Malaltia renal crònica-col·laboració epidemiològica
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Àcid desoxiribonucleic
DP	Diàlisi Peritoneal
DPAC	Diàlisi peritoneal ambulatoria continua
DPCC	Diàlisi peritoneal cíclica contínua
ECM	<i>Extracellular matrix</i> , Matriu extracel·lular
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> , Transició epiteli-mesènquima,
ERI	<i>Erythropoietin resistance index</i> , Índex de resistència a la eritropoetina
FGF-23	Fibroblast Growth Factor 23, factor de creixement de fibroblasts 23
FPG	Formamidopirimidina DNA glicosilasa
FSP1	<i>Fibroblast-Specific Protein 1</i> , Proteïna específica de fibroblast 1
GO	Glioxal
GSH	Glutatió
Hb	Hemoglobina
HD	Hemodiàlisi
HDAC6	Histona desacetilasa-6
HDF	Hemodiafiltració
HHE	Hidroxihexenal
HNE	Hidroxinonhenal
HTA	Hipertensió arterial
IFG	Índex de filtrat glomerular
IRC	Insuficiència renal crònica
Kt/V	Eficiència de la diàlisi (pàgina 24)
MCV	Malaltia cardiovascular
MDA	Malondialdehid
MDRD	<i>Modified diet in renal disease</i> , Modificació de la dieta en la malaltia renal
MGO	Metiglioxal
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> , Metal·loproteïnases de matriu
MN	Micronucli
MRC	Malaltia renal crònica
mRNA	Messenger ribonucleic acid, àcid ribonucleic missatger
NKF-K/DOQI	<i>National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i>
OL-HDF	Hemodiafiltració on-line
Pmp	Per milió de població
PRU	Percentatge de reducció de la urea
PS	Polisulfona
PSE	Polisulfona-vitamina E

PTH	Hormona paratiroidal
QAC	Quocient albúmina/creatinina
RCC	Reactive carbonyl compounds, Compostos reactius de carbonil
ROS	Reactive oxygen species, Espècies reactives d'oxigen
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
TR	Transplantament renal
TRS	Tractament renal substitutiu
α-SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i> , Actina α del múscul llis

Taules

Taula 1. Estadis de la malaltia renal crònica segons la guia NKF-K/DOQI i actualitzacions 10

Taula 2. Prevalença de les complicacions de la malaltia renal crònica segons l'IFG 15

Figures

Figura 1. Esquema de les parts principals del ronyó 1

Figura 2. Esquema de les parts principals d'una nefrona 2

Figura 3. Classificació i causes seleccionades de la malaltia renal crònica 9

Figura 4. Etiologia de la malaltia renal crònica avançada en malalts sotmesos a tractament renal substitutiu (TRS) a Europa l'any 2012 11

Figura 5. Prognosi de la malaltia renal crònica segons les categories de IFG i albuminúria 13

Figura 6. Esquema del mecanisme de difusió i convecció per pressió hidrostàtica 21

Figura 7. Esquema del procés de diàlisi peritoneal. 22

Figura 8. Esquema de les parts principals del procés d'hemodiàlisi 23

Figura 9. Esquema de les principals vies de formació del metilglioxal 32

Figura 10. Esquema de la ciliofagia induïda pel fum del tabac 84

RESUM

Els pacients amb malaltia renal crònica (MRC) tenen una alta incidència de càncer i alts nivells de dany genètic que poden ser deguts a diverses causes com ara la inestabilitat genètica, (deguda a defectes en la reparació del DNA), l'efecte genotòxics d'algunes toxines urèmiques, la reducció d'antioxidants i l'estrès oxidatiu causat pel procés de diàlisi. Es considera que la utilització de noves tècniques de diàlisi i el fet de complementar la teràpia amb antioxidants podria ajudar a reduir el dany genètic dels pacients amb MRC, juntament amb les seves conseqüències. En aquest context, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar el dany genètic en pacients amb MRC i avaluar si les diferents tècniques de diàlisi poden modular el dany observat en aquests pacients. Per això ens vam proposar realitzar els quatre estudis següents: (I) un estudi transversal, avaluant el dany genètic en una població de 373 malalts amb MRC i 179 controls; (II) un estudi longitudinal sobre l'efecte que pot tenir el temps en hemodiàlisi (HD) en els nivells de dany genètic de 70 pacients amb MRC sotmesos a HD; (III) un estudi longitudinal, en una població de 33 individus, sobre els efectes que produeix en els nivells de dany genètic, el canvi d'hemodiàlisi a hemodiafiltració; (IV) un estudi longitudinal sobre l'efecte que produeix en el dany genètic i la capacitat antioxidant el canvi de membranes d'hemodiàlisi de polisulfona a membranes de polisulfona recobertes de vitamina E. Els nostres resultats mostren que els pacients amb MRC presenten dany genètic (valorat com a freqüència de micronuclis, MN, en limfòcits de sang perifèrica) i inestabilitat genòmica (radiosensibilitat). De la mateixa manera hem pogut observar que el temps en hemodiàlisi ajuda a disminuir els nivells de dany en el DNA i incrementa l'habilitat de reparació en els pacients amb MRC. També hem observat que l'hemodiafiltració és una bona alternativa a la HD per disminuir els nivells de dany genètic dels malalts amb MRC i millorar la seva capacitat antioxidant; però en canvi l'ús de membranes de vitamina E, tot i que redueixen les bases oxidades del DNA, no han demostrat canvis significatius en la capacitat antioxidant del plasma ni en la freqüència basal de MN, ni en el nombre de trencaments en el DNA.

La reducció del filtrat glomerular, en els pacients amb MRC, suposa l'acumulació del que s'anomenen toxines urèmiques. Aquests compostos se suposa que poden estar involucrats tant en l'evolució de la malaltia com en els nivells elevats de dany genètic elevat que presenten aquests pacients. Així, aquest ambient urèmic i la inflamació crònica es creu que poden estar involucrats en la reparació de ferides, accentuant el dany renal dels pacients. La fibrosi tubulo-intersticial és el resultat d'una reparació aberrant on el teixit epitelial és substituït per una cicatriu produïda per l'acumulació de matriu extracel·lular (Extracellular matrix, ECM). Per a millorar la comprensió dels efectes de les toxines urèmiques en la

reparació de les ferides i en el procés fibròtic, un altre objectiu ha estat avaluar *in vitro* l'efecte de quatre compostos resultants de l'estrès carbonil (glioal [GO], metilglioal [MGO], malondialdehid [MDA] i hidroxihexenal [HHE]) sobre la capacitat de reparar lesions en l'epiteli proximal tubular. Cal emfatitzar que aquest ha estat el primer cop que s'avalua l'efecte del compostos resultants de l'estrès carbonil (*Reactive Carbonyl Compounds*, RCC) en la reparació de ferides en el ronyó. Els nostres resultats mostren que els compostos RCC tenen efectes diferenciats en la reparació de ferides. Així, el MDA i el GO endarrereixen el tancament de les ferides mitjançant la disrupció de la vimentina i la desciliació de les cèl·lules del túbul proximal. En canvi, l'HHE i en menor grau el MGO, produeixen canvis morfològics, transcriptòmics i proteics en les cèl·lules epitelials de ronyó compatibles amb l'anomenada transició epitelio-mesènquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT). La lleu disrupció de la vimentina observada després d'aquests tractaments, evitaria un increment en la capacitat de migració propi d'una completa EMT.

ABSTRACT

The patients suffering from chronic kidney disease (CKD) have high incidence of cancer and genetic damage levels due to several causes such as genetic instability (due to DNA repair defects), genotoxic effect of some uremic toxins, antioxidant reduction and oxidative stress induced by the dialysis process. It is believed that the use of new dialysis techniques and supplement the patient's therapy with antioxidants could help to reduce DNA damage in CKD patients and minimize its consequences. In this context, an important objective of this Thesis was to study the DNA damage of CKD patients and to evaluate whether the different dialysis techniques can modulate the DNA damage observed in the patients. For this, we realized the following studies: (I) a transversal study of the DNA damage in a 373 CKD patients and 179 controls population; (II) a follow up study about the effect of the time in hemodialysis (HD) on the DNA damage levels of 70 patients submitted in HD; (III) a follow-up study, in a 33 patients population, about the effects on DNA damage that produced the switch from HD to hemodiafiltration; (IV) a follow-up study about the effect on DNA damage and antioxidant capacity that produce the switch from polysulfone HD membrane to vitamin E-coated polysulfone membranes. Our results show that CKD patients had high levels of genetic damage (measured as micronucleus, MN, frequency in peripheral blood lymphocytes) and genomic instability (radiosensitivity). We also observed that the HD helped to reduce DNA damage levels and increased the repair capacity in CKD patients. Our data showed that hemodiafiltration is a good alternative to HD to reduce genetic damage levels and increase the antioxidant capacity of CKD patients. However the use of vitamin E-covered membranes reduced oxidized DNA bases, it failed to reduce antioxidant capacity and the basal frequency of MN and DNA breaks.

The glomerular filtration reduction of CKD patients leads to uremic toxins accumulation. These compounds can be involved both in the progression of the disease and in the high levels of DNA damage found in this patients. It has been reported that uremic milieu and chronic inflammation are involved in wound healing and enhanced kidney damage in CKD patients. Tubulo-interstitial fibrosis results from an aberrant wound-healing ability the normal epithelial tissue is substituted for scar tissue caused by accumulation of extracellular matrix proteins. To better comprehend the effect of uremic toxins in wound healing and fibrosis, another objective of this Thesis was to evaluate, *in vitro*, the effects of four compounds resulting from carbonyl stress (Glyoxal (GO), methylglyoxal (MGO), malonyldialdehyde (MDA) and 4-hydroxyhexenal (HHE)) on the wound healing capacity of the proximal tubular epithelia. This is the first study that evaluates reactive carbonyl compounds (RCC) effects on renal wound healing. Our

findings showed that RCC differentially affects wound healing in renal proximal cells. Our data demonstrated that MDA and GO delay wound closure mediated by vimentin disruption and deciliation. In contrast, HHE treated cells (and MGO in minor degree) exhibited mesenchymal-like phenotype but we hypothesize that minor vimentin disruption observed prevent migration enhancement.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

Donat que aquesta Tesi està feta, fonamentalment, amb malalts amb disfunció dels seus ronyons, caldria començar tenint en compte algunes de les característiques d'aquest òrgan, així com sobre la patologia i la manera de resoldre-la.

1.1. El ronyó

El ronyó és un òrgan parell localitzat a la part posterior de la cavitat abdominal un a cada costat de la columna vertebral que forma el sistema urinari junt amb els urèters, la bufeta i la uretra. Els ronyons s'encarreguen de filtrar la sang, eliminant l'excés de líquid i els productes del metabolisme, i tornar-la depurada al torrent sanguini. També realitzen funcions homeostàtiques, com el manteniment de l'equilibri àcid-bàsic i electrolític, i funcions endocrines, com la síntesi d'eritropoetina i renina. La **Figura 1** mostra l'estructura del ronyó on es veu que està format pel parènquima renal (escorça, columnes i medul·la renal), on es filtra la sang i es modifica el filtrat, i les vies excretors (calze i pelvis renal).

La sang entra en el ronyó per l'artèria renal a una pressió elevada, és ultrafiltrada i surt del ronyó per la vena renal. Els ronyons generen cada dia 200 litres d'ultrafiltrat, però la major part d'aquest és reabsorbit en els túbuls renals, fent que al final només s'excretin menys de 2 litres d'orina al dia. L'orina és recollida pels calzes cap a la pelvis renal i conduïda cap a la bufeta unitària a través dels urèters.

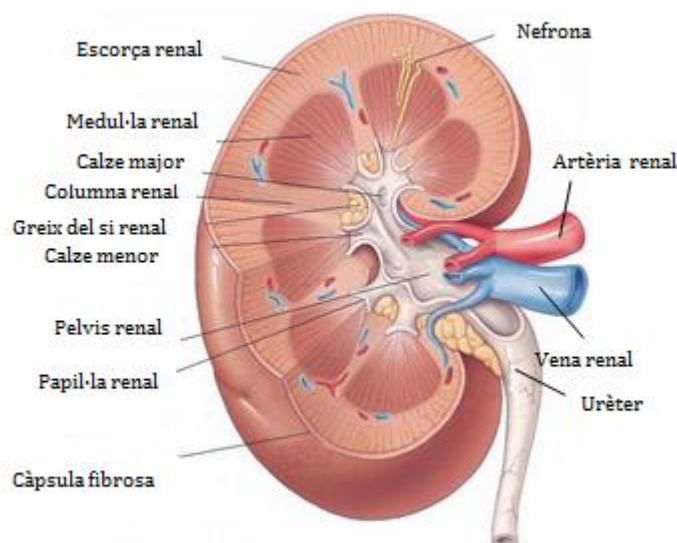


Figura 1. Esquema de les parts principals del ronyó.

1.1.1. La nefrona

Cada ronyó conté més d'un milió d'unitats funcionals anomenades nefrones. Aquestes són les encarregades de filtrar la sang i modificar el líquid de filtrat. Les nefrones estan formades pel corpuscle renal, el túbul proximal, la nansa de Henle, el túbul distal, el túbul col·lector i l'aparell juxtaglomerular (**Figura 2**).

En l'escorça renal es troben els corpuscles renals i els túbuls proximals i distals. En la medul·la renal trobem les nanses de Henle i els túbuls connectors. Les nefrones corticals tenen una nansa de Henle curta que està dins l'escorça renal i només penetra a la zona externa de la medul·la, en canvi les nefrones juxtamedul·lars tenen una nansa de Henle llarga que penetra fins la zona interna de la medul·la renal.

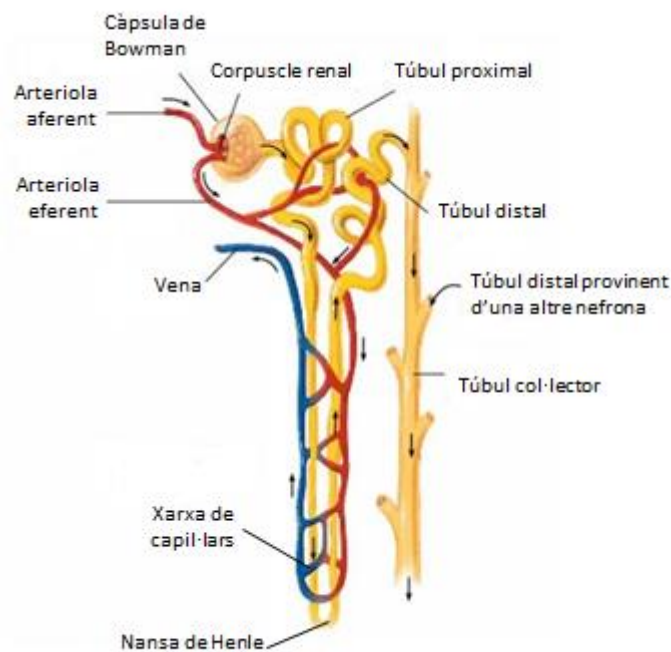


Figura 2. Esquema de les parts principals d'una nefrona

La sang es filtra en el corpuscle renal i el líquid de filtrat es modifica en els túbuls renals. L'aigua i molècules reabsorbides en els túbuls renals passen als capil·lars peritubulars els quals s'uneixen per formar vènules i després venes petites que transportaran la sang depurada fora del ronyó a través de la vena renal.

El **corpuscle renal** està format pel glomèrul renal i la càpsula que l'envolta (càpsula de Bowman). La sang entra a la nefrona a través de l'arteriola aferent i flueix cap a una xarxa de capil·lars en forma d'esfera anomenada **glomèrul**. La pressió sanguínia força l'aigua i els soluts

a ser ultrafiltrats a través de la paret glomerular cap a la **càpsula de Bowman** i posteriorment cap al túbul proximal. La sang que no és filtrada surt del glomèrul per l'arteriola eferent. L'estructura i característiques de la barrera glomerular (formada per cèl·lules endotelials, podòcits i làmina basal) determina la permeabilitat d'aquesta. La mida dels porus de la barrera (8 nm) i la càrrega negativa de la membrana permeten que les molècules petites i carregades positivament siguin filtrades fàcilment, mentre que les cèl·lules sanguínies, plaquetes i proteïnes no són permeables (Dee Silverthorn, 2014).

Durant aquest procés es filtren ions, glucosa i aminoàcids que són necessaris pel cos i per tant s'han de reabsorbir del líquid tubular cap als capil·lars peritubulars. En el **túbul proximal** es reabsorbeixen dues tercers parts de l'aigua i sal filtrades, tots els soluts orgànics (principalment glucosa i aminoàcids), el 65% del potassi, el 80% del fosfat i la meitat d'urea. El túbul proximal està format per una capa de cèl·lules cúbiques epitelials molt polaritzades que presenten microvellositats (vora en raspall) a la part apical que proporcionen una gran superfície per a la reabsorció. Aquestes cèl·lules també transporten, reabsorbeixen, metabolitzen i excreten fàrmacs i toxines urèmiques.

La **nansa de Henle** és el segment de túbul renal en forma de nansa que hi ha entre el túbul proximal i el túbul distal. El braç descendent de la nansa de Henle és altament permeable a l'aigua i impermeable als ions. En canvi el braç ascendent de la nansa és impermeable a l'aigua i permeable als ions. En aquest tram són reabsorbits els ions de sodi, potassi, clor, magnesi i calci.

El **túbul distal**, en funció dels nivells d'hormona paratiroidal, aldosterona i peptid natriurètic atrial, regula els nivells de calci, fosfat, sodi, potassi, hidrogen, amoníac i aigua.

Els **túbuls col·lectors** mantenen l'equilibri electrolític i de fluid mitjançant processos de reabsorció i excreció (d'aigua, bicarbonat i sodi, potassi, hidrogen i clor) regulats per l'aldosterona i l'hormona antidiürètica. Els túbuls col·lectors surten de l'escorça renal a través de la medul·la i drenen a la pelvis renal. El líquid de filtrat modificat, anomenat orina, flueix cap als urèters per la seva excreció.

L'**aparell juxtaglomerular** es troba entre l'arteriola aferent i eferent. Regula el pas de sang cap al glomèrul, la concentració de sodi i la retenció d'aigua del túbul distal mitjançant la secreció de renina i adenosina.

1.1.2. Funcions dels ronyons

Els ronyons realitzen varies funcions bàsiques que són vitals per l'organisme. Aquestes funcions es poden agrupar en tres grans grups (Dee Silverthorn, 2014):

1. Funció excretora: excreció i secreció de productes del metabolisme (urea, creatinina, àcid úric, etc.), hormones, fàrmacs i toxines exògenes.
2. Funció homeostàtica: manteniment del balanç electrolític (mitjançant regulació dels nivells de sodi, potassi, clor, calci i fòsfor) i àcid-base (mitjançant l'excreció de H⁺, bicarbonat o amoníac) i de la pressió sanguínia i el volum d'aigua (mitjançant molècules vasoactives o diürètiques i controlant els nivells de sodi).
3. Funció endocrina: síntesi i secreció d'hormones com l'eritropoetina (per a la regulació de l'eritropoesi), la renina i les prostaglandines (per al manteniment de la pressió arterial) i el calcitrol (la forma activa de la vitamina D3).

Degut al gran nombre de funcions que realitza el ronyó, la disminució de la funció renal produeix alteracions en pràcticament tots els sistemes de l'organisme.

1.1.3. Determinació de la funció renal

Per valorar els nivell de funcionament dels ronyons s'utilitza l'**Índex de Filtrat Glomerular** (IFG), que representa la velocitat amb que la sang és filtrada per la membrana glomerular. L'IGF s'expressa en mL/min/1,73 m², on 1,73 és un coeficient per ajustar la fórmula respecte la superfície corporal. L'IGF no pot ser mesurat fàcilment de manera rutinària en la pràctica clínica, és per això que l'IGF s'estima a base d'equacions que utilitzen la creatinina sèrica, l'edat, la raça, el gènere i la superfície corporal. Les fórmules més utilitzades per estimar l'IFG són: la formula MDRD (*Modified diet in renal disease*, Modificació de la dieta en la malaltia renal) i la seva posterior actualització, la formula CDK-EPI (*Chronic kidney disease epidemiology collaboration*, Malaltia renal crònica-col·laboració epidemiològica) (Levey *et al.*, 1999; Levey *et al.*, 2009). La fórmula MDRD tendeix a infravalorar els nivells de IFG >60 mL/min/1,73m², ja que ha estat desenvolupada en població amb MRC moderada o greu; en canvi la fórmula CKD-EPI, desenvolupada per una població d'edat més avançada, és acurada per estimar els valors d'IFG en població amb IFG>60mL/min/1,73 m² (Levey *et al.*, 2009).

Fórmula MDRD

$$\text{IFG} = 186 \times [\text{creatinina sèrica (mg/dL)}]^{-1,154} \times (\text{edat})^{-0,203} \times (0,742 \text{ si dona}) \times (1,210 \text{ si raça negra})$$

Fórmula CKD-EPI

IFG= $141 \times \min(\text{Scr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Scr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{edat}} \times 1.018$ [si dona] $\times 1.159$ [si raça negra]

κ = 0.7 si dona

κ = 0.9 si home

α = -0.329 si dona

α = -0.411 si home

min= El mínim de Scr/κ o 1

max= El màxim de Scr/κ o 1

Scr= creatinina sèrica (mg/dL)

Aquestes fórmules no són adequades en cas d'índex de massa corporal extrems (<19 kg/m² o <35 kg/m²), embaràs, dietes vegetarianes o hiperproteiques, malaltia hepàtica greu, edema generalitzat, ascites i edat major de 85 anys. En aquests casos es recomana fer servir altres mètodes com l'aclariment de creatinina en orina de 24 hores (Gorostidi *et al.*, 2014; Armario *et al.*, 2012).

1.2. La malaltia renal crònica (MRC)

La malaltia renal crònica (MRC) és un problema global de salut pública amb una prevalença en augment. Durant l'última dècada s'han produït importants millores en el reconeixement de la incidència, prevalença i complicacions de la MRC degut en major part al desenvolupament de definicions de MRC per la *National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF-K/DOQI). L'adopció internacional de la classificació K/DOQI, amb èmfasis en l'estimació rutinària i automatitzada de l'IFG per la creatinina sèrica, ha millorat el reconeixement de la MRC en poblacions on era prèviament oculta, com en persones d'edat avançada i dones (Shafi i Coresh, 2010; Alcázar *et al.*, 2008).

L'increment de la consciència de la MRC i un criteri de classificació uniforme ha portat a un millor enteniment sobre l'àmplia prevalença de les malalties que acompanyen la MRC. Això ha permès el desenvolupament de mètodes per frenar la progressió de la MRC, efectuant una detecció precoç i prevenint les complicacions associades al declivi del IFG (Shafi i Coresh, 2010).

La MRC és una malaltia permanent i progressiva. La MRC es defineix com la presència d'alteracions en l'estructura o funció del ronyó durant més de tres mesos i amb implicacions per la salut. Els criteris de diagnòstic de la MRC són: la presència d'un índex de filtrat glomerular (IFG) <60 mL/min/1.73 m² o la presència demarcadors de dany renal. Els marcadors de dany renal poden ser alteracions en la composició de la sang o l'orina (electròlits, albuminúria, etc.), alteracions patològiques o estructurals detectades per histologia (malalties glomerulars, vasculars o tubulo-intersticials) o en proves d'imatge (com la malaltia poliquística

renal), o trasplantament renal previ (ja que, encara que l'IFG sigui $> 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, la majoria de pacients presenta alteracions histopatològiques i tenen un risc incrementat de mortalitat i fallada renal (KDIGO, 2013).

S'han proposat dos models, mútuament no-excloents, de com el dany en el ronyó esdevé en MRC amb èmfasi en el glomèrul i el túbul-intersticial, respectivament (Kriz i LeHir, 2005). En la primera hipòtesi, la de la hiperfiltració o sobrecàrrega, el dany en el ronyó produeix una disminució en el nombre de nefrones, i les nefrones restants (mitjançant molècules vasoactives, pro-inflamatòries i factors de creixement) manifesten un increment compensatori en la seva funció. Aquesta resposta adaptativa d'hiperfiltració produeix a llarg termini un dany glomerular que condueix a la progressiva pèrdua de la funció renal i proteïnúria (Shafi i Coresh, 2010). Alternativament, la hipòtesi de la fibrosi suggereix que una gran varietat de lesions renals inicials (genètics, tòxics, metabòlics, isquèemics, infecciosos) causen una lesió túbulo-intersticial, que produeix més inflamació i dany al túbul-intersticial, conduint a la MRC. És necessari que es perdin aproximadament tres quarts de la funció renal perquè la homeòstasi comenci a veure's afectada (Dee Silverthorn, 2014). En el 1970, Schainuck *et al.* van trobar que en biòpsies renals de pacients amb varies nefropaties, el declivi de l'IGF estava correlacionat amb la severitat del dany intersticial i no amb la severitat del dany glomerular. Altres estudis mostren com el deteriorament de la funció renal està correlacionat amb l'increment de volum i fibrosi intersticial, el descens dels capil·lars peritubulars, canvis morfològics en les cèl·lules tubulars epitelials i els nivells d'inflamació intersticial (Bohle *et al.*, 1990). Cal, doncs, assenyalar que la majoria de les nefropaties progressen cap a la pèrdua definitiva de la funció renal i que la progressió de la MRC es caracteritza per un procés inflamatori inicial, seguit per fibrosi túbul-intersticial i glomeruloesclerosi (Remuzzi *et al.*, 2006).

1.3. La fibrosi renal

La fibrosi túbulo-intersticial té un paper clau en la progressió del dany renal i és la via comú per la qual diverses patologies renals esdevenen en malaltia renal crònica avançada (Kuncio *et al.*, 1991; Harris i Neilson, 2006). En aquest procés, després de produir-se una lesió en un teixit s'activen mecanismes per procurar la seva completa reparació, tant funcional com estructural. En el ronyó, la reparació completa només es produeix en el fetus, mentre que en l'adult el ronyó es repara parcialment formant-se una cicatriu (Hewitson, 2009). Durant la reparació incorrecta es produeix un excés de teixit connectiu (format com a conseqüència del desequilibri entre la síntesi i degradació de matriu extracel·lular) no funcional que substitueix l'epiteli tubular, fent així que disminueixi la funció renal (Meran i Steadman, 2011). En els

ronyons fibròtics l'espai intersticial està omplert de material fibril·lar que principalment consisteix en col·lagen I i III, i fibronectina (Zeisberg i Neilson, 2010).

La font principal de generació de matriu extracel·lular són miofibroblasts (Zeisberg i Neilson, 2010) que poden provenir d'una gran varietat de fonts com dels fibroblasts residents, dels fibrocits en circulació i de les cèl·lules epitelials i endotelials a través del procés de transició epiteli-mesènquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT) i de transició endoteli-mesènquima respectivament (Quan, *et al.*, 2006; Wynn, 2008). Per tant, aquests processos són essencials a l'hora d'entendre els mecanismes de fibrosi renal i, per tant, de la MRC.

1.3.1 Transició epiteli-mesènquima

La transició epiteli-mesènquima (EMT) és el procés en el qual les cèl·lules de l'epiteli tubular perden marcadors epitelials, com l'E-caderina, i adquireixen marcadors de cèl·lula mesenquimal com l'actina α del múscul llis (alpha smooth muscle actin, α -SMA). Aquestes alteracions proteiques poden anar acompanyades de canvis morfològics cap a una aparença fibroblastoide, així com d'un increment de metal·loproteinases de matriu (MMP), de la capacitat migratòria i de l'acumulació de matriu extracel·lular (Liu, 2010). La disminució de l'expressió de marcadors epitelials com les unions adherents (E-cadherina i β -catenina) i les unions estretes (ZO-1, ocludines i claudines) fa disminuir el contacte entre cèl·lules i, com a conseqüència, no es poden mantenir funcions epitelials bàsiques com la polaritat o permeabilitat (Hewitson, 2009; Zeisberg i Neilson, 2010).

La EMT que té lloc en el ronyó lesionat és sovint subestimada. Una de les raons és que la conversió a fibroblast és difícil de definir per la falta d'especificitat dels marcadors fenotípics disponibles (que poden estar presents en cèl·lules inflamatòries i endotelials). Els marcadors mesenquimals comunament utilitzats inclouen: vimentina, α -sma, FSP1 (*Fibroblast-Specific Protein 1*), desmina, col·lagen I, fibronectina, N-cadherina, Snail, MMP-2 i MMP-9 (Willis i Borok, 2007; Zeisberg i Neilson, 2009). A més, les cèl·lules epitelials després de la ferida poden no completar la seva transició a fibroblasts sinó realitzar una EMT parcial, també coneguda com pre-EMT o EMT *in situ*, on les cèl·lules només canvien un o dos marcadors fenotípics (Zeisberg i Neilson, 2009; Hertig *et al.*, 2008), el que complica la seva caracterització.

Respecte al paper que juga la EMT en la MRC, cal dir que s'han trobat evidències de EMT en varis models animals de MRC amb nefrectomia obstructiva (Yang i Liu, 2001), nefropatia diabètica (Burns *et al.*, 2006), nefrorectomia 5/6, glomerulonefritis (Liu *et al.*, 2000), nefritis nefrotòxica (Zeisberg *et al.*, 2003) i nefropatia crònica de l'empelt renal (Hertig *et al.*, 2008;

Bedi et al., 2008). Com a estudi complementari, cal citar el model d'obstrucció uretral unilateral, construït per Iwano *et al.* (2002), on van demostrar com el 36% dels fibroblasts de l'espai intersticial s'havien originat a partir de cèl·lules del túbul renal proximal.

Pel que fa a estudis clínics utilitzant biòpsies humanes, aquests suggereixen que la EMT té un paper en la patogènesi de la MRC humana. Així, s'ha trobat expressió tubular de marcadors mesenquimals com la vimentina i la FSP1 en pacients amb MRC progressiva causada per nefropatia diabètica (Simonson, 2007), nefropatia IgA (Nishitani *et al.*, 2005), nefropatia lúpica (Rossini *et al.*, 2005) i nefropatia crònica de l'empelt renal (Vongwiwatana *et al.*, 2005; Hertig *et al.*, 2008). Tot això reforçaria la idea de que existeix una relació important entre EMT i MRC.

1.4. Classificació de la MRC

La pèrdua de funció renal és variable i pot ser contínua tot i una òptima teràpia mèdica (Shafi i Coresh, 2010). La malaltia renal crònica es classifica en base a la causa de la malaltia, la categoria de filtrat glomerular i la categoria d'albuminúria (KDIGO, 2013). La **Figura 3** mostra la classificació de la MRC en funció de la causa de la malaltia. Identificar la causa de la MRC és important ja que el tractament pot necessitar ser ajustat segons l'etiologia, i aquesta influencia la prognosi i la importància relativa d'un factor de risc associat a la MRC (KDIGO, 2013).

En la **Taula 1** es mostra la classificació NKF-K/DOQI (National Kidney Foundation., 2002) de la MRC segons l'índex de filtrat glomerular (IGF), així com posteriors actualitzacions. La disminució inicial de la funció renal és asimptomàtica i les manifestacions clíniques de fallada renal ocorren quan s'arriba a estadis molt avançats. A partir de l'estadi 3 és quan parlem d'insuficiència renal crònica (IRC). S'anomena insuficiència renal avançada o malaltia renal crònica avançada la darrera etapa de la malaltia, quan els ronyons no poden funcionar al nivell necessari per a les activitats habituals de la vida i els malalts han d'iniciar un tractament renal substitutiu (TRS) com la diàlisi o el trasplantament de ronyó. Els malalts poden ser receptors d'un trasplantament de ronyó en qualsevol estadi de la malaltia.

Recentment s'ha modificat la classificació de la MRC per incloure tres estadis d'albuminúria, ja que aquesta ha demostrat ser un indicador de prognosi important en nombrosos estudis (KDIGO, 2013). Mitjançant l'avaluació del quocient albúmina/creatinina (QAC) en una mostra aïllada d'orina, es classifica l'albuminúria en els següents estadis: A1<30 mg/g, albuminúria normal o lleugerament elevada; A2, 30-300 mg/g, moderadament elevada; i A3>300 mg/g, severament elevada. Això fa pensar que caldria categoritzar l'albuminúria en qualsevol estadi d'IFG.

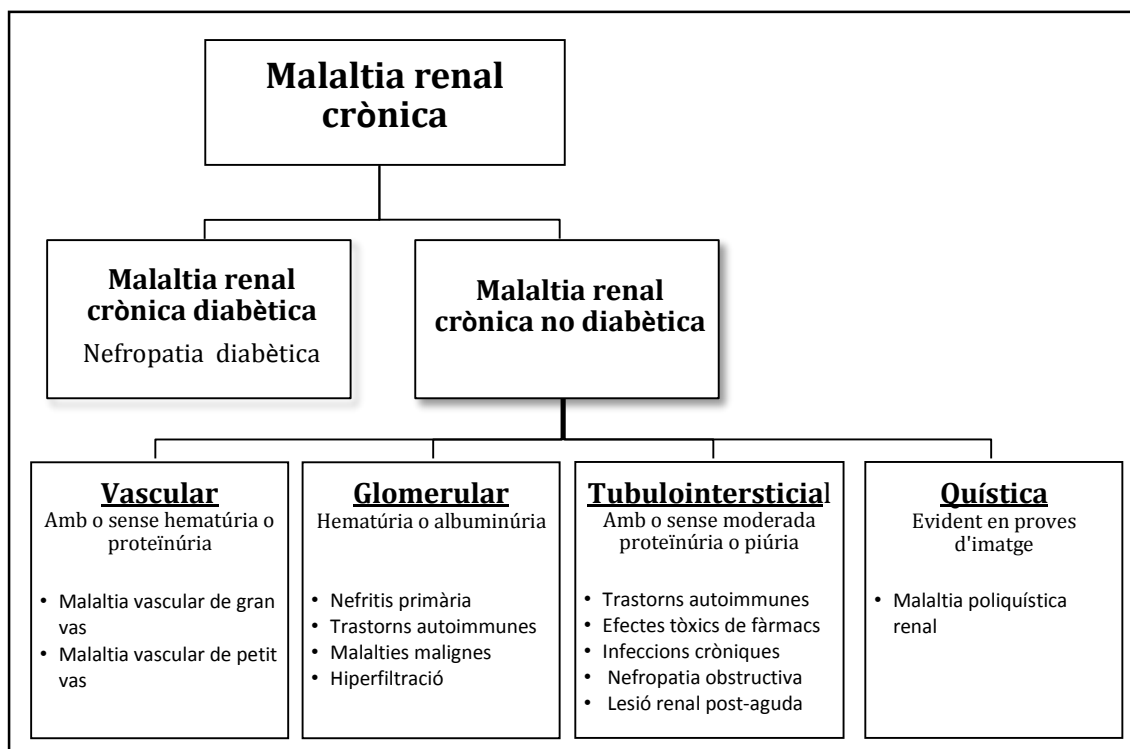


Figura 3. Classificació i causes seleccionades de la malaltia renal crònica (James *et al.*, 2010).

Taula 1. Estadis de la malaltia renal crònica segons la guia NKF-K/DOQI (National Kidney Foundation., 2002) i actualitzacions (Shafi i Coresh, 2010).

Classificació K/DOQI		Actualitzacions		
Descripció	Estadi IFG	KDIGO	CARI	NICE
Dany renal amb FG normal o augmentat	≥90			"P" si proteïnúria i indicar taxa de progressió
Dany renal amb un discret descens del FG	60-89			
Moderat descens del FG amb o sense evidència de dany renal	30-59	"T" si trasplantament renal	"P" si proteïnúria	3a (IFG 45-59) 3b (IFG 30-44)
Descens sever del FG amb o sense evidència de dany renal	15-29			
Fallada renal	<15	"D" si diàlisi		

CARI, Caring for Australians with Renal Impairment; IFG, Índex de Filtrat Glomerular (ml/min/1,73 m²); K/DOQI, National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, KDIGO, Kidney Disease Improving Global Outcomes; NICE, National Health Service-National Institute for Health and Clinical Excellence.

1.5. Epidemiologia de la MRC

La visió epidemiològica de la malaltia renal crònica ha experimentat un canvi significatiu en els últims 20 anys. Restringida inicialment a patologies d'incidència relativament baixa, com les malalties glomerulars o nefropaties hereditàries, i a un àmbit especialitzat d'atenció mèdica (nefrologia), la MRC en l'actualitat afecta a un percentatge important de la població i està relacionada amb fenòmens o malalties d'alta prevalença com l'envelliment, l'obesitat, la hipertensió arterial (HTA), la diabetis o la malaltia cardiovascular (Gorostidi *et al.*, 2014).

Les descripcions epidemiològiques de MRC (per pacients que no estan en diàlisi) majoritàriament es limiten a estimes de la prevalença, ja que la documentació de la incidència de MRC requereix establir un estat previ de no-malaltia seguit d'un llarg període d'observació amb una valoració repetida de la funció renal. En canvi, la majoria de països desenvolupats tenen dades de la incidència i prevalença de la fallada renal gràcies als registres de malalts renals en TRS (Shafi i Coresh, 2010). Els pacients amb MRC avançada inclosos en programes de TRS com diàlisi o TR es consideren la part visible de l'iceberg que constitueix el gran problema de salut pública que és la MRC (Gorostidi *et al.*, 2014).

1.5.1. Etiologia de la MRC

La MRC pot estar provocada per diferents causes com ara traumatismes, malformacions que promouen infeccions recurrents, obstruccions de les vies urinàries (per càlculs renals o tumors), diverses malalties (com la diabetis, la hipertensió, la poliquistosi renal, i malalties autoimmunes) i l'abús de medicaments (com analgèsics o antiinflamatoris) o la ingesta de productes tòxics.

Les etiologies de la MRC es determinen gràcies als registres de TRS, de manera que els pacients que no progressen cap a MRC avançada o els pacients que moren abans d'arribar a tenir MRC avançada no consten en aquests registres. La **Figura 4** mostra l'etiologia de la incidència i prevalença de malalts en TRS a Europa l'any 2012. Pel que fa a la incidència, la nefropatia diabètica i les nefropaties d'etiologia desconeguda ocupen el primer lloc de la MRC avançada (22% i 18%, respectivament), seguides de la hipertensió (11%). En relació amb la prevalença, la patologia glomerular és la causa coneguda més freqüent i afecta un 20% dels malalts (ERA-EDTA Registry, 2014).

Diversos estudis epidemiològics han demostrat un increment en el risc de tenir MRC en persones amb algunes de les següents característiques: majors de 60 anys, hipertensos,

diabètics, malaltia cardiovascular, obesitat, malalties autoimmunes, amb antecedents de insuficiència renal aguda o familiars de pacients amb insuficiència renal (Alcázar *et al.*, 2008).

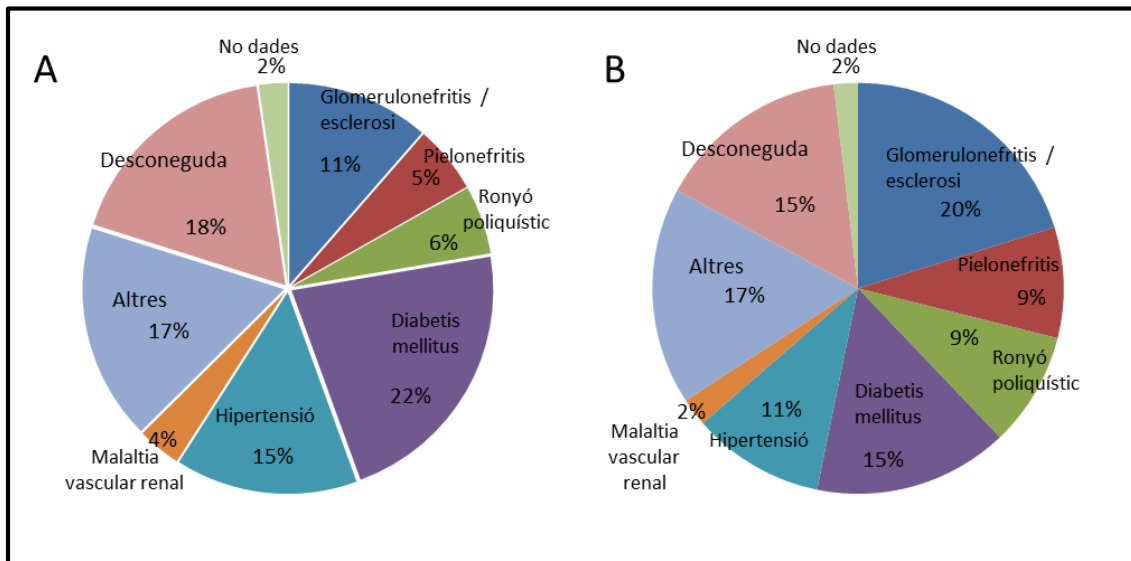


Figura 4. Etiologia de la malaltia renal crònica avançada en malalts sotmesos a tractament renal substitutiu (TRS) a Europa l'any 2012. (A) incidència i (B) prevalença del TRS (modificat del registre ERA-EDTA, 2014).

1.5.2. Incidència de la MRC

La incidència es defineix com la freqüència amb la que es desenvolupen o diagnostiquen nous casos d'una malaltia en individus que no tenien la malaltia prèviament. La incidència d'una malaltia depèn de la presència de població susceptible amb factors etiològics per a desenvolupar-la. Per exemple, la incidència de l'MRC depèn de la població amb diabetis, hipertensió i altres factors de risc. L'envelliment de la població i l'increment de població amb diabetis, obesitat i hipertensió i malalties cardiovasculars incrementa l'incidència de la MRC (Fox *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2005; Coresh *et al.*, 2007).

La incidència de MRC és difícil de determinar ja que requereix establir una població amb un estat previ de no-malaltia (funció renal normal a l'inici de l'estudi) seguit d'un llarg període d'observació amb repetides mesures de la funció renal (Shafi i Coresh, 2010). Com a resultat, hi ha pocs estudis on s'avaluï la incidència de la MRC i la majoria no poden demostrar la cronicitat (malaltia renal durant més de tres mesos).

A més a més, no hi ha una definició acceptada de la incidència de la MRC. Algunes alternatives són: (1) IFG baix (<60 mL/min/1,73 m²); (2) IGF baix o en declivi (≥25% del nivell

basal); (3) increment de la creatinina sèrica (>0,4 mg/dL); i (4) hospitalització o mort per una causa relacionada amb la MRC (Bash *et al.*, 2009).

Un total de 2.585 individus de la denominada cohort Framingham (Kannel *et al.*, 1979) van participar en un estudi per determinar la incidència de MRC en la població general en els Estats Units entre 1978 i 2001. La incidència de la MRC es va definir com IFG sota el cinquè percentil específic de cada gènere (59,25 mL/min/1,73 m² en dones i 64,25 mL/min/1,73 m² en homes). Al finalitzar l'estudi un 9,4% dels participants va desenvolupar MRC (Fox *et al.*, 2004). La incidència de la MRC (definida com a hospitalització o mort per MRC o increment de la creatinina sèrica a 0,4 mg/dL) també s'ha avaluat en 14.520 individus en l'estudi *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) en els Estats Units (The ARIC investigators, 1989). Després de 14 anys el 7.3% dels participants de l'estudi va desenvolupar MRC (Hsu *et al.*, 2005).

1.5.3. Prevalença de la MRC

La prevalença es defineix com el nombre de casos (antics o nous) d'una malaltia en una població i un temps determinat. La prevalença de la MRC depèn de la incidència i de la duració de la malaltia (temps de vida dels malalts, presència de malalties associades i mortalitat). L'augment de la incidència de la MRC i les millores en el tractament de la MRC i la malaltia cardiovascular (major causa de mort de la MRC) allarguen la vida del malalt incrementant així la prevalença de la MRC (Coresh *et al.*, 2007; Shafi i Coresh, 2010).

L'estudi EPIRCE (Otero *et al.*, 2010) descriu la prevalença de la IRC en la població general espanyola (2.746 participants i edat mitjana de 49,5 anys). La prevalença de la IRC (estadis 3-5, IGF<60mL/min) és d'un 6,83%, molt similar a la mediana reportada en una revisió sistemàtica de 26 estudis epidemiològics en tot el món (7,2%) i a la de països en el mateix entorn geogràfic (4,7-8,1%) (Zhang i Rothenbacher, 2008). Quan el quocient albúmina/creatinina (QAC) es té en compte, la prevalença incrementa fins al 9,16% de la població espanyola. Les prevalences estimades per cada estadi són: 0,99% per l'estadi 1; 1,3% per l'estadi 2; 5,4% per l'estadi 3a; 1,1% per l'estadi 3b; 0,27 per l'estadi 4; i 0,03 per l'estadi 5. Els factors de risc predictors de la IRC foren l'edat, l'obesitat i la hipertensió. A més a més, s'ha trobat una prevalença important de factors de risc cardiovascular clàssics com la dislipèmia (29,3%), obesitat (26,1%), hipertensió (24,1%), diabetis (9,2%) i tabaquisme actiu (25,5%).

1.6. Prognosi i risc de progressió

La causa de la MRC, el grau d'IFG, el grau d'albuminúria i altres factors de risc o comorbiditats són les variables que determinen el risc de complicacions de la MRC. La **Figura 5** mostra l'estratificació del risc de la MRC segons les categories de IFG i albuminúria.

				Categorías d'albuminúria (mg/g)		
				descripció i rang		
				A1	A2	A3
				normal a lleugerament elevada	moderadament elevada	severament elevada
				< 30	30-300	> 300
				Categorías de IFG (mL/3in/1,73m ²) Descripció i rang	G1	Normal o augmentat
G2	Lleugerament disminuït	60-89				
G3a	Lleuger a moderadament disminuït	45-59				
G3b	Moderat a severament disminuït	30-44				
G4	Severament disminuït	15-29				
G5	Fallada renal	< 15				

Figura 5. Prognosi de la malaltia renal crònica segons les categories de IFG i albuminúria. Risc de complicacions específiques de la malaltia renal, risc de progressió i risc cardiovascular: verd, risc de referència (no hi ha malaltia renal si no existeixen marcadors definitoris); groc, risc moderat; taronja, risc alt; vermell, risc molt alt (modificat de Levey *et al.*, 2011).

1.6.1. Progressió de la MRC

La complicació més important de la MRC és el progressiu deteriorament de la funció renal que porta o bé a la mort o a la necessitat de TRS. Com a resultat de la MRC, la mort prematura (tant per causes cardiovasculars com no cardiovasculars) és més comuna que la fallada renal (Weiner, 2007).

El descens de l'IGF i l'augment d'albuminúria incrementen la taxa de progressió i tenen un efecte sinèrgic. La progressió i l'evolució de la MRC és molt variable entre individus i, a falta d'evidències per identificar quins seran els malalts que tindran una progressió més ràpida, es recomana l'estimació periòdicament de l'IGF i albuminúria per estimar si hi ha progressió (KDIGO, 2013).

La progressió es defineix com el descens sostingut de l'IGF > 5 mL/min/1,73 m² a l'any o al canvi de categoria de l'IGF (sempre que vagi acompanyada d'una pèrdua de l'IGF ≥ 5 mL/min/1,73 m²). En cas de progressió s'han d'identificar factors de progressió com l'etiologia

de la MRC, l'edat, el gènere, l'ètnia, el tabaquisme, l'obesitat, la hipertensió arterial (HTA), la hiperglucèmia, dislipidemia, malaltia cardiovascular (MCV) prèvia i exposició a agents nefrotòxics i tractar aquells factors que siguin modificables (KDIGO, 2013).

1.6.2. Prevenció de la progressió de la MRC

Tractar els factors de risc de progressió de la MRC, que són modificables, és essencial per a disminuir la velocitat amb la que la malaltia avança i retardar la necessitat d'un tractament renal substitutiu. Es recomanen les següents actuacions en els malalts de MRC (KDIGO, 2013):

- Bloqueig del sistema renina-angiotensina-aldosterona per reduir la hipertensió arterial i la proteïnúria.
- Intensiu control glucèmic per tal de mantenir l'hemoglobina glucosilada (HbA1c) < 7%.
- Control de la dieta: segons la severitat de la MRC els pacients hauran de modificar la quantitat de sal, fosfat, potassi i proteïnes ingerides. Com a conseqüència de les restriccions en la dieta, comorbiditats i tractament renal substitutiu, alguns pacients poden necessitar complements alimentaris.
- Estil de vida: es recomana que els pacients amb MRC deixin de fumar, facin exercici físic i redueixin l'índex de massa corporal (BMI) a uns nivells saludables (entre 20-25 kg/m²).
- Ús de medicaments: la dosi s'ha d'ajustar segons l'IGF del pacient i s'han d'evitar medicaments nefrotòxics o discontinuar-ne l'ús temporalment.

1.7. Complicacions associades a la MRC

Les persones amb MRC tenen tendència a desenvolupar una gran varietat de complicacions que reflecteixen la pèrdua de funció renal. La incidència i la prevalença d'aquestes complicacions incrementa a mesura que la MRC avança (**Taula 2**). El tractament d'aquestes complicacions també pot frenar la progressió de la MRC.

1.7.1. Anèmia

L'anèmia es defineix com la reducció de la concentració d'hemoglobina en sang, de l'hematòcrit o de la concentració d'hematies. L'anèmia associada a la MRC deriva principalment d'una producció insuficient d'hormona eritropoetina en els ronyons.

Els ronyons són la principal font d'eritropoetina en adults. En una persona sana, quan els nivells d'oxigen a la sang disminueixen, el ronyó estimula l'alliberament d'eritropoetina i aquesta incrementa el nivell d'oxigen en sang estimulando la producció dels glòbuls vermells a la

medul·la òssia. Quan la MRC progressa, la producció d'eritropoetina als ronyons disminueix, i per compensar els baixos nivells d'oxigen en sang es produeix un increment compensatori de la funció cardíaca (increment del ritme cardíac i volum sistòlic). Com a part del procés compensatori, la geometria del ventricle esquerre esdevé alterada ja que es produeix un increment de volum del ventricle al final de la diàstole i un engruiximent de la paret del ventricle esquerre. La hipertròfia del ventricle esquerre és un marcador potent de morbi-mortalitat cardíaca (Weiner, 2007).

Taula 2. Prevalença de les complicacions de la malaltia renal crònica segons l'IFG (modificat de KDIGO, 2013).

Complicació	IFG (mL/min/1,73 m ²)				
	≥ 90	60-89	45-59	30-44	< 30
Anèmia	4	4,7	12,3	22,7	51,5
Hipertensió	18,3	41	71,8	78,3	82,1
Deficiència de vit D	14,1	8,4	9,4	18,1	31,5
Acidosis	11,2	8,4	9,4	18,1	31,5
Hiperfosfatèmia	7,2	7,4	9,2	9,3	23
Hipoalbuminèmia	1	1,3	2,8	9	7,5
Hiperparatiroidisme	5,5	9,4	23	44	72,5

Vit D, vitamina D. Els resultats s'expressen com al percentatge de la població amb MRC.

Una altre causa de l'anèmia en la MRC és la resposta eritropoètica deficient a l'eritropoetina endògena i exògena degut a "l'ambient urèmic" (que conté potencials inhibidors de l'eritropoesi: com poliamines, hormona paratiroidal, citocines inflammatòries). L'anèmia també pot ser causada per deficiència de ferro, vitamina B12, deficiència de folat, hemorràgies, hemòlisi, infeccions o inflamacions, etc. (Brunelli i Berns, 2010). L'anèmia es corregeix amb d'administració de eritropoetina recombinant i suplementes de ferro si són necessaris.

1.7.2. Alteracions del metabolisme mineral ossi

Les alteracions en el metabolisme mineral ossi poden començar en els graus inicials de la MRC i augmentar a mesura que la malaltia empitjora (KDIGO, 2013). Alteracions en els nivells de calci, fòsfor, hormona paratiroidal (PTH) i vitamina D produeixen osteodistròfia renal i calcificació vascular o d'altres teixits tous.

En persones amb els ronyons sans, els nivells de fòsfor i calci a la sang es mantenen gràcies a la interacció de tres hormones: la PTH, el calcitriol (metabòlit actiu de la vitamina D), i les

fosfatonines (sent el factor de creixement de fibroblasts 23, FGF-23, el millor descrit). Els ronyons tenen un paper crític en el manteniment de les concentracions sanguínies de fòsfor i de calci, ja que converteixen la vitamina D en calcitriol i responen a la PTH i el FGF-23 (Moe, 2010). Durant el progrés de la MRC, el cos intenta mantenir els nivells de calci i fòsfor a una concentració normal modificant l'absorció intestinal i l'excreció sanguínia. Donat que els ossos són el principal magatzem de calci i fòsfor del cos, a cert punt de la malaltia, la resposta homeostàtica pot causar anomalies en el remodelatge, la mineralització, el volum, el creixement lineal o la duresa òssia. Els canvis bioquímics i les anomalies òssies contribueixen a la calcificació extra esquelètica, que pot ocórrer en la còrnia, les articulacions, el sistema pulmonar, el sistema cardíac i el sistema vascular (Moe, 2010).

La prevenció i tractament de les alteracions del metabolisme mineral ossi són essencials per a millorar la qualitat de vida i longevitat dels malalts. Per tractar la hiperfosfatèmia es recomana fer una dieta baixa en fòsfor i utilitzar compostos quelants de fòsfor per tal de reduir la seva absorció intestinal. També es poden utilitzar compostos bifosfonats per el tractament de l'osteoporosi i suplementes de calci o vitamina D, quan el malalt té una deficiència (KDIGO, 2013).

1.7.3. Malaltia cardiovascular

La malaltia cardiovascular (MCV) és la principal causa de morbi-mortalitat de la MRC. Dintre els pacients amb MRC hi ha una gran prevalença de factors de risc cardiovascular com ara l'edat, la diabetis, la hipertensió, l'anèmia, la inflamació, les alteracions en el metabolisme mineral ossi o la dislipidèmia (alteració del metabolisme dels lípids). La majoria de factors de risc de la MCV porten a una aterosclerosi, arteriosclerosi, cardiomiopatia o una combinació d'aquestes condicions (Weiner, 2007). Les persones amb MRC tenen més probabilitat de tenir un accident cardiovascular que de progressar cap a MRC avançada, tenen pitjor prognosi després de tenir un infart de miocardi i tenen major risc de tenir un infart de miocardi recurrent, una fallada cardíaca o mort cardíaca sobtada (KDIGO, 2013).

Els pacients amb MRC en risc de patir un accident ateroscleròtic han de rebre una teràpia antiplaquetària. Per modificar els factors de risc de la MCV s'ha de realitzar les següents accions: deixar de fumar, fer exercici físic, reduir el pes corporal, reduir els lípids amb ajuda d'estatines, fer un control òptim de la diabetis, la pressió sanguínia i l'anèmia (Weiner, 2007).

1.7.4. Malnutrició

La malnutrició és comú en malalts amb MRC i està associada a taxes majors de morbiditat i mortalitat (National Kidney Foundation, 2005). El ronyó és un dels principals òrgans involucrats en el balanç nutricional del cos. Pot tenir un paper important en el metabolisme dels carbohidrats en condicions fisiològiques i patològiques (Gerich *et al.*, 2001) i, a més a més, s'encarrega de la síntesi, degradació, filtració, reabsorció i excreció d'aminoàcids (Chung *et al.*, 2012). En la MRC els malalts tenen un increment d'aminoàcids no essencials, triglicèrids i lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) i una disminució d'aminoàcids essencials i lipoproteïnes de baixa (LDL) i d'alta densitat (HDL) (Ikizler i Pupim, 2010). Un gran percentatge de pacients amb MRC tenen nefropatia diabètica i, a més a més, els pacients no diabètics tenen sovint intolerància a la glucosa causada per resistència a la insulina, la qual dóna lloc a una disminució del magatzem de glucosa en músculs perifèrics, una disminució en l'oxidació de la glucosa, una supressió defectuosa de la producció endògena de glucosa i una secreció anormal d'insulina (Rigalleau i Gin, 2005). A més a més, els malalts amb MRC tenen una alta incidència de deficiències en vitamines degut a restriccions dietàries relacionades amb la MRC, anorèxia, producció alterada i interferències en l'absorció causades per alguns medicaments.

La malnutrició pot estar causada per diversos factors com ara: l'anorèxia causada per la urèmia, la inflamació crònica, acidosi metabòlica, alteracions endocrines (resistència a la insulina, hiperparatiroidisme) i comorbiditats (MCV, diabetis, infeccions) (National Kidney Foundation, 2005). També contribueixen a la malnutrició factors associats al tractament de la hemodiàlisi i la diàlisi peritoneal com: la dosi inadequada de diàlisi, la pèrdua d'aminoàcids, la bio-incompatibilitat de membrana HD o la sensació de sacietat produïda pel líquid de dialitzat en la cavitat peritoneal (Ikizler i Pupim, 2010).

Per controlar la malnutrició s'ha de controlar els canvis de pes, i els símptomes de nàusees i anorèxia, així com també realitzar determinacions dels nivells d'albumina i creatinina (i prealbumina i transferrina, si fos necessari) freqüents. En cas que es detecti malnutrició i calgui una intervenció, es pot incrementar la dosi de proteïnes i calories ingerides, incrementar la dosi de diàlisi, suplementar oral o intradialíticament al malalt, tractar l'acidosi, la diabetis mellitus, la inflamació i les MCV. L'ús de factors anabòlics i estimulants de la gana està encara en fase experimental (Ikizler i Pupim, 2010).

1.7.5. Altres complicacions de la MRC

La prevalença i severitat de l'**acidosi** metabòlica incrementa a mesura que el filtrat glomerular disminueix, degut a la incapacitat d'eliminar l'àcid pels ronyons. El suplement amb bicarbonat oral és recomanat a les persones amb una concentració de bicarbonat sèrica <22 mmol/L per tal de mantenir les concentracions sèriques en un rang normal.

En la MRC la **inflamació** crònica és comú en malalts tant en diàlisi com sense diàlisi. La inflamació és deguda a varis factors com: l'entorn urèmic, els alts nivells de citoquines pro-inflamatòries en circulació, l'estrès oxidatiu i carbonil, el descens d'antioxidants, la malnutrició, les infeccions recurrents, la sobrecàrrega de volum i les comorbiditats (Kovesdy i Kalantar-Zaddeh, 2010). Altres factors, relacionats amb la hemodiàlisi i la diàlisi peritoneal, que poden produir inflamació són: l'exposició a tubs i membranes d'hemodiàlisi (Memoli *et al.*, 2002), qualitat pobre del líquid de diàlisi que pot tenir contaminants (Schiffl *et al.*, 2001), i presència de catèters intravenosos que incrementa el risc a patir infeccions (Hung *et al.*, 2008).

La prevalença de **depressió** (20-30%), **deficiència neurocognitiva** (30%-80%) i **trastorns del son** (80% en MRC avançada) en la MRC són elevades i varien molt en funció del mètode d'avaluació i la població utilitzada (Beaulieu *et al.*, 2010; Cukor *et al.*, 2010). Els pacients que presenten aquests trastorns tenen un major risc de mortalitat i de no compliment del tractament de la MRC (com la diàlisi, la medicació, les restriccions dietàries) (Benz *et al.*, 2000; Hedayati *et al.*, 2008; Hain, 2008).

La síndrome urèmica és atribuïda a la retenció de compostos que en condicions normals serien excretats per la orina o metabolitzats en els ronyons. Aquests compostos s'anomenen soluts urèmics o toxines urèmiques quan interaccionen negativament amb funcions biològiques (Vanholder *et al.*, 2003). En el 2003, l'European Uremic Toxin Work Group (EUtox) va generar una recopilació dels soluts de retenció urèmica descrits fins aleshores, identificant més de 90 compostos diferents (Vanholder *et al.*, 2003). Des de llavors s'han identificat 56 compostos addicionals (Vanholder *et al.*, 2008; Duranton i Cohen, 2012). Una gran part d'aquests compostos, com els compostos de mida major o els compostos units a proteïnes, no poden ser eliminats durant la diàlisi ja que el porus de la membrana és més petit que el compost (Vanholder *et al.*, 2008). L'ús de diàlisi utilitzant membranes amb un porus més gran i/o tècniques convectives (OL-HDF) sembla que podria ajudar a eliminar algunes d'aquestes molècules (Vanholder *et al.*, 2008). Buscar noves estratègies d'eliminació de soluts alternatives, com l'adsorció o convecció, i teràpies farmacològiques per restaurar les vies de senyalització

activades o bloquejades per les toxines urèmiques és fonamental per millorar la salut dels pacients en diàlisi i d'aquells pacients amb MRC progressiva.

1.8. Tractament renal substitutiu

Els malalts que tenen malaltia renal crònica avançada (estadi 5 de l'IFG) necessiten un tractament renal substitutiu (TRS) per a mantenir-se en vida. Per això durant l'estadi 4 de la malaltia se'ls ha de preparar per a la fallada renal. El malalt ha d'estar informat de les modalitats TRS disponibles (hemodiàlisi (HD), diàlisi peritoneal (DP) o trasplantament de ronyó (TR) si disposa de un donant viu) i escollir la més adequada per a ell (segons les seves necessitats, estil de vida i/o requeriments mèdics) amb temps per fer els preparatius necessaris. En cas de diàlisi s'ha de preparar l'accés vascular amb temps adient perquè el pacient pugui tenir un accés permanent funcional abans de l'inici de la diàlisi. La fístula arteriovenosa (unió d'una artèria i una vena) s'haurà de realitzar 6 mesos abans de l'inici de l'HD perquè tingui temps a madurar i l'empelt arteriovenós s'ha de realitzar entre 3 i 6 setmanes abans de la HD. En el cas de diàlisi peritoneal, el catèter s'haurà de posar dues setmanes abans del inici de la diàlisi (National Kidney Foundation, 2006).

El cost del tractament dels malalts en l'últim estadi de la malaltia és molt elevat i l'any 2010 1.829 milions d'Euros del pressupost espanyol de sanitat es van destinar al tractament aquests pacients (Villa *et al.*, 2011). Dels quals, 1.327 milions d'euros van ser destinats als pacients en hemodiàlisi, 109 als pacients en prediàlisi i 393 als pacients amb trasplantament de ronyó. L'any 2010, el cost anual (sense afegir els costos indirectes) per pacient (incidència i prevalença) va ser de 2.651 € i 37.968 € en HD, 1.808 i 25.826 € en DP i 38.313 € i 6.283 € en TR (Villa *et al.*, 2011). El primer any de TR és més car que el primer any de HD i DP, però posteriorment surt més rentable que els altres tractaments.

1.8.1. Trasplantament renal

El trasplantament de ronyó (TR) és actualment el millor tractament pels pacients en l'últim estadi de la malaltia ja que és el TRS amb major probabilitat de supervivència dins la població espanyola (REER, 2013). El nombre de TR realitzats a Espanya ha incrementat notablement en els últims anys, passant de 1.931 TR realitzats l'any 2000 a 2.552 TR realitzats l'any 2013 (REER, 2013). Tot i així aquesta modalitat de TRS és la que menys incidència té (4,3% del total de la població espanyola en TRS) degut a la manca de ronyons disponibles per a tots els malalts amb MRC. Els malalts que tinguin un donant viu disponible podran realitzar el TR abans d'arribar a

l'últim estadi de la malaltia. En canvi, els malalts que no disposin de donant viu, quan iniciïn la diàlisi seran inscrits a la llista d'espera per rebre un TR de donant cadàver.

El trasplantament de ronyó és un tractament, no una cura. Els malalts amb TR han de prendre medicació i continuar les visites al nefròleg. Les persones amb TR tenen més possibilitats de patir una fallada renal que una persona que no hagi tingut MRC. Alguns immunosupressors poden ser nefrotòxics (Betton *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2015; Nakamura *et al.*, 2015), genotòxics i cancerígens (Robson *et al.*, 2005; Rath i Oliveira-Frick, 2009; Gallagher *et al.*, 2010). L'any 2013 més d'un 20% de pacients en TR van morir per càncer mentre que en pacients en DP i HD la mortalitat per càncer va ser menor al 10% (REER, 2013).

1.8.2. Diàlisi

La diàlisi és una tècnica de depuració de la sang extrarenal que supleix parcialment les funcions renals d'excretar soluts i regular l'equilibri àcid-bàsic i electrolític. No supleix però les funcions endocrines ni metabòliques renals (Lorenzo-Sellarés, 2012).

El moment d'iniciar la diàlisi ve donat per la presència d'indicadors associats al síndrome urèmic (pericarditis, pèrdua muscular, encefalopatia, neuropatia, malnutrició, pèrdua de pes, diàtesi hemorràgica o nàusees i vòmits) i altres indicadors clàssics aguts com acidosi metabòlica severa, anomalies d'electròlits i sobrecàrrega severa de fluid corporal. La visita freqüent a urgències per una hipertensió no controlada o un edema pulmonar associat a l'empitjorament de la funció renal, la pèrdua de gana o l'empitjorament de la capacitat cognitiva són indicadors addicionals menys tangibles per el inici de la diàlisi (Rosansky *et al.*, 2009).

El procés de diàlisi es basa en el moviment de soluts (com la creatinina, la urea i diferents ions) i d'aigua entre dos compartiments líquids (la sang i el líquid de diàlisi) a través d'una membrana semipermeable. Aquesta membrana permet el pas de molècules petites i mitjanes, però no permet el pas de proteïnes ni cèl·lules sanguínies ja que són més grans que el porus de la membrana. La **Figura 6** mostra els dos principis bàsics que permeten l'eliminació d'aquestes substàncies: la difusió i la ultrafiltració (o transport per convecció). La difusió consisteix en el transport passiu dels soluts a través de la membra i es produeix gràcies a la diferència de concentració entre els gradients. Amb aquesta tècnica es transfereixen els soluts de mida petita i gran mobilitat, en canvi l'aigua i els soluts més grans i de poca mobilitat s'eliminen millor per convecció. La convecció permet el pas d'aigua i soluts a través de la membrana de

diàlisi gràcies a una pressió hidrostàtica (en hemodiàlisi) o osmòtica (en diàlisi peritoneal) (Lorenzo-Sellarés, 2012).

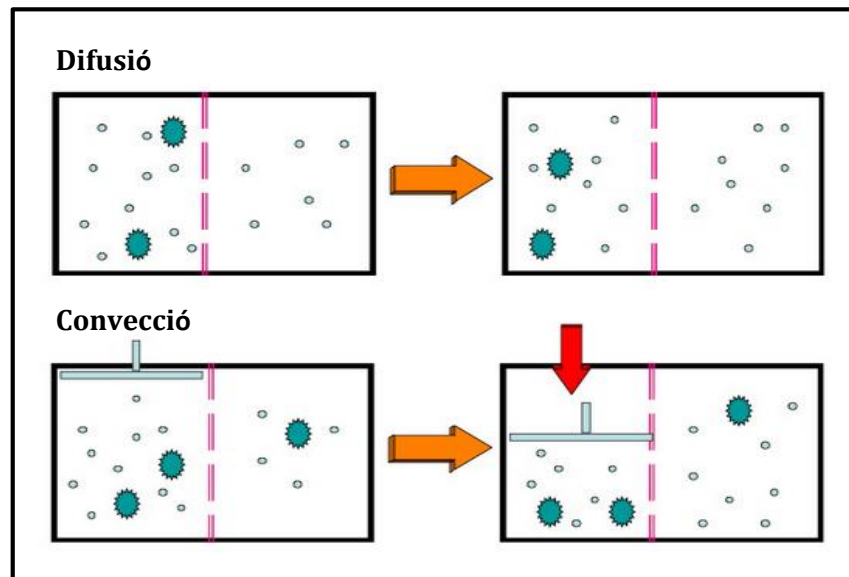


Figura 6: Esquema del mecanisme de difusió i convecció per pressió hidrostàtica (modificat de Lorenzo-Sellarés, 2012).

La diàlisi es pot realitzar de manera extracorpòrea utilitzant membranes artificials o dintre del propi cos, utilitzant el peritoneu com a membrana de diàlisi (diàlisi peritoneal).

1.8.2.1. Diàlisi peritoneal

En la diàlisi peritoneal (DP) s'utilitza el peritoneu, que és la membrana que recobreix l'abdomen, com a membrana natural per filtrar la sang. La **Figura 7** mostra un esquema del procés de diàlisi peritoneal. En la diàlisi peritoneal s'introdueix, mitjançant un catèter, la solució de diàlisi en l'abdomen. L'excés de líquid i de soluts de la sang difonen a través del peritoneu cap al líquid de diàlisi el qual és drenat al cap d'unes hores. Quan el procés ha acabat es torna a començar omplint l'abdomen amb solució de diàlisi neta. La diàlisi es realitza contínuament al llarg del dia. Les persones obeses o que han patit una cirurgia abdominal prèvia poden tenir dificultats a l'hora de implantar el catèter abdominal.

Existeixen diferents mètodes i règims de diàlisi peritoneal. Els més comuns són la diàlisi peritoneal ambulatoria continua (DPAC) i la diàlisi peritoneal cíclica contínua (DPCC). En la DPAC no calen màquines de diàlisi. La solució de diàlisi es troba en una bossa a l'alçada de l'espatlla del malalt, el qual es pot dialitzar mentre fa les seves activitats diàries com anar a la

feina o a l'escola. La DPCC es realitza a casa mitjançant una màquina (ciclador) que realitza de 3 a 6 intercanvis nocturns mentre el malalt dorm i un intercanvi diürn de llarga durada (12-14h) (Coronel Díaz i Macía Heras, 2012).

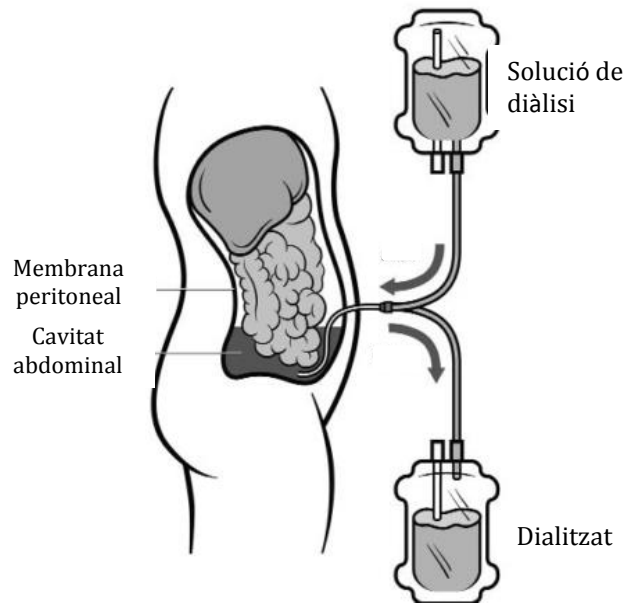


Figura 7: Esquema del procés de diàlisi peritoneal (Modificat de National Kidney Foundation, 2007).

Les infeccions són la segona causa de mort en els pacients en diàlisi peritoneal (REER, 2013). Les infeccions en la cavitat peritoneal (peritonitis) i la infecció del catèter és comú en aquests pacients. Aquesta infecció pot comportar l'extracció del catèter per a la curació, el pas a hemodiàlisi (temporal o permanent), hospitalitzacions i mort (Coronel Díaz i Macía Heras, 2012). La incidència de peritonitis ha passat de varis episodis per pacient i any a un episodi per pacient cada dos anys o més. Això ha estat degut a les millores en prevenció d'infeccions del catèter, el millor entrenament dels malalts i l'ús de noves solucions de diàlisi més biocompatibles que milloren l'estat de defenses peritoneals (Li *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2012).

1.8.2.2. Diàlisi extra-corpòria

La diàlisi extra-corpòria utilitza una membrana artificial per eliminar les substàncies de rebuig i excés de fluid acumulat en els malalts. La **Figura 8** mostra un esquema amb les parts principals del sistema de hemodiàlisi. La sang surt del malalt per un accés vascular i, per una línia sanguínia arterial, és bombejada cap el dialitzador on es neteja. Un cop neta retorna al malalt per una línia sanguínia venosa després de passar per un detector d'aire venós i

atrapador de bombolles. La pressió de sang en el circuit sanguini i la pressió i temperatura del líquid de diàlisi està controlada en tot moment.

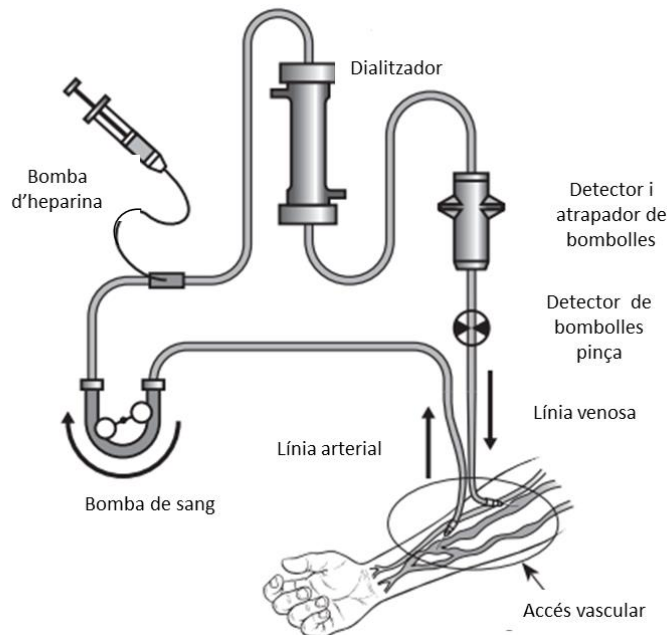


Figura 8. Esquema de les parts principals del procés d'hemodiàlisi (modificat del National Kidney Foundation, 2013)

En el dialitzador els soluts difonen cap al líquid de diàlisi (o dialitzat) a través d'una membrana semipermeable artificial. La difusió depèn de la permeabilitat de la membrana, la seva àrea i del gradient de concentració de soluts entre la sang i el dialitzat. La circulació del líquid de diàlisi només un cop i a contracorrent permet que les concentracions de soluts entre els dos compartiments no arribi a igualar-se (Lorenzo-Sellarés, 2012). L'augment mecànic de la pressió en el compartiment sanguini, força el pas d'aigua i soluts de mida mitjana o poca mobilitat cap al líquid de diàlisi (o ultrafiltrat). Aquests soluts també es poden eliminar mitjançant la seva adsorció a la paret de la membrana gràcies a interaccions hidròfobes, electrostàtiques i d'enllaços iònics. Com l'adsorció és difícil de quantificar i regular, per augmentar la transferència de soluts s'ha de recórrer a procediments que potenciïn la difusió i convecció (Fernández i Teruel, 2012).

L'eficiència de la diàlisi es mesura mitjançant el percentatge de reducció de la urea (PRU) o amb el Kt/V_{urea} (eliminació de la urea multiplicat per la duració de la diàlisi i normalitzat per el volum de líquid en el cos). L'ús del Kt/V per mesurar l'adequació de la diàlisi ha ajudat a millorar l'eficàcia i a estandarditzar el procediment. Malgrat això, l'ús de tècniques convectives i les membranes d'alta eficiència i alta permeabilitat fan que el model cinètic de la urea no

sigui representatiu de la depuració de soluts de major mida, que poden tenir efectes deleteris en la morbiditat i mortalitat dels pacients. És per això que calen nous marcadors de les taxes d'eliminació de soluts de mida major. Tot i així el Kt/V segueix sent un marcador basal útil (Barroso, 2007; Eloit *et al.*, 2013; Vanholder *et al.*, 2015).

1.8.2.2.1. Tècniques de diàlisi extra-corpòria

Les tècniques de diàlisi es classifiquen en dos grups segons predomini el principi de difusió (hemodiàlisi) o el principi de convecció (tècniques convectives).

L'**hemodiàlisi** es pot realitzar en un centre de diàlisi o a casa. La **hemodiàlisi convencional** consisteix en 3 sessions de diàlisi a la setmana de 4 hores cadascuna. Existeixen també altres règims de diàlisi com la diàlisi diària, on es realitzen sessions curtes (1-2 hores) 5 ó 6 cops per setmana o la diàlisi nocturna on es realitzen sessions de diàlisi lentes i llargues (6-8 hores) mentre el malalt dorm 3 cops per setmana.

Les **tècniques convectives** utilitzen una membrana de gran permeabilitat i realitzen una ultrafiltració superior a la necessària per eliminar l'excés de líquid acumulat pel malalt durant les sessions de diàlisi. L'excés de volum extret s'ha de reposar amb líquid de substitució de composició fisiològica. En la convecció clàssica el líquid de reposició és un bany de diàlisi que s'esterilitza prèviament i es guarda en bosses, mentre en la convecció en línia s'utilitza el propi bany de diàlisi prèviament tractat, que va generant el monitor de diàlisi. Les tècniques convectives poden utilitzar exclusivament el procés de convecció (com l'hemofiltració) o ser tècniques mixtes que utilitzin la convecció juntament amb la difusió (com l'**hemodiafiltració**, HDF).

L'**hemodiafiltració online** és capaç d'eliminar toxines de pes molecular mitjà (< 40 kD), com la β -2-microglobulina, que difícilment són remogudes per difusió (Schiffl, 2007). En els pacients en hemodiàlisi la β -2-microglobulina s'agrega en fibres amiloides insolubles que es dipositen en les articulacions dels malalts. La HDF també millora l'eliminació de fòsfor ja que al ser un ió petit està rodejat de molècules d'aigua el seu perfil d'eliminació és similar al de les molècules de mida mitjana i, per tant, difícil d'eliminar per hemodiàlisi (Schiffl, 2007; Grooteman, 2012). Els nivells de la β -2-microglobulina prediuen la mortalitat en els pacients en diàlisi (Cheung *et al.*, 2006) i l'augment d'eliminació de toxines en la HDF es creu que pot millorar la supervivència i reduir les comorbiditats dels malalts. Alguns estudis troben que els malalts en HDF tenen una major supervivència que els malalts en HD (Canaud *et al.*, 2006; Panichi *et al.*, 2008; Vilar *et al.*, 2009; Maduell *et al.*, 2013) mentre en altres no s'observen diferències

(Locatelli *et al.*, 2010; Grooteman, 2012; Ok *et al.*, 2013). En canvi, l'augment de volum de substitució sí que està associat amb una menor mortalitat en els pacients en HDF (Mostovaya *et al.*, 2014).

1.8.2.2.2. Membranes de diàlisi

Les principals diferències entre els dialitzadors són el disseny geomètric de la membrana (en placa o capil·lars), l'àrea de la seva superfície i la seva composició. L'augment de porositat, la disminució en el gruix i l'augment de l'àrea de la membrana incrementaran l'eliminació de soluts (Yeun i Depner, 2010).

Les membranes es poden classificar en funció del material de que estan fetes i les seves característiques i propietats (biocompatibilitat, permeabilitat, eficiència depuradora, polaritat, propietats hidrofíliques i hidrofòbiques, etc.). La classificació més utilitzada en la clínica és segons la seva composició i permeabilitat.

Composició

Hi ha dues classes principals de material de membranes: les membranes cel·lulòsiques i les membranes sintètiques.

Les **membranes de cel·lulosa** (cuprofán) tenen grups hidroxils lliures, que contribueixen a la seva capacitat hidrofílica i bioincompatibilitat. En les membranes hidrofíliques es crea una unió íntima entre el polímer i les molècules d'aigua formant-se un medi homogeni que permet una difusió òptima (SEN, 1999). Malgrat tot això, la membrana interacciona amb les cèl·lules sanguínies i proteïnes activant el complement. En general, quant més hidrofílica és una membrana major és el transport difusiu i menor la biocompatibilitat (Martín-Malo i de Francisco, 2012). Per intentar millorar la compatibilitat s'han creat membranes de cel·lulosa substituïda que substitueixen (amb major o menor mesura) els radicals hidroxil amb radicals amino terciaris (hemofán) o acetat (acetat o triacetat de cel·lulosa). Les membranes de triacetat de cel·lulosa tenen gairebé tots els grups hidroxil substituïts i és la única membrana cel·lulòsica que pot tenir una alta permeabilitat.

Les **membranes sintètiques** (fetes de polímers com la polisulfona, poliamida, policarbonat, polimetilmetacrilat, etc) tot i ser més gruixudes, són més permeables que les membranes cel·lulòsiques i permetent una major eliminació de soluts i d'aigua (Yeun i Depner, 2010). Aquestes membranes tenen una matriu esponjosa central (que els confereix resistència i determina les propietats del transport difusiu) que està recoberta per dues pel·lícules poroses que poden ser hidrofíliques o hidrofòbiques (les quals determinen el transport convectiu). Les

membranes hidrofòbiques (polisulfona, poliamida, polimetilmetacrilat) no interaccionen amb l'aigua, adsorbeixen proteïnes, són més poroses, tenen un coeficient d'ultrafiltració més elevat i són més biocompatibles (Martín-Malo i de Francisco, 2012). Les membranes hidrofòbiques poden ser d'alta o baixa permeabilitat.

Permeabilitat de la membrana

La **permeabilitat a l'aigua** (i als soluts que l'acompanyen) ve determinada pel coeficient d'ultrafiltració (kUf, que és el número de mil·lilitres de fluid per hora que travessen la membrana per mil·lilitre de mercuri de gradient de pressió transmembrana). Existeixen membranes de baixa permeabilitat (o de baix-flux, kUf <10-12 mL/hora/mm Hg), permeabilitat intermèdia (kUf =12-20) i permeabilitat alta (o d'alt-flux, kUf >20). Les membranes d'alta permeabilitat permeten l'eliminació de molècules d'alt pes molecular (com la β -2-microglobulina) però tenen l'inconvenient que poden eliminar molècules com l'albumina, el que pot agreujar els problemes de malnutrició dels malalts amb un nivell baix d'albumina sèrica (Martín-Malo i de Francisco, 2012). En canvi, en malalts amb uns nivells inicials d'albumina dins del rang normal l'ús de membranes d'alta permeabilitat pot ser beneficiosa ja que permet l'eliminació de toxines urèmiques unides a l'albumina i proteïnes oxidades (Krieter i Canaud, 2003).

La **permeabilitat als soluts** ve determinada per l'eficàcia depuradora de la membrana mesurada pel coeficient de transferència de masses (KoA) que és el producte de la permeabilitat del dialitzador (Ko) per la seva superfície (A) mesurat per mil·lilitres per minut (Lorenzo-Sellarés, 2012). El KoA és modulats per la porositat i el gruix de la membrana i és dependent de la mida del solut i del flux de sang i líquid de diàlisi (Martín-Malo i de Francisco, 2012). Segons l'eficàcia depuradora trobem membranes de baixa eficàcia (KoA<400 mL/min), eficàcia moderada (KoA=400-700) i alta eficàcia (KoA >700).

Biocompatibilitat

El contacte de la sang amb la membrana de diàlisi i altres components del circuit extracorpori pot produir una resposta inflamatòria organitzada. Els principals mecanismes que modulen la biocompatibilitat són la transformació de les proteïnes plasmàtiques i l'activació de les cèl·lules sanguínies.

L'estructura polisacàrida de les membranes, en concret dels grups hidroxil produeix l'**activació del complement** per la via alternativa. L'alliberació d'anafilotoxines (C3a, C5a) i altres productes biològicament actius produeix l'activació de leucòcits perifèrics, l'alliberament de **β -2-microglobulina** per les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, la **producció de**

citocines (IL-1, IL-6, TNF) pels monòcits i l'alliberament d'**espècies reactives d'oxigen** (Reactive oxygen species, ROS). Al mateix temps es dona una **leucopènia** transitòria (deguda a una leuco-agregació pulmonar) que s'ha relacionat amb **alteracions dels receptors de superfície dels neutròfils**. La interacció de la sang amb la membrana de diàlisi produeix l'**activació de la via intrínseca de la coagulació** i una major activació plaquetària, així com l'activació de la **fibrinòlisis** per l'alliberament de l'activador tissular plasminogen (Chanard *et al.*, 2003; Martín-Malo i de Francisco, 2012).

Una membrana és més biocompatible com menys reaccions adverses produeixi. Les membranes de cel·lulosa són altament bioincompatibles mentre que les membranes de cel·lulosa sintètica i substituïda són bioincompatibles. Les membranes de triacetat de cel·lulosa i algunes membranes sintètiques (com el policarbonat) tenen una biocompatibilitat intermèdia mentre que altres membranes sintètiques (poliamida, polisulfona) són biocompatibles.

1.8.3. Complicacions de la diàlisi

Durant les sessions de diàlisi o en el període interdialític els malalts poden experimentar les següents complicacions (Arduino *et al.*, 2010; Liangos i Jaber, 2010; Arenas Jiménez *et al.*, 2012):

- **Hemorràgies** internes (per excés d'heparina) o externes (per desconexió de la via). Els pacients poden experimentar una **anèmia** greu (per la pèrdua de sang dins el dialitzador o a les vies) i **leucopènia** transitòria (per bioincompatibilitat de les membranes).
- **Hipotensió, hipertensió i arítmies cardíques** degut a la ràpida eliminació del fluid i ràpides fluctuacions d'electròlits (que també poden causar rampes musculars).
- **Síndrome de desequilibri**: els símptomes inclouen mal de cap, vòmit, nàusees, desorientació, inquietud, etc.
- **Reaccions anafilàctiques** produïdes per productes de desinfecció dels dialitzadors o fàrmacs intravenosos (ferro, heparina, desferrioxamina).
- **Dolor** lumbar o toràcic i **fatiga**.
- **Infecció** de l'accés vascular i altres infeccions víriques (hepatits B i C) i bacterianes i fúngiques.
- **Inflamació** produïda per bioincompatibilitat de la membrana, infeccions recurrents, retenció de citoquines i toxines urèmiques prooxidants, contaminació en l'aigua de diàlisi o l'ús d'aigua no ultrapura.
- **Hipoxèmia**: la disminució anormal de pressió parcial d'oxigen en sang arterial pot ser deguda a la ventilació/perfusió (com a resultat de la leuco-agregació pulmonar i augment

de pressió arterial pulmonar) i a la hipoventilació per pèrdua de CO₂ durant la generació de bicarbonat a partir d'acetat.

- **Complicacions metabòliques:** l'acidosi metabòlica i la hipopotassèmia durant la sessió de diàlisi són degudes a la pèrdua de bicarbonat plasmàtic i potassi. L'alcalosi metabòlica es pot produir hores després de la diàlisi com efecte de rebot.
- **Complicacions nutricionals:** durant la diàlisi es perden proteïnes hidrosolubles, aminoàcids i oligoelements.

1.9. Dany en el DNA, inestabilitat genòmica i càncer en la MRC

Els malalts de MRC presenten uns nivells de dany en el seu DNA elevat respecte a la població sana. Això ha estat detectat mitjançant diversos marcadors de dany genètic com el test de micronuclis i l'assaig del cometa (Stopper et al., 2001; Rangel-López *et al.*, 2013). L'augment de dany en el DNA en la MRC pot ser degut a l'estrès oxidatiu i carbonil provocat tant per un increment de les espècies reactives d'oxigen (Reactive oxygen species, ROS) i de carbonil (Reactive carbonil compounds, RCC), com per una disminució de la capacitat antioxidant. A més, aquests malalts també presenten inestabilitat genòmica que pot ser conseqüència de defectes en el procés de reparació del DNA observats en pacients en pre-diàlisi després de l'exposició *in vitro* a radiació gamma i ultraviolada (Malachi *et al.*, 1993; Lialiaris i Mavromatidou, 2010). Recentment s'ha demostrat que els pacients amb MRC tenen afectada la ruta de reparació per escissió de bases (Base excision repair, BER) i, conseqüentment, mostren un increment en els nivells de trencaments en el DNA i de bases oxidades (Stoyanova *et al.*, 2014).

El primer estudi sobre dany genètic en pacients amb MRC va ser publicat en 1988 per Cengiz *et al.* (Cengiz, *et al.*, 1988). En aquest estudi s'analitzaren mostres d'una població de 44 pacients i controls i s'observà que els pacients amb malaltia renal crònica tenien una freqüència més elevada d'intercanvis entre cromàtides germanes que els controls. Des d'aleshores la investigació sobre el dany genètic en aquests pacients ha continuat i s'ha diversificat. Donat que els pacients amb MRC no són una població homogènia, sinó una població molt heterogènia (on trobem pacients en diferents estadis de la malaltia, que poden rebre diferents tractaments renals substitutius i diferents suplementes i medicaments molt diferents), cal investigar tots aquells factors que poden modular el dany genètic d'aquests pacients.

Així doncs, revisant la literatura, trobem els següents tipus d'estudis sobre el dany genètic en aquests malalts: (i) estudis del dany genètic que presenta amb la població general amb MRC; (ii) estudis sobre l'efecte del tractament renal substitutiu en el dany genètic d'aquests pacients; (iii) estudis sobre l'efecte dels suplementos i medicaments en el dany genètic que presenten; (iv) estudis sobre l'efecte dels polimorfismes genètics d'aquests malalts en el dany genètic que presenten.

La major limitació de la majoria dels articles dels tres primers apartats és que consten amb poblacions de malalts i controls molt reduïdes i sovint n'és difícil treure conclusions fiables. A més a més, sovint el dany genètic es mesura utilitzant tècniques com l'assaig del cometa o l'anàlisi de 8-OHdG que mesuren el dany en el DNA no fixat, que encara pot reparar-se.

Lligat amb els elevats nivells de dany en el seu DNA, els malalts amb MRC també presenten una elevada incidència de càncer, no només de càncer de ronyó i tracte urinari, sinó també de cèrvix, fetge, tiroides i càncers hematològics (Maisonneuve *et al.*, 1999; Vajdic *et al.*, 2006). Aquest augment de la prevalença de càncer s'ha trobat tant en malalts amb MRC com en malalts amb MRC en tractament renal substitutiu, sent els pacients que han rebut un trasplantament de ronyó els que tenen una major prevalença.

La MRC i el càncer estan connectats de diverses maneres. La MRC pot causar càncer i a l'hora el càncer pot causar MRC, a més a més, ambdues malalties comparteixen factors de risc com l'obesitat, la diabetis, l'edat i l'hàbit de fumar. El càncer pot ser la causa de la MRC degut a diversos factors com la nefrectomia, la nefrotoxicitat produïda per la quimioteràpia, la radioteràpia i el trasplantament de medul·la òssia, la nefropatia paraneoplàstica i el mieloma múltiple (Cohen, 2006; Stengel, 2010).

Múltiples factors associats amb la MRC, o amb el tractament d'aquesta, poden contribuir directa o indirectament a incrementar la formació de tumors, com per exemple: analgèsics i immunosupressors; factors associats al tractament de diàlisi; un mal funcionament del sistema immunitari i dels mecanismes de reparació del DNA i la disminució de la capacitat antioxidant i, per tant, l'acumulació d'espècies reactives d'oxigen i espècies reactives carbonils degut a la incapacitat del sistema renal per eliminar-les; l'acumulació de compostos carcinògens (amines heterocícliques i nitrosodimetilamina) (Vamvakas *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 2001). Per aquesta raó cal posar un cert èmfasi en el paper que pot jugar l'estrès oxidatiu i carbonil en la gènesi de compostos amb potencialitat genotòxica i carcinògena en pacients amb MRC

1.9.1. Estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu és el desequilibri entre la producció de substàncies pro-oxidants i la capacitat de l'organisme per eliminar els reactius formats, mitjançant enzims antioxidants (com les peroxidases, catalases i dismutases) o mecanismes no enzimàtics (com la vitamina C, E i A), i reparar el dany. Les principals substàncies oxidants que es formen en les cèl·lules són les espècies reactives d'oxigen (ROS), les quals són molt destructives ja que ataquen a altres estructures moleculars per aconseguir electrons per completar la seva valència (González-Diez, 2001).

La primera i més important ROS en el cos és l'anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$), juntament amb el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el radical hidroxil ($OH\cdot$), el qual és generat durant la fosforilació oxidativa i el transport d'electrons al llarg de la cadena respiratòria de la membrana mitocondrial. A part del mitocondri, altres fonts internes de ROS inclouen: el peroxisoma, les cèl·lules inflammatòries, la flavina, la adrenalina, la dopamina, les quinones, la NADPH oxidasa i el complex citocrom P-450, entre altres (Valko *et al.*, 2006; Sosa *et al.*, 2013;).

Els malalts amb MRC tenen un augment de l'estrès oxidatiu degut a diverses causes com ara el descens d'antioxidants que presenten aquests pacients, la retenció de toxines urèmiques, l'estat d'inflamació crònica, les infeccions recurrents i l'activació del complement per membranes de diàlisi no biocompatibles. A més a més, després de la pèrdua de massa renal, les nefrones restants incrementen el consum de O_2 , el que causa un augment d'estrès oxidatiu en aquestes nefrones (Nath *et al.*, 1998).

Les ROS poden interaccionar amb diferents macromolècules com lípids, proteïnes, carbohidrats i DNA causant dany en aquestes i en teixits. Els àcids grassos poliinsaturats i els fosfolípids són extremadament sensibles a l'oxidació. Les ROS poden iniciar una cascada de peroxidació lipídica que pot produir dany en la membrana cel·lular (Hashimoto *et al.*, 1996). L'oxidació lipídica produeix aldehids reactius com el malondialdehid (MDA), en hidroxinonenal (HNE) i l'hidroxihexenal (HHE) els quals poden reaccionar amb el DNA i proteïnes (Marnett, 1999; Doorn i Petersen, 2003). La interacció de els ROS amb les proteïnes causa una oxidació dels residus laterals dels aminoàcids la qual pot causar una modificació de la funció biològica que realitzen. Aquests aminoàcids també es poden modificar mitjançant espècies reactives de carbonil formades per varies fonts com carbohidrats i lípids mitjançant reaccions oxidatives i no-oxidatives (Abramowitz *et al.*, 2010).

Les ROS també poden reaccionar amb el DNA causant lesions en aquest, que si no són reparades correctament produiran mutacions, la qual cosa pot contribuir a la formació de

tumors. S'han trobat més de 100 productes diferents de l'oxidació del DNA. Les ROS poden danyar el DNA causant enllaços creuats de proteïnes amb el DNA, trencaments simples i dobles de cadena, alteracions en les bases puriques i pirimidíniques i en l'esquelet de desoxiribosa (Dizdaroglu *et al.*, 2002; Gandhi i Abramov, 2012). L'oxidació trobada més freqüent és la 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OH-dG) com a producte de l'oxidació del nucleòsid guanosina pel radical hidroxil (Valavanidis *et al.*, 2009). El dany en el DNA pot produir una parada en el cicle cel·lular, alteracions en la transcripció i en les vies de transducció de senyals, errors en la replicació e inestabilitat genètica el que es pot traduir en processos de carcinogènesi (Marnett, 2000; Cooke *et al.*, 2003).

L'estrès oxidatiu crònic té també un paper important en la fase de iniciació i progressió de la carcinogènesi de varis tipus de càncer (Gupta-Elera *et al.*, 2012; Nourazarian *et al.*, 2014; Choudhari *et al.*, 2014; Cardin *et al.*, 2014), podent incrementar l'activitat carcinogènica de diversos xenobiòtics facilitant la seva activació a compostos reactius (Cardin *et al.*, 2014). En el procés de transformació cel·lular les ROS afecten a diferents vies de senyalització, incloent vies mitogèniques i de factors de creixement, i controlen varis processos cel·lulars, incloent la proliferació, així estimulen el creixement incontrolat de cèl·lules (Nourazarian *et al.*, 2014). A més a més, l'increment d'estrès oxidatiu pot reduir la defensa antioxidant contra l'angiogènesi i la metastasi en cèl·lules canceroses (Nourazarian *et al.*, 2014). Finalment cal senyalar que les ROS intervenen en la motilitat cel·lular i les propietats invasives de les cèl·lules tumorals i contribueixen en la remodelació de la matriu extracel·lular (Extracellular matrix, ECM), incrementen la neo-angiogènesi i estan involucrades en la reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals (Costa *et al.*, 2014).

1.9.2. Estrès carbonil

S'anomena estrès carbonil a l'acumulació de compostos reactius de carbonil (RCC) i al conjunt de proteïnes modificades formades per els RCC. Les RCC es poden formar a partir de diverses fonts com carbohidrats i lípids i aminoàcids (Miyata *et al.*, 2001). La peroxidació lipídica causada per les ROS genera hidroperòxids i endoperòxids que es fragmenten produint una gran varietat d'intermediaris reactius anomenats compostos reactius de carbonil (RCC) com aldehids insaturats (HNE, HHE i acroleïna), di-aldehids (MDA i glioxal), i ceto-aldehids (metilglioxal) (Pamplona, 2011).

Els sucres, i productes de degradació d'aquests, poden produir RCC per dues vies diferents: reaccions d'autooxidació (Wells-Knecht *et al.*, 1995) o reaccions de Maillard a través de productes d'Amadori) (Thornalley *et al.*, 1999). Alguns RCC, com el metilglioxal (MGO) i el

glioxal (GO), es poden formar a partir de varies fonts diferents (per exemple carbohidrats i lípids). La **Figura 9** mostra un esquema de les principals vies de formació i metabolisme del metilglioxal, com exemple de RCC.

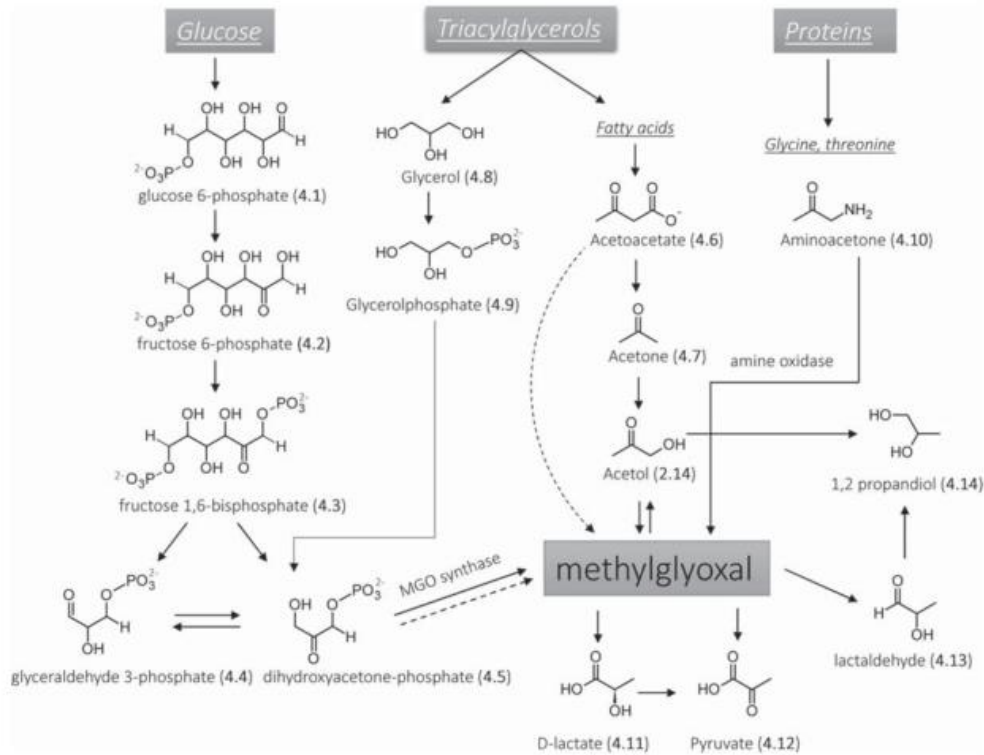


Figura 9. Esquema de les principals vies de formació del metilglioxal (Vistoli *et al.*, 2013). Les línies discontinues indiquen la formació no enzimàtica de MGO.

L'estrès carbonil en la MRC pot ser degut tant a l'increment en la producció de RCC degut a l'estrès oxidatiu, com a la disminució de la capacitat de metabolitzar els RCC. El metabolisme del MGO i del GO, per exemple, es realitza principalment pel sistema glioxalasa (depenent de glutatió (GDH)) i altres enzims com l'aldehid reductasa, l'aldosa reductasa (depenent de NADPH), etc. La disminució d'antioxidants, possiblement degut al seu consum per eliminar les ROS, produeix una incapacitat de metabolitzar RCC i la seva conseqüent acumulació (Vander *et al.*, 2003; Workman, 2004; K. Yang *et al.*, 2011).

Respecte al paper que juguen les ROS i RCS en la patologia urèmica, es coneix que ambdós grups de compostos modifiquen l'estructura de diverses proteïnes éssent responsable de l'acceleració d'aterosclerosi en pacients urèmics (Baynes i Thorpe, 2000) i també contribuint a l'amiloïdosi relacionada amb la diàlisi (Miyata *et al.*, 1993; Niwa *et al.*, 1995). Els aldehids reactius poden causar citotoxicitat a l'interaccionar amb proteïnes i membranes causant la pèrdua de funció de transportadors de membrana, enzims, components de senyalització cel·lular, factors de transcripció, etc. (Sliman *et al.*, 2010; Pillon *et al.*, 2010; Martyniuk *et al.*,

2011). També poden causar genotoxicitat (Kasai *et al.*, 1982; Eckl *et al.*, 1993; Stopper *et al.*, 2003), induir apoptosi (Kang *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 2011), i activar vies de senyalització (Akhand *et al.*, 2001).

2. OBJECTIUS

2.OBJECTIUS

Els pacients amb malaltia renal crònica (MRC) tenen una alta incidència de càncer i alts nivells de dany genètic. Donat que aquests pacients són una població molt heterogènia (on trobem pacients en diferents estadis de la malaltia, i que reben diferents tractaments), cal investigar tots aquells factors que poden modular el dany genètic d'aquests pacients, indagant en les seves causes.

En aquest context, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar el dany genètic en una població de pacients amb MRC i avaluar, mitjançant estudis longitudinals, si diferents tècniques de diàlisi poden modular el dany observat en aquests pacients.

Per això ens vam proposar els següents objectius:

- Avaluar els nivells de dany genètic i radiosensibilitat mitjançant el test de MN en una població de malalts amb MRC.
- Avaluar l'efecte del temps en hemodiàlisi en el dany genètic i la radiosensibilitat dels pacients mitjançant el test de MN.
- Avaluar l'efecte del tractament de hemodiafiltració en el dany genètic, la radiosensibilitat i a capacitat antioxidant dels malalts, mitjançant el test de MN i l'assaig que mesura la capacitat antioxidant equivalent al Trolox.
- Avaluar l'efecte de les membranes de polisulfona recobertes amb vitamina E en els nivells de dany genètic, dany oxidatiu, radiosensibilitat i capacitat antioxidant dels malalts mitjançant el test de MN, l'assaig del cometa i l'assaig que mesura la capacitat antioxidant equivalent al Trolox.

Per una altra banda, la fibrosi túbulo-intersticial té un paper clau en la progressió del dany renal i es considera que és la via comú per la qual diverses patologies renals esdevenen en malaltia renal crònica avançada. La fibrosi túbulo-intersticial és el resultat d'una reparació aberrant on el teixit epitelial és substituït per una cicatriu produïda per l'acumulació de matriu extracel·lular (Extracellular matrix, ECM). Donat que la inflamació crònica i l'ambient urèmic estan involucrats en la reparació de ferides i accentuen el dany renal dels pacients amb malaltia renal crònica, és necessària una millor comprensió del paper que les toxines urèmiques juguen en la reparació de ferides i en la fibrosi, per a trobar mecanismes per a frenar la fibrosi renal. En aquest context, un altre objectiu plantejat ha estat:

Objectius

- Avaluar *in vitro* l'efecte de quatre compostos reactius carbonil (glioal, metilglioal, malondialdehid i hidroxihexenal) sobre la capacitat de reparar lesions en l'epiteli proximal tubular, mitjançant l'assaig de reparació de ferides i tècniques moleculars com la RT-qPCR, western blot, immunofluorescència i zimografia.

3. RESULTATS

3. RESULTATS

Els resultats d'aquesta Tesi Doctoral queden reflectits en el contingut dels següents manuscrits:

- ❖ Article 1:
Radiosensitivity in patients suffering from chronic kidney disease. *International Journal of Radiation Biology*. 2015; 91:172-178.
- ❖ Article 2:
Time in hemodialysis modulates the levels of genetic damage in hemodialysis patients. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2014; 55: 363–368.
- ❖ Article 3:
Genetic damage in patients moving from hemodialysis to online hemodiafiltration. *Mutagenesis*. 2015; 00: 1–5. doi:10.1093
- ❖ Anexe 1:
Does the use of vitamin E-coated dialysis membranes reduce the levels of genetic damage in hemodialysis patients?
- ❖ Anexe 2:
RCC impair wound healing by vimentin collapse and loss of the primary cilium

ARTICLE 1

Radiosensitivity in patients suffering from chronic kidney disease.

Lara Rodríguez-Ribera, Zuray Corredor, Silvia B. Sandoval, Elisabet Coll, Irene Silva, Juan Manuel Díaz, José Ballarín, Ricard Marcos, Susana Pastor.

International Journal of Radiation Biology 2015; 91:172-178.

Índex d'impacte: 1.837

3.1 Resum de l'article 1

Radiosensitivity in patients suffering from chronic kidney disease

Antecedents: Els pacients amb malaltia renal crònica (MRC) tenen una alta incidència de càncer i alts nivells de dany genètic. Com a conseqüència de defectes en el procés de reparació s'ha suggerit que aquests malalts presenten inestabilitat cromosòmica. L'objectiu d'aquest estudi és determinar els nivells d'inestabilitat genòmica en una gran població de malalts i avaluar si la inestabilitat genòmica és inherent a la malaltia o està associada al procediment de diàlisi.

Mètodes: es van avaluar, mitjançant el test de micronuclis (MN) en limfòcits de sang perifèrica, els nivells basals de dany genètic i el dany genètic net després d'irradiar la sang dels malalts amb 0.5 Gy de radiació gamma. En l'estudi participaren un total de 552 individus; 179 individus eren controls sans mentre que els altres 373 eren pacients en diferents estadis de la malaltia, incloent un grup de 173 pacients sotmesos a hemodiàlisi (HD).

Resultats: El dany genètic net induït per la radiació era major en malalts que en controls i, aquest fet, es va observar ja a partir dels primers estadis de la malaltia i fins als últims. Per altra banda es va confirmar que el procés de diàlisi no indueix més inestabilitat genòmica ja que no s'observaren diferències en els nivells de dany net entre malalts en diàlisi i malalts en estadis 4 i 5 (pre-diàlisi) de la malaltia. L'índex de proliferació per bloqueig de la citocinesi (CBPI) suggereix que hi ha una taxa més baixa de replicació dels limfòcits en els malalts, ja que els malalts en pre-diàlisi o HD tenien un CBPI significativament menor que els controls. Es va observar una correlació positiva entre el dany basal i la freqüència de micronuclis neta tant en controls com en malalts i malalts en HD. Aquest fet indica que els nivells de dany genètic estan modulats per un patrimoni genètic individual subjacent.

Conclusió: Els nostres resultats indiquen que els pacients amb malaltia renal crònica presenten inestabilitat genòmica mesurada com un increment de radiosensibilitat cromosòmica davant la radiació ionitzant.

Radiosensitivity in patients suffering from chronic kidney disease

Lara Rodríguez-Ribera¹, Zuray Corredor¹, Silvia B. Sandoval¹, Elisabet Coll², Irene Silva², Juan Manuel Diaz², José Ballarín², Ricard Marcos^{1,3} & Susana Pastor^{1,3}

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, ²Fundació Puigvert, Barcelona, and ³Centro de Investigación Biomédica En Red (CIBER) Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III, Spain

Abstract

Purpose: Patients suffering from chronic kidney disease (CKD) exhibit a high incidence of cancer, as well as high levels of genetic damage. We hypothesized that these patients show genomic instability detected as an increased chromosomal radiosensitivity in front of the genetic damage induced by ionizing radiation.

Material and methods: The background levels of genetic damage and the net genetic damage after in vitro irradiation with 0.5 Gy were analyzed using the micronucleus (MN) assay in peripheral blood lymphocytes. A total number of 552 individuals (179 controls and 373 CKD patients) were included in the study.

Results: The net radiation-induced genetic damage was significantly higher in CKD patients than in controls; but no differences between those patients submitted to hemodialysis and those in pre-dialytic stages were detected. A positive correlation was observed between basal and net micronucleus frequencies in CKD patients what would indicate an underlying genetic background modulating DNA damage levels.

Conclusions: Our results indicate that CKD patients present genomic instability, measured as an increased chromosomal radiosensitivity in front of ionizing radiation.

Keywords: Chronic kidney disease (CKD) patients, micronucleus assay, uremic state, radiosensitivity

[Enllaç a la revista](#)

Article disponible en la versió de la tesi impresa

ARTICLE 2

Time in hemodialysis modulates the levels of genetic damage in hemodialysis patients.

Lara Rodríguez-Ribera, Elitsa Stoyanova, Zuray Corredor, Elisabet Coll, Irene Silva, Juan Manuel Díaz, José Ballarín, Ricard Marcos, Susana Pastor.

Environmental and Molecular Mutagenesis. 2014; 55: 363–368.

Índex d'impacte: 2.553

3.2 Resum de l'article 2

Time in hemodialysis modulates the levels of genetic damage in hemodialysis patients

Antecedents: Els alts nivells de dany genètic observats en els limfòcits dels pacients amb MRC poden ser deguts a l'alta inestabilitat genètica que presenten degut a defectes de reparació, o a l'efecte genotòxic d'algunes toxines urèmiques, o a la reducció dels seus nivells d'antioxidants. S'assumeix que el tractament de diàlisi pot disminuir els nivells de dany genètic ja que neteja la sang de toxines urèmiques que causen estrès oxidatiu. Tot i així, el procés de diàlisi pot causar estrès oxidatiu degut al contacte de la sang amb materials no biocompatibles del circuit extra-corpori. L'objectiu d'aquest estudi és avaluar l'efecte de l'hemodiàlisi en els nivells de dany d'aquests malats.

Mètodes: Hem realitzat un estudi longitudinal on s'ha realitzat un seguiment de 70 pacients en hemodiàlisi durant una mitjana de 15 mesos (interval 6–30 mesos). Per analitzar els nivells de dany genètic s'ha utilitzat el test de micronuclis en limfòcits de sang perifèrica. A més a més, s'ha analitzat el dany genètic induït per la radiació ionitzant per avaluar canvis en la radiosensibilitat d'aquests pacients.

Resultats: Els nostres resultats mostren que, al final de l'estudi, els nivells de dany genètic basals ($9,9 \pm 1,0$ vs $7,6 \pm 0,7$) i la radiosensibilitat ($38,56 \pm 3,0$ vs $27,66 \pm 2,4$) disminuïren significativament. A l'inici de l'estudi els pacients portaven una mitjana de 35 mesos en hemodiàlisi (interval 1–259 mesos). Es demostrà que el temps inicial en HD no es correlaciona amb els nivells de dany basal ni amb els de dany induït net que tenen els pacients. En canvi, com més temps va transcorrer entre les dues mostres més va disminuir tant la freqüència de MN com la freqüència de MN induïts, tot i que aquesta correlació només era significativa en el segon cas ($r = 0,349$, $P=0,008$).

Conclusió: el procés de diàlisi ajuda a millora els nivells de dany en el DNA i incrementar l'habilitat de reparació en els pacients amb MRC. Aquests resultats suggereixen que el risc de dany genètic causat pel procés de HD és limitat.

Brief Communication

Time in Hemodialysis Modulates the Levels of Genetic Damage in Hemodialysis Patients

Lara Rodríguez-Ribera,¹ Elitsa Stoyanova,¹ Zuray Corredor,¹ Elisabet Coll,² Irene Silva,² Juan Manuel Díaz,² José Ballarín,² Ricard Marcos,^{1,3*} and Susana Pastor^{1,3*}

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain

²Fundació Puigvert, Barcelona, Spain

³CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Madrid, Spain

It is assumed that hemodialysis treatment can diminish the levels of genetic damage in circulating lymphocytes by cleaning the blood of uremic toxins that cause oxidative stress. However, the hemodialysis process by itself may also induce genomic damage by producing reactive oxygen species (ROS). We conducted a follow-up study in a group of 70 hemodialysis patients followed for a mean time of 15 months. We investigated the effect of exposure time in hemodialysis on the levels of genetic damage in peripheral blood lymphocytes using the micronucleus assay. In addition, genetic

damage after in vitro irradiation with 0.5 Gy was also analyzed to evaluate changes in radiosensitivity. Our results showed that, at the end of the study, there was a decrease in both the basal levels of genetic damage (9.9 ± 1.0 vs. 7.6 ± 0.7) and radiosensitivity values (38.5 ± 3.0 vs. 27.6 ± 2.4). We conclude that hemodialysis procedures may act as an ameliorating factor reducing the genetic damage present in chronic kidney disease patients. Environ. Mol. Mutagen. 55:363–368, 2014. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: CRF patients; micronucleus assay; uremic state; radiosensitivity

[Enllaç a la revista](#)

Article disponible en la versió de la tesi impresa

ARTICLE 3

Genetic damage in patients moving from hemodialysis to online hemodiafiltration.

Lara Rodríguez-Ribera, Susana Pastor, Zuray Corredor, Irene Silva, Juan Manuel Díaz,
José Ballarín, Ricardo Marcos, Elisabeth Coll

Mutagenesis. 2015; 00: 1–5. doi:10.1093

Índex d'impacte: 2.793

3.3 Resum de l'article 3

Genetic damage in patients moving from hemodialysis to online hemodiafiltration

Antecedents: L'hemodiafiltració (HDF) és una tècnica mixta que utilitza la convecció i difusió per eliminar les substàncies de rebuig i excés de fluid acumulats en els malalts amb MRC. L'HDF és capaç d'eliminar substàncies que no s'eliminen o s'eliminen amb una menor eficiència en l'HD convencional. És per això que l'HDF pot ser una bona alternativa a l'HD per disminuir els nivells de dany genètic que tenen els pacients amb MRC.

Mètodes: Per determinar si l'HDF és una tècnica eficaç per a disminuir els nivells de dany en el DNA del pacients amb MRC hem analitzat la freqüència de micronuclis de 33 pacients abans i 6 mesos després de canviar de HD a HDF. A més, s'han mesurat els possibles canvis en radiosensibilitat i en la capacitat antioxidant del plasma.

Resultats: Els nostres resultats indiquen que canviar de HD a HDF ha causat una reducció en els nivells basals de dany genètic significativa ($8,94 \pm 1,3$ vs $5,96 \pm 0,6$) però no ha afectat a la inestabilitat genòmica. La capacitat antioxidant del plasma ha incrementat, però no s'ha observat una correlació entre l'increment d'aquesta i la disminució del dany genètic.

Conclusions: Els nostres resultats confirmen la utilitat de l'HDF com alternativa a l'HD per millorar els nivells de dany genètics dels malalts amb MRC. A més a més, la millora de la capacitat antioxidant suporta els beneficis observats de l'HDF ja que una part important dels agents inductors de dany en el DNA són el resultat de l'estrès oxidatiu.

Original Manuscript

Genetic damage in patients moving from hemodialysis to online hemodiafiltration

Lara Rodríguez-Ribera¹, Susana Pastor^{1,2}, Zuray Corredor¹, Irene Silva³, Juan Manuel Díaz³, José Ballarín,³ Ricardo Marcos^{1,2,*} and Elisabeth Coll³

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Campus de Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain, ²CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Melchor Fernández Almagro 3-5, 28029 Madrid, Spain and ³Fundació Puigvert, Cartagena 340-350, 08025 Barcelona, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Email: ricard.marcos@uab.es

Received 9 April 2015; Revised 24 July 2015; Accepted 28 July 2015.

Abstract

End-stage renal failure patients exhibit a high incidence of genetic damage and genomic instability. Part of this genetic damage is assumed to be caused by the hemodialysis (HD) procedure. To reduce these effects, different alternative HD procedures have been proposed, such as the use of high efficiency convective therapies to improve the reactive oxygen species/antioxidant ratio. To determine the efficiency of online hemodiafiltration (HDF) technique on the levels of DNA damage, we have measured the frequency of micronucleus in peripheral blood lymphocytes of 33 individuals moving from low-flux HD to post-dilution online HDF. In addition to basal levels of genetic damage, potential changes in radiosensitivity were measured as indicators of genomic instability. Plasma antioxidant capacity was also determined. Second samples were obtained after 6 months on the HDF protocol. Results indicate that moving to online HDF therapy produce a significant reduction of the basal levels of genetic damage, but does not affect the genomic instability status. In addition, a greater increase in plasma antioxidant capacity was observed. In spite of the lack of correlation between these parameters, our results confirm the usefulness of the online HDF technique as a way to reduce DNA damage in HD patients.

[Enllaç a la revista](#)

Article disponible en la versió de la tesi impresa

ANNEX 1

(Article 4)

Does the use of vitamin E-coated dialysis membranes reduce the levels of genetic damage in hemodialysis patients?

Lara Rodríguez-Ribera, Zuray Corredor, Irene Silva, Juan Manuel Díaz, José Ballarín, Ricard Marcos, Susana Pastor, Elisabet Coll

3.4 Resum de l'article 4

Does the use of vitamin E-coated dialysis membranes reduce the levels of genetic damage in hemodialysis patients?

Antecedents: La disminució de vitamines i antioxidants és considerada una de les causes de l'augment de dany genètic en la població amb MRC. A més, el procés de diàlisi també causa estrès oxidatiu degut al contacte de la sang amb materials no biocompatibles del circuit extra-corpori. L'ús de membranes de diàlisi recobertes de vitamina E podria ajudar a eliminar l'estrès oxidatiu d'aquests malalts i així aconseguir reduir els seus nivells de dany genètic.

Mètodes: Hem avaluat els canvis en els nivells de dany genètic en malalts que han passat d'utilitzar membranes de HD de polisulfona (PS) a membranes de polisulfona recobertes de vitamina E (PSE). El dany genètic s'ha mesurat utilitzant l'assaig de micronuclis en limfòcits de sang perifèrica i l'assaig del cometa en dos períodes de temps, abans i 6 mesos després de utilitzar PSE.

Resultats: Quan vam utilitzar l'assaig del cometa amb l'enzim formamidopirimidina DNA glicosilasa (FPG) vàrem observar una disminució significativa dels nivells de dany oxidatiu després de l'ús de membranes de PSE ($35,64 \pm 2,548$ vs $22,05 \pm 2,846$). Tot i això, ni els nivells de trencaments de DNA basal ($8,65 \pm 0,735$ vs $9,49 \pm 0,473$) ni la freqüència de micronuclis ($8,69 \pm 1,38$ vs $10,66 \pm 1,66$) va disminuir a l'utilitzar membranes de PSE. Tampoc es van observar canvis en la capacitat antioxidant del plasma ($0,17 \pm 0,02$ vs $0,15 \pm 0,02$).

Conclusions: Tot i que les membranes de PSE redueixen les bases oxidades del DNA no han demostrat canvis significatius en la capacitat antioxidant del plasma ni en la freqüència basal de MN ni en els trencaments de DNA.

(El contingut d'aquest manuscrit es troba en l'annex 1)

ANNEX 2

(Article 5)

Reactive Carbonil Compounds impair wound healing by vimentin collapse and loss of the primary cilium

Lara Rodríguez-Ribera, Craig Slattery, Tara Mc Morrow, R. Marcos, S. Pastor

3.5 Resum de l'article 5

Reactive Carbonil Compounds impair wound healing by vimentin collapse and loss of the primary cilium

Antecedents: La fibrosi túbulo-intersticial té un paper clau en la progressió del dany renal i és la via comú per la qual diverses patologies renals esdevenen en la malaltia renal crònica avançada. Després de produir-se una lesió en el ronyó les cèl·lules epitelials reparen la ferida mitjançant el procés de transició epiteli-mesènquima (EMT), que permet a les cèl·lules migrar i re-epitelitzar el lloc de la ferida. La fibrosi tubulo-intersticial és el resultat d'una reparació aberrant on el teixit epitelial és substituït per una cicatriu produïda per l'acumulació de matriu extracel·lular. La inflamació crònica i l'ambient urèmic se suposa que estan involucrats en la reparació de lesions i accentuen el dany renal dels pacients amb malaltia renal crònica. En aquest article hem avaluat l'efecte que produeixen quatre compostos reactius de carbonil sobre la capacitat de reparar lesions en l'epiteli proximal tubular.

Mètodes: Els quatre compostos reactius de carbonil utilitzats en aquest estudi van ser el glioxal (GO), el metilglioxal (MGO), el malondialdehid (MDA) i l'hidroxihexenal (HHE). La capacitat de reparació s'analitza mitjançant l'assaig de reparació de ferida en cèl·lules de l'epiteli proximal tubular (HK-2). L'EMT es va avaluar mitjançant canvis morfològics, proteics i de l'expressió gènica mitjançant microscòpia, western blot, zimogrames i RT-qPCR. Mitjançant immunofluorescència es van observar canvis en la vimentina i en els cilis de les cèl·lules.

Resultats: Els tractaments amb MDA i GO endarrereixen la reparació de les ferides mentre els compostos MGO i HHE no causen aquest efecte. A més, les cèl·lules tractades amb MDA i GO mostren un col·lapse de la vimentina que causa una disminució de mRNAs (Messenger ribonucleic acid, Àcid ribonucleic missatger) de col·lagen. A més, el MDA i GO produeixen la desciliació de les cèl·lules proximals. El HHE produeix canvis morfològics i l'expressió de marcadors mesenquimals, compatibles amb l'EMT, així com també un increment de l'activitat gelatinasa.

Conclusions: Aquest es el primer cop que s'avaluen els efectes dels compostos RCC en la reparació de ferides en cultius cel·lulars de cèl·lules de ronyó. Els compostos RCC mostren efectes diferenciats en la reparació de ferides. El MDA i el GO endarrereixen el tancament de les ferides mitjançant la disrupció de la vimentina i la desciliació de les cèl·lules del túbul proximal. (El contingut d'aquest manuscrit es troba en l'annex 2)

4. DISCUSSIÓ

4. Discussió

La malaltia renal crònica (MRC) és un problema global de salut pública amb una incidència en augment, degut a l'envelliment de la població i a l'increment de persones amb diabetis, obesitat, hipertensió i malalties cardiovasculars (Fox *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2005; Coresh *et al.*, 2007). L'augment de la incidència de la MRC i les millores en el tractament de la MRC i la malaltia cardiovascular allarguen la vida del malalt, incrementant així la seva prevalença.

Les persones amb MRC tenen alts nivells de dany en el DNA i presenten inestabilitat genòmica (Tang *et al.*, 2001; Liu, 2001; Sandoval *et al.*, 2012). Això pot ser degut a l'estrès oxidatiu i carbonil, al descens d'antioxidants i/o als defectes en la reparació del DNA, observats en aquests pacients. El procés de diàlisi, a més, es pensa que podria ser una de les causes de l'estrès oxidatiu en aquests pacients incrementant així els seus nivells de dany genètic. L'ús de noves tècniques de diàlisi, noves membranes i la teràpia amb antioxidants podrien ajudar a disminuir el dany genètic en aquests malalts i les seves conseqüències. És per això que en aquesta Tesi ens hem proposat analitzar el dany genètic dels pacients amb MRC i avaluar com les diferents tècniques de diàlisi poden modular els nivells de dany en aquests pacients. Hem realitzat un estudi transversal on hem analitzat els nivells de dany genètic i la radiosensibilitat dels pacients amb MRC i tres estudis longitudinals, amb els quals hem analitzat l'efecte de l'HD, l'HDF i l'HD amb membranes de vitamina E en el dany genètic, en la radiosensibilitat dels pacients, i en la capacitat antioxidant del plasma.

Els nostres resultats mostren que els pacients amb MRC, des de l'inici de la malaltia, presenten més dany genètic i inestabilitat genòmica que els controls, de manera que el dany genètic observat sembla ser degut majoritàriament a la inestabilitat genòmica i no a altres factors associats amb la progressió de la malaltia. El temps en hemodiàlisi ajuda a disminuir els nivells de dany en el DNA i a incrementar l'habilitat de reparació en els pacients amb MRC. L'hemodiafiltració és una bona alternativa a l'HD per disminuir els nivells de dany genètic dels malalts amb MRC i millorar la seva capacitat antioxidant, però en canvi l'ús de membranes de vitamina E, tot i que redueixen les bases oxidades del DNA, no han demostrat canvis significatius en la capacitat antioxidant del plasma ni en la freqüència basal de MN i de trencaments en el DNA.

Cengiz *et al.* publicaren en 1988 el primer estudi sobre dany genètic en pacients amb MRC. En aquest estudi s'analitzaren mostres d'una població de 44 pacients i controls i

s'observà que els pacients amb malaltia renal crònica tenien una freqüència més elevada d'intercanvis de cromàtides germanes que els controls. Després del primer estudi de Cengit *et al.* s'han publicat diversos estudis avaluant tant el dany genètic com la capacitat de reparació en malalts amb MRC. Entre aquest treballs destaquen els següents:

- **1988-1993:** es publiquen tres estudis (amb poblacions de 10 a 11 pacients amb MRC i 10-11 en HD) on analitzant la síntesi de DNA no programada veuen com els pacients amb MRC tenen menys capacitat de reparar el dany induït per llum ultraviolada o radiació gamma que els controls (Friedman *et al.*, 1988; Zevin *et al.*, 1990; Malachi *et al.*, 1993). Els resultats difereixen a l'hora de decidir si els pacients en HD tenen una reparació equivalent a la dels controls o és reduïda com la dels malalts no sotmesos a HD.
- **1996:** es publica un estudi amb 60 malalts en HD i 13 controls on els pacients amb HD mostren una menor capacitat de reparació que els controls (Vamvakas *et al.*, 1996).
- **2001:** Tarng *et al.* (2001) observen que els pacients amb HD tenen més 8-OHdG que els controls, en una població de 112 pacients en HD i 112 controls. Stopper *et al.* (2001) demostren que els pacients en MRC (N=23) i HD (N=26) tenen més dany genètic, mesurat amb l'assaig del cometa, que els controls (N=21). Liu *et al.* (2001) troben més delecions en el DNA mitocondrial en pacients amb MRC (N=162) que en els controls (N=236).
- **2006:** Boxal *et al.* (2006) observen que els pacients amb MRC presenten major inestabilitat genòmica ja que tenen els telòmers més curts que els controls sans.
- **2010** Stoyanova *et al.* (2010) observen mitjançant l'assaig del cometa que els pacients en HD (77) tenen més dany que els pacients amb MRC (64) i aquests tenen més dany que els controls (N=61). Sandoval *et al.* (2010), en canvi, no observen diferències entre els pacients en HD i els pacients en MRC que encara no han començat l'HD, però sí que observen una major freqüència de MN en malalts (N=103) i malalts sotmesos a HD (N=98) que en controls (N=57).
- **2012:** Sandoval *et al.* (2012) demostren com els pacients amb MRC tenen més radiosensibilitat que els controls i els pacients en HD són més radiosensibles que els pacients amb MRC.
- **2013:** Rangel-Lopez *et al.* (2013) mitjançant l'assaig del cometa i el test de MN troben més dany en pacients amb MRC que en els controls, però no observen diferències entre pacients en HD i controls.
- **2014:** Corredor *et al.* (2014), mitjançant l'assaig del cometa, observen com 206 pacients amb MRC tenen més dany que 187 controls. No s'observen diferències entre els pacients amb MRC i els pacients amb MRC sotmesos a HD (N=209). Stoyanova *et al.* (2014)

demostren que els pacients amb alts nivells de dany en el DNA tenen una capacitat de reparació per escissió de bases menor que els malalts amb baixos nivells de dany.

La major limitació de la majoria dels estudis publicats és que treballen amb poblacions de malalts i controls molt reduïdes i sovint n'és difícil treure conclusions fiables. Una altra limitació dels estudis és que sovint el dany genètic es mesura utilitzant tècniques com l'assaig del cometa o l'anàlisi de 8-OHdG que mesuren el dany en el DNA no fixat, i que encara es pot reparar.

El nostre grup d'investigació s'ha dedicat a avaluar els nivells de dany genètic en pacients amb MRC des de l'any 2007. És per això que el gran nombre d'individus utilitzats en les publicacions del nostre grup contrasten amb les dels altres articles on s'utilitzen poblacions menors (Sandoval *et al.*, 2010; Stoyanova *et al.*, 2010; Sandoval *et al.*, 2012; Corredor *et al.*, 2014). Per a mesurar el dany genètic i la radiosensibilitat en els nostres estudis hem utilitzat l'assaig de micronuclis (MN). Els micronuclis (MN), són masses de cromatina envoltades de membrana nuclear amb forma de petits nuclis que es troben prop del nucli principal de la cèl·lula interfàsica. Són formats durant la telofase mitòtica o meiòtica quan fragments de cromosomes acèntrics (produïts per trencaments cromosòmics) o cromosomes sencers que no han migrat cap al fus s'envolten de membrana nuclear. Els MN es poden produir tant de manera espontània o com a conseqüència d'agents genotòxics (químics o físics) que produeixen trencaments en el DNA o aneuploidies. L'assaig de MN en limfòcits de sang perifèrica, per tant, permet detectar el dany en el DNA fixat produït tant per agents clastogènics com aneugènics (Fenech, 2007). Cal dir que la freqüència de MN en els limfòcits de sang perifèrica es considera un bon biomarcador predictiu de risc de càncer (Bonassi *et al.*, 2007). El test de MN permet mesurar, a més, la sensibilitat a la radiació ionitzant (radiosensibilitat), que ens indica la inestabilitat genòmica o la baixa capacitat de reparar dany en el DNA (Mozdarani, 2005; Chistiakov, 2008; Baeyens i Slabbert, 2010; Bhatia i Kumar, 2014).

En el nostre estudi (**article 1**) hem avaluat, en una gran població, els nivells basals de dany genètic i el dany genètic net després d'irradiar la sang dels malalts a 0,5 Gy amb radiació gamma. En l'estudi participaren un total de 552 individus dels quals 179 individus eren controls sans, mentre que els altres 373 eren pacients en diferents estadis de la malaltia, incloent-hi un grup de 173 pacients sotmesos a hemodiàlisi (HD). Els nostres resultats confirmen que els pacients amb MRC tenen un dany genètic incrementat respecte els controls però, en contra del que anteriorment es pensava, el dany genètic no incrementa amb la progressió de la malaltia sinó que esdevé incrementat des de l'inici (Sandoval *et al.*, 2010). Els nostres resultats

amb l'assaig de MN concorden amb els resultats de Corredor *et al.* (2014) en l'assaig del cometa que, en ampliar la mostra poblacional del treball publicat per Stoyanova *et al.* (2010), van observar que els nivells de dany en el DNA no estaven relacionats amb la severitat de la patologia ja que no correlacionaven amb l'índex de filtrat glomerular i s'observaven nivells de dany elevats des de l'inici de la malaltia.

Així doncs, el dany genètic observat en aquests pacients amb MRC sembla ser degut, majoritàriament, a la inestabilitat genòmica que hem observat que tenen els malalts des de l'inici de la malaltia i no està afectat pel procés de diàlisi, més que a altres factors associats a la progressió de la malaltia com ara l'acumulació de toxines urèmiques amb potencial genotòxic (com els productes finals de glicació avançada (*Advanced glycation end products*, AGEs) i els productes finals de lipoxidació avançada (*Advanced lipoxidation end products*, ALEs)), incrementada especialment en pacients amb malaltia renal crònica avançada, i la possible producció de dany oxidatiu en el procés de diàlisi (Schinzel *et al.*, 2001; Fragedaki *et al.*, 2005; Schupp *et al.*, 2010; Rangel-López *et al.*, 2013). La inestabilitat genètica pot iniciar el càncer, augmentar la seva progressió i influir en el pronòstic dels pacients afectats (Ferguson *et al.*, 2015). Estudis prospectius han demostrat que nivells elevats de dany cromosòmic estan associats a un increment en el risc de desenvolupar tumors (Bonassi *et al.*, 2007; Bonassi *et al.*, 2008). La predisposició individual a la inestabilitat genòmica pot ser deguda a l'existència de polimorfismes en gens, com els de reparació del DNA, involucrats en el manteniment de la integritat genòmica (Nemec *et al.*, 2010). Els pacients amb MRC tenen menys capacitat de reparar el dany en el DNA que els controls sans (Malachi *et al.*, 1993), i recentment Stoyanova *et al.* (2014) ha demostrat que els pacients amb alts nivells de dany en el DNA tenen menor capacitat de reparació, pel mecanisme d'escissió de bases, que els pacients amb nivells de dany en el DNA menors. Això confirma la predisposició genètica dels pacients amb MRC a tenir alts nivells de dany en el DNA i concorda amb la correlació positiva que hem observat entre el dany basal i radioinduït, tant, en pacients com en controls. Polimorfismes en els gens *XPD* i *XRCC1* han estat associats amb el risc de desenvolupar MRC en la població egípcia i turca (Trabulus *et al.*, 2012; Radwan *et al.*, 2015) i polimorfismes en els gens de la via de reparació per escissió de bases *MUTYH* i *OGG1* han estat associats amb tenir uns nivells de 8-OHdG majors en pacients en HD i amb un increment en el risc a desenvolupar MRC en la població xinesa, el qual suggereix que el dany oxidatiu en el DNA pot estar involucrat en el desenvolupament de la malaltia (Cai *et al.*, 2012). L'associació d'una forma rara de malaltia renal crònica anomenada nefritis intersticial cariomegàlica (KIN) amb mutacions en el gen *FAN1*, involucrat en la via de reparació d'entrecruaments entre cadenes del DNA, ha

demostrat la relació entre la fibrosi renal, el dany en el DNA i la seva reparació (Zhou *et al.*, 2012).

Al classificar els pacients segons la presència de malalties cardiovasculars (MCV) no hem trobat diferències en el dany basal en el DNA però sí en els nivells de dany induït. En el nostre estudi els pacients amb MRC i MCV presentaren més radiosensibilitat que els pacients sense MCV, fet que s'observà també en els pacients en HD. L'acumulació de dany en el DNA s'està actualment reconeixent com un factor causal en la iniciació i progressió de l'aterosclerosi (Sitaraman *et al.*, 2014; Shah i Mahmoudi, 2015; Yoon *et al.*, 2015). A més, tant factors de risc cardiovasculars com MCV comunes, com aterosclerosi, fallada cardíaca i hipertensió, s'han associat amb telòmers curts en leucòcits (Fyhrquist *et al.*, 2013).

Així doncs, el dany genètic observat en aquests pacients és degut a la suma de varis factors com l'efecte genotòxic d'algunes toxines urèmiques (Fragedaki *et al.*, 2005; Schupp *et al.*, 2005), la reducció d'antioxidants (Vaziri *et al.*, 2003; Stopper *et al.*, 2008; Schupp *et al.*, 2008) i, on destaca especialment, l'alta inestabilitat genètica que presenten, degut a defectes en la reparació (Malachi *et al.*, 1993; Sandoval *et al.*, 2012; Stoyanova *et al.*, 2014). A més a més, el procés de diàlisi també pot causar estrès oxidatiu degut al contacte de la sang amb materials no biocompatibles del circuit extra-corpori (Jackson *et al.*, 1995; Spittle *et al.*, 2001). Independentment de l'origen del dany genètic d'aquests pacients, el que des del punt de vista clínic és interessant és aconseguir reduir el nivells de dany en el DNA d'aquesta població. Per evitar les seves conseqüències, el nostre objectiu ha estat veure si les diferents tècniques de diàlisi poden modular el dany observat en aquests pacients. L'impacte de l'HD en els nivells de dany genètic ha estat el focus de varis estudis, tot i que no s'ha arribat a conclusions definitives. Els nostres resultats (**article 1**) mostren que els pacients en tractament d'HD no tenen més dany genètic que els pacients en MRC no sotmesos a diàlisi. Malgrat s'ha citat un major dany en pacients amb HD (Stopper *et al.*, 2001; Stoyanova *et al.*, 2010), recentment, s'ha trobat que els pacients amb HD no mostren més dany genètic que els controls o que inclús tenen menys dany que els controls (Rangel-López *et al.*, 2013; Corredor *et al.*, 2014). Aquestes discrepàncies entre els resultats dels diferents estudis poden ser atribuïdes a mostres de població petites i a diferències existents entre els grups de pacients, com ara suplementos dietaris, medicines o diferències en els tractaments de diàlisi. Tot i que s'ha trobat una tendència, en pacients que comencen el tractament d'hemodiàlisi, a reduir el dany genètic (Kobras i Schupp, 2006; Schupp *et al.*, 2006), Stopper *et al.* (1999) i Roth *et al.* (2008) trobaren que els pacients sotmesos

durant un llarg període de temps a HD tenen més dany genètic; en canvi, en altres estudis aquesta associació no es va trobar (Stopper *et al.*, 2001).

Per tal d'aclarir l'efecte de l'hemodiàlisi en els nivells de dany en aquests malalts vam realitzar un estudi longitudinal (**article 2**) amb 70 pacients en HD. Vàrem avaluar la freqüència de MN i la radiosensibilitat durant una mitjana de 15 mesos (interval 6–30 mesos) i es va observar com el dany genètic basal ($9,9 \pm 1,0$ vs $7,6 \pm 0,7$) i la radiosensibilitat ($38,56 \pm 3,0$ vs $27,66 \pm 2,4$) disminuïren significativament. En estudis transversals Stopper *et al.* (1999) i Roth *et al.* (2008) trobaren més dany en pacients que havien estat en HD durant 10 i 7 anys, respectivament. El fet que en el nostre estudi longitudinal no s'observés aquesta relació, sinó una reducció en el dany, podria ser deguda a que els nostres pacients a l'inici de l'estudi només portaven en HD 2,9 anys. Per tant, els resultats podrien variar si es realitzés un monitoratge amb pacients que portessin un temps llarg en HD. Tot i que, el temps inicial en HD no es va correlacionar amb els nivells de dany basal ni amb el dany induït net que tenen els pacients, com més temps havia transcorregut entre les dues mostres més havia disminuït tant el dany basal, com el dany induït net, tot i que aquesta correlació només era significativa en el segon cas. Els nostres resultats suggereixen que el procediment d'HD pot reduir algunes fonts d'agents genotòxics (Puchades *et al.*, 2013), disminuint els nivells d'estrès oxidatiu i permetent que els enzims de reparació facin front contra el dany induït en el DNA.

Com s'ha comentat anteriorment l'hemodiafiltració (HDF) és una tècnica mixta que utilitza la convecció i difusió per eliminar les substàncies de rebuig i excés de fluid acumulats en els malalts amb MRC. Tot i que les tècniques convectives comporten una major pèrdua d'albumina, aquesta pèrdua pot tenir un impacte favorable en l'eliminació de toxines urèmiques unides a proteïnes (Krieter i Canaud, 2003; Morgera *et al.*, 2003). L'HDF és capaç d'eliminar substàncies que no s'eliminen o s'eliminen amb una menor eficiència en l'HD convencional (Schiffl, 2007; Penne *et al.*, 2010; Grooteman, 2012). És per això que l'HDF pot ser una bona alternativa a l'HD per disminuir els nivells de dany genètic que tenen els pacients amb MRC.

Per determinar si l'HDF és una tècnica eficaç per a disminuir els nivells de dany en el DNA del pacients amb MRC nosaltres vam realitzar un estudi longitudinal (**article 3**) amb 33 pacients en HD que van canviar a HDF durant 6 mesos. L'increment del Kt/V i del percentatge de reducció de la urea (PRU) trobat en el nostre estudi indica una major eliminació de soluts de mida petita en l'HDF comparat amb l'HD. En el nostre estudi l'ús de l'HDF no ha aconseguit reduir els nivells de fosfat, de PTH, ni la resistència a l'eritropoetina. Cal a dir que en la

literatura s'observen resultats contradictoris sobre el benefici de l'HDF per millorar aquests paràmetres (Vilar *et al.*, 2009; Pedrini *et al.*, 2011; Oates *et al.*, 2011; Panichi *et al.*, 2014)

Els pacients en HDF presenten més dany genètic que els individus sans, mesurat amb l'assaig del cometa i l'intercanvi de cromàtides germanes (Buemi *et al.*, 2006; Buemi *et al.*, 2010). El canvi d'HD a HDF va causar una reducció significativa en els nivells basals de dany genètic, però no va afectar a la inestabilitat genòmica. Kobras i Schupp (2006) i Schupp *et al.* (2006) avaluen l'efecte del canvi d'HD a HDF en el dany genètic en una població reduïda (N=7) i van trobar una disminució significativa en dany genètic, mesurat amb l'assaig del cometa, però no observaren canvis en la freqüència de micronuclis. En el nostre estudi el canvi d'HD a HDF va causar una reducció significativa en els nivells basals de dany genètic, fet que confirma els resultats de Kobras i Schupp (2006) i Schupp *et al.* (2006). En canvi, sí que els esmentats autors van observar diferències en els nivells d'inestabilitat genòmica.

Un estudi recent ha demostrat que els nivells de DNA mitocondrial (mtDNA) alliberats al torrent sanguini, que estan correlacionats amb l'estat d'inflamació crònica dels pacients en HD, es veien reduïts significativament en pacients que canviaven d'HD a HDF (Cao *et al.*, 2014). En el nostre estudi, la capacitat antioxidant del plasma va incrementar (sense arribar a nivells significatius $P=0,058$), però no es va observar una correlació entre l'increment d'aquesta i la disminució del dany genètic. González-Diez *et al.* (2008) demostraren que després d'una sessió d' HDF els nivells d'antioxidants, i biomarcadors de dany en lípids i proteïnes eren similars o millors respecte els nivells en una sessió d'HD. Tot i així, els resultats obtinguts en els diferents assaigs clínics no coincideixen en si l'HDF millora la inflamació d'aquests pacients ni si millora la mortalitat (Panichi *et al.*, 2008; Oates *et al.*, 2011; Maduell *et al.*, 2013; Ok *et al.*, 2013; den Hoedt *et al.*, 2014).

La disminució dels nivells de vitamines i de antioxidants és considerada una altra de les causes de l'augment de dany genètic en la població amb MRC. Hi ha diversos assaigs clínics que avaluen els nivells de dany després de suplementar els pacients amb vitamines (Schupp *et al.*, 2008; Stopper *et al.*, 2008). La suplementació de malalts amb vitamina E durant 4 i 14 setmanes ha demostrat reduir els nivells de dany genètic (Kan *et al.*, 2002; Domenici *et al.*, 2005) tot i que en altres estudis s'ha vist que la suplementació durant cinc setmanes amb vitamina E no aconsegueix millorar l'estrès oxidatiu d'aquests pacients (Hodkova *et al.*, 2006). Una altra proposta per eliminar l'estrès oxidatiu d'aquests malalts, i així aconseguir reduir els seus nivells de dany genètic, és l'ús de membranes de diàlisi recobertes de vitamina E. En la literatura trobem resultats contradictoris referents a si les membranes recobertes de vitamina

E ajuden a reduir els nivells d'inflamació d'aquests malalts (Satoh *et al.*, 2001; Clermont *et al.*, 2001; Sanaka *et al.*, 2013; Lines *et al.*, 2014). En el nostre estudi (**article 4**) hem avaluat els canvis en el dany genètic basal, el dany oxidatiu i la capacitat antioxidant del plasma en 29 pacients que van passar d'utilitzar membranes d'HD de polisulfona (PS) a membranes de polisulfona recobertes de vitamina E (PSE). En aquest article els nivells de dany genètic es van mesurar amb el test de MN i l'assaig del cometa. L'assaig del cometa és una tècnica ràpida, senzilla i sensible que ens permet mesurar trencaments en el DNA en cèl·lules individualitzades fixades en agarosa mitjançant l'electroforesi (Collins, 2004; Speit i Hartmann, 2006; Burlinson, 2012). L'addició de formamidopirimidina DNA glicosilasa (PFG), que reconeix purines oxidades (sobretot la 8-oxoguanina, que és el principal substrat d'aquest enzim), permet mesurar, a més, el dany oxidatiu.

Tarng *et al.* (2000) analitzaren els nivells de 8-OHdG en pacients en HD que utilitzaven membranes de diàlisi de diversos materials. En aquest estudi es va observar que els malalts dialitzats amb membranes de cel·lulosa recobertes de vitamina E tenien uns nivells inferiors de 8-OHdG comparat amb els que utilitzaven només membranes de cel·lulosa, però comparat amb els pacients que utilitzaven membranes biocompatibles com la polisulfona, els nivells de 8-OHdG eren equivalents. Els nostres resultats mostren que els nivells de dany oxidatiu disminueixen després de l'ús de membranes de PSE. La correlació negativa entre els nivells inicials i finals de dany oxidatiu indicaria que els pacients que més es beneficien de l'ús de les membranes de PSE són els pacients que inicialment tenen més dany oxidatiu en el DNA. Això suggereix que el pas de la sang per aquestes membranes de vitamina E podria reduir els nivells de compostos químics causants del dany oxidatiu. En canvi, no s'han observat canvis en la capacitat antioxidant del plasma i el dany oxidatiu no es correlaciona amb la capacitat antioxidant del plasma. Això podria indicar que el mecanisme per reduir l'estrès oxidatiu en els limfòcits ocorre en la superfície del dialitzador, on la vitamina E actuaria com a quelant d'espècies oxidatives, en lloc de tenir un efecte antioxidant sistèmic resultant de l'alliberament de vitamina E de la membrana (Yang *et al.*, 2006). Tot i això, ni els trencaments de DNA ni la freqüència de micronuclis disminueixen quan s'utilitzen membranes de PSE. Només hi ha un estudi transversal, realitzat amb 9 pacients, que analitza l'efecte de les membranes de vitamina E en el dany genètic (Müller *et al.*, 2004). El dany genètic, avaluat en aquest estudi mitjançant l'assaig del cometa, era menor utilitzant membranes de cel·lulosa recobertes de vitamina E comparat amb membranes de cel·lulosa no recobertes, però si els comparaven amb membranes de polisulfona, els resultats eren equivalents. En aquests moments, el nostre estudi és l'únic estudi on s'avaluen els nivells de dany genètic en pacients que utilitzen

membranes de polisulfona recobertes amb vitamina E comparat amb l'ús de membranes de polisulfona convencionals.

Adicionalment, en el nostre estudi no hem trobat canvis en la majoria dels marcadors utilitzats per mesurar l'estat de salut dels pacients. Els nivells de proteïna C reactiva, utilitzada com a marcador de la inflamació (Kao *et al.*, 2006), no varien i la hiperfosfatèmia tampoc millora significativament. Tot i que s'havia proposat que les membranes de PSE podien millorar l'estat de malnutrició, en el nostre estudi no vam observar variacions en els nivells d'albumina sèrica, confirmant així els resultats obtinguts en un estudi de meta-anàlisi recent (Huang *et al.*, 2015). A més, el paràmetre Kt/V indica que la HD amb membranes de PS o PSE tenen la mateixa eficiència en la eliminació de soluts de mida petita. Per últim, l'increment dels nivells de ferritina i hemoglobina trobat al nostre estudi, indicaria que les membranes de PSE poden millorar l'anèmia, malgrat que la dosi d'eritropoetina/setmana i l'índex de resistència a l'eritropoetina (Erythropoietin resistance index, ERI) no va disminuir en els nostres pacients. En canvi, en el meta-anàlisi de Huang *et al.* (2015) l'ERI disminuïa mentre els nivells d'hemoglobina o la dosi d'eritropoetina/setmana no milloraven significativament. L'estudi de Lines *et al.* (2014) conclou que mentre les membranes de PSE no redueixen l'ERI, poden ser útils pels pacients que tenen els nivells d'ERI més elevats.

Així doncs, després de valorar l'efecte de les membranes de vitamina E, la hemodiafiltració i la hemodiàlisi, podem concloure que la millor manera per reduir els nivells de dany en el DNA és l'ús d'HDF o d'HD. Així, mentre que l'HDF aconseguia reduir els nivells de MN en sis mesos de tractament, en l'estudi longitudinal els pacients que es mantenien en HD es va observar que en els pacients en els quals havia passat més temps entre la primera i segona mostra de sang, disminuïen més els nivells de MN. Això indica la possibilitat de que si en el nostre estudi els pacients haguessin estat mostrejats tots durant sis mesos, els resultats de l'estudi podrien variar i, en cas de que s'observés reducció en el dany genètic, aquest seria menor al finalment observat.

Com s'ha comentat anteriorment, els compostos reactius de carbonil (RCC) poden ser els causants de part de la genotoxicitat que observem en els pacients amb MRC (Kasai *et al.*, 1982; Eckl *et al.*, 1993; Stopper *et al.*, 2003; Fragedaki *et al.*, 2005; Schupp *et al.*, 2005). A més, aquests compostos poden: induir apoptosi (Kang *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 2011), activar vies de senyalització (Akhand *et al.*, 2001), i causar citotoxicitat a l'interaccionar amb proteïnes i membranes (Sliman *et al.*, 2010; Pillon *et al.*, 2010; Martyniuk *et al.*, 2011). La MRC és una malaltia progressiva on la fibrosi túbulo-intersticial té un paper clau en la progressió del dany

renal i és la via comú per la qual diverses patologies renals esdevenen en malaltia renal crònica avançada. És necessària una millor comprensió dels efectes de les toxines urèmiques en la reparació de ferides i en la fibrosi per a trobar mecanismes per a frenar la fibrosi renal. Per estudiar l'efecte i els mecanismes d'acció d'aquests compostos RCC, donat que no podíem utilitzar poblacions humanes, vam realitzar estudis *in vitro* per avaluar l'efecte de quatre RCC (el glioxal, el metilglioxal, el malondialdehid i l'hidroxihexenal) sobre la capacitat de reparar lesions en l'epiteli proximal tubular (**article 5**).

Les ferides que resulten d'estímuls aguts o crònics (incloent infeccions, reaccions autoimmunes, lesions mecàniques, isquèmia, toxines i malalties genètiques) poden accelerar la fibrosi dels teixits (Pardo i Selman, 2006; Wynn, 2007). En els pacients amb MRC la demora en la reparació de ferides s'ha proposat que és causada per l'ambient urèmic (Horowitz, 1970; Dou *et al.*, 2004).

En el nostre estudi hem demostrat per primer cop que l'exposició a RCC afecta de manera diferencial a la capacitat de reparar ferides en l'epiteli del túbul proximal. Així, mitjançant l'assaig de reparació de ferides en cèl·lules de l'epiteli proximal tubular (HK-2) vam observar que el glioxal (GO) i el malondialdehid (MDA) retarden el tancament de les ferides, mentre que el metilglyoxal (MGO) i l'hidroxihexenal (HHE) no van afectar a la velocitat de reparació. El GO i el MDA van causar el col·lapse de la vimentina i la pèrdua dels cilis primaris, els quals juguen un paper important en la correcta reparació de les ferides. Els nostres resultats també mostren evidència de transició epiteli-mesènquima (EMT) induïda per l'HHE, el qual indueix canvis en el fenotip cel·lular i en els nivells d'expressió gènica.

El procés de EMT permet a les cèl·lules migrar i re-epitelitzar el lloc de la ferida. Durant el procés, les cèl·lules epitelials adquireixen un fenotip semblant al de les cèl·lules mesenquimals mitjançant la pèrdua d'adhesió, pròpia de les cèl·lules epitelials, i desenvolupen canvis en el citoesquelet i canvis transcripcionals (Hewitson, 2009; Zeisberg i Neilson, 2009). Els nostres resultats mostren que el MDA i el GO no afecten a la morfologia cel·lular ni incrementen els marcadors mesenquimals en les cèl·lules del túbul proximal, analitzats mitjançant RT-qPCR (Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction). Malgrat això, el MDA disminueix l'expressió gènica de l'E-caderina i incrementa la MMP-9. En canvi, les cèl·lules tractades amb el MGO i l'HHE esdevenen elongades i incrementen l'expressió gènica de marcadors mesenquimals. A més a més, les anàlisis de zimografia mostren que l'activitat gelatinasa incrementa després dels tractaments amb MGO i HHE.

Estudis previs han demostrat que la reducció en glioxalasa 1 (l'enzim que metabolitza el MGO i GO) retardava la reparació de les ferides en ratolins vells (Fleming *et al.*, 2013); a més, els AGEs retardaven la reparació de la ferida en l'epiteli de la còrnia mitjançant la generació d'espècies reactives d'oxigen (Shi *et al.*, 2013), i la reparació de ferides retardada de ratolins diabètics era restablerta mitjançant el bloqueig dels receptors dels AGEs (Goova *et al.*, 2001). En el nostre estudi, nosaltres hem demostrat que el GO i el MDA, però no el MGO o l'HHE, retarden el procés de reparació de ferides en cèl·lules tubulars renals i, mitjançant l'assaig de blau tripà, hem provat que el retard no ha estat causat per una menor viabilitat cel·lular.

Una explicació possible per a la demora en el tancament de la ferida és que el RCC ha pogut causat perturbacions en la vimentina. Els filaments intermedis de vimentina indueixen canvis en la morfologia cel·lular, l'adhesió, migració i la senyalització en la EMT (Ivaska *et al.*, 2007; Mendez *et al.*, 2010). Eckles *et al.* (1998 i 2000), han demostrat la importància de la vimentina en el procés de curació de ferides, trobant que la falta de vimentina perjudica a la mobilitat dels fibroblasts i la curació de ferides en el ratolí. En un model *ex vivo* de cirurgia de cataractes, Menko *et al.* (2014) van trobar que els filaments de vimentina eren els elements del citoesquelet dominants en els lamel·lipodis de les cèl·lules reparadores del límit de la ferida. A més, l'exposició a witaferina A va causar l'agregació de la vimentina, alterant la distribució dels filaments i afectant a la funció dels filaments, cosa que retardà la reparació de ferides (Menko *et al.*, 2014). A l'analitzar els nivells de vimentina i la seva distribució cel·lular després de l'exposició a RCC (mitjançant western blot i immunofluorescència, respectivament) vam observar que mentre els nivells de vimentina romanien estables, els RCC induïen el col·lapse de la xarxa de vimentina, formant agregats en la regió perinuclear, predominantment en els tractaments amb MDA i GO, però també en els tractaments de MGO i HHE. Aquesta petita alteració de la vimentina, observada en les cèl·lules tractades amb HHE, pot ser la raó per la qual la migració no ha incrementat malgrat l'evident fenotip de EMT que presentaven les cèl·lules. La literatura suggereix que el col·lapse de la vimentina pot ser degut a l'alt grau de modificacions en les proteïnes causades pels RCC que porta a la formació de l'agregosoma. La modificació irreversible de proteïnes pels RCC pot portar al mal plegament d'aquestes i, finalment, a l'agregació quan es forma l'entrecruament de proteïnes, que són resistents a la degradació proteolítica del proteosoma (Stadtman i Levine, 2000; Tyedmers *et al.*, 2010). Per protegir el medi cel·lular d'espècies de proteïnes potencialment deletèries, les proteïnes agregades es transporten via la histona desacetilasa-6 (HDAC6) cap a un compartiment específic, anomenat agregosoma, localitzat en la regió perinuclear i envoltat per vimentina (Kawaguchi *et al.*, 2003; Tyedmers *et al.*, 2010). Els nostres resultats concorden amb els

resultats de Kueper *et al.* (2007), que van trobar agregació de la vimentina degut a la glicació de proteïnes causades per l'exposició a MGO en fibroblasts dèrmics.

També vam avaluar els nivells d'expressió gènica de components de la matriu extracel·lular (ECM) trobant una disminució significativa en els nivells de *col·lagen-I*, després dels tractaments amb MDA i GO. Aquest resultat concorda amb el paper que té la xarxa de vimentina en la unió i estabilització dels mRNAs de col·lagen (Challa i Stefanovic, 2011). La interacció de la ECM amb les cèl·lules és crítica per permetre la migració d'aquestes durant la reparació de ferides. La glicació de la ECM afecta a la migració de les cèl·lules i retarda la reparació de ferides en cèl·lules periodontals, immunes o fibroblasts dèrmics i, a més a més, disminueix els nivells de mRNA de col·lagen (Murillo *et al.*, 2008; Loughlin i Artlett, 2011; Haucke *et al.*, 2014). Les nostres dades suggereixen que el GO i el MDA poden inhibir la EMT i la fibrosi mitjançant la disrupció dels filaments de vimentina, que impedeix els canvis en la morfologia de la cèl·lula i la síntesi de col·lagen. Malgrat tot, el possible efecte anti-fibrotic del GO i MDA requereix ser confirmat mitjançant més experiments. L'expressió gènica de la fibronectina va disminuir després del tractament amb GO i va incrementar en el tractament de HHE. Encara que hem trobat que el MGO no va alterar els nivells de mRNA de fibronectina, en l'estudi de Ho *et al.* (2007) els nivells de mRNA de la fibronectina incrementaren després de l'exposició a MGO en cèl·lules renals mesangials.

Un altre component amb un paper important en la reparació de ferides és el cili primari. El cili primari regula la migració direccional de les cèl·lules, requerida per re-cel·lularitzar l'àrea de la ferida sense distorsionar la seva arquitectura (Verghese *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2012; Veland *et al.*, 2014). La disfunció del cili ha estat associada a diverses malalties, anomenades ciliopaties, incloent la poliquistosi renal (Pazour *et al.*, 2002; Yoder *et al.*, 2002; Waters i Beales, 2011). A més a més, defectes en la formació, organització i funció dels cilis renals poden comprometre la seva habilitat de reparar ferides (Schneider *et al.*, 2010; Blitzer *et al.*, 2011). Els cilis primaris són susceptibles a agressions ja que estan prolongats lluny del cos cel·lular cap a l'ambient extern que pot contenir agents nocius (Overgaard *et al.*, 2008). Nosaltres vam avaluar l'efecte dels RCC en el cili primari mitjançant la immuno-tinció de la tubulina alfa acetilada i vam observar que el GO i el MDA causaren desciliació cel·lular i un increment en la tinció de la tubulina alfa acetilada en el citoplasma, mentre el MGO i l'HHE no afectaren als cilis. Els nostres resultats són similars als observats per Overgaard *et al.* (2008), Radford *et al.* (2012) i Lam *et al.* (2013) els quals després de la desciliació també observaren un increment en la tinció citoplasmàtica de la tubulina alfa acetilada. Les cèl·lules poden perdre el cili primari per reabsorció o caiguda (*shedding*). La caiguda del cili es descriu com una resposta

ràpida a l'estrès ambiental (Quarby, 2004). Overgaard *et al.* (2008) van induir la caiguda del cili químicament en cèl·lules tubulars, confirmat per l'obtenció de l'axonema de tubulina en el medi de cultiu, i observaren un increment citosòlic de la tubulina alfa acetilada ja que no hi havia axonema on incorporar-la. La reabsorció del cili, en canvi, és un procés on les cèl·lules gradualment retreuen el cili i pot estar regulat per la desacetilació de l'axonema de microtúbuls (Pugacheva *et al.*, 2007). Aquest, és un procés normal que precedeix a la mitosi, però ha estat recentment involucrat en condicions d'estrès com l'exposició de cèl·lules tubulars a carcinògens, o l'exposició de cèl·lules de la tràquea al fum del tabac (Radford *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2013). S'ha demostrat que l'HDAC6 regula tant la deciliació com l'agregació de proteïnes modificades pel fum del tabac (**Figura 10**) (Lam *et al.*, 2013). A més, s'ha demostrat que la sobre-expressió de HDAC6 és suficient per a causar el col·lapse de la vimentina en fibroblasts i la desciliació en cèl·lules epitelials del conducte biliar (Gradilone *et al.*, 2013; Rathje *et al.*, 2014).

En el nostre estudi no es van mesurar els nivells de HDAC6, ni la mida dels cilis després de l'exposició a RCC, ni la direcció dels cilis en la reparació de ferides. Per tant, si la pèrdua dels cilis després de l'exposició ha estat causada per la caiguda del cili o per la reabsorció induïda per HDAC6 i la modificació de proteïnes, és una qüestió que s'haurà d'examinar en futurs experiments..

Les descobertes del nostre estudi poden tenir implicacions més enllà de les relacionades amb la curació de ferides i fibrosi en els pacients amb MRC. Els RCC poden tenir un paper important també en el retard en la curació de ferides observat en pacients diabètics i gent gran (Huijberts *et al.*, 2008; Loughlin i Artlett, 2009; Fleming *et al.*, 2013; Haucke *et al.*, 2014). A més, els efectes dels RCC en la migració cel·lular poden donar lloc a noves teràpies en el tractament del càncer. La glioxalasa-1 està sobre-expressada en diversos tipus de tumors i causa resistència a múltiples agents quimioterapèutics (Taniguchi *et al.*, 2012). L'ús de MGO com a tractament anticancerígen inhibeix la migració i invasió de cèl·lules cancerígenes del fetge, però incrementa la proliferació, migració i invasió de la línia cel·lular de càncer de mama MDA-MD-231 (Loarca *et al.*, 2013; Sharaf *et al.*, 2015). Resumint, els nostres resultats suggereixen que la teràpia amb GO podria obtenir millors resultats que la teràpia amb el MGO ja que el GO afecta a la migració cel·lular, col·lapsa la vimentina i indueix deciliació sense incrementar l'expressió gènica de MMP-9.

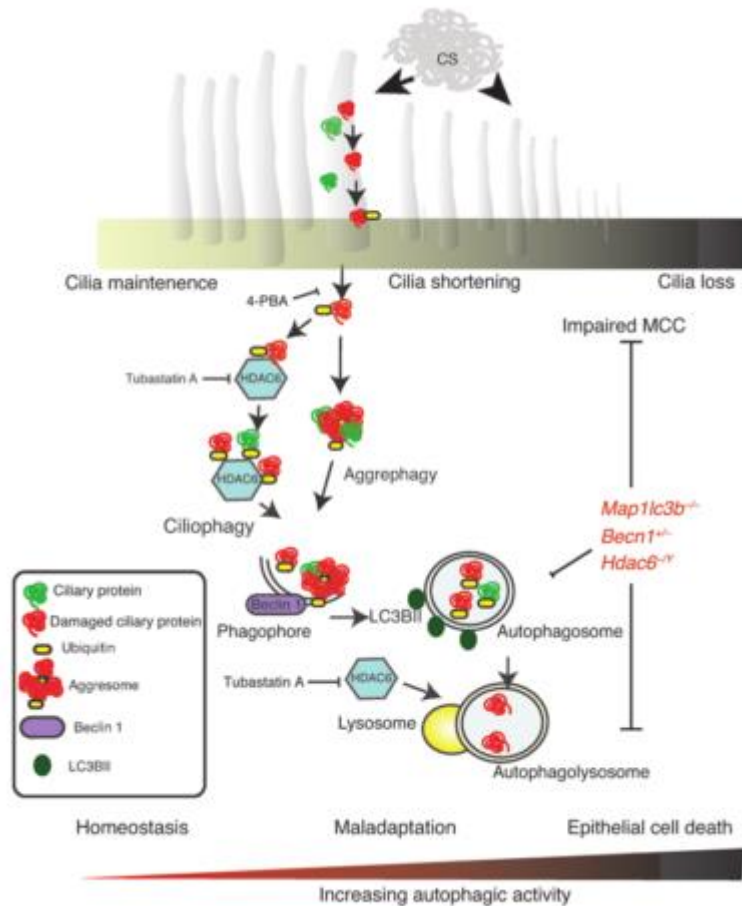


Figura 10. Esquema de la ciliofagia induïda pel fum del tabac (CS). El fum del tabac induïx estrès oxidatiu, el qual causa dany en les proteïnes del cili, mal plegament, ubiquitinització i formació d'agregats. L'HDAC6 reconeix els agregats les proteïnes ubiquitinitzades i els porta a l'agregosoma. Les proteïnes del cili són llavors conduïdes al lisosoma per a la seva degradació i reciclatge. (Lam *et al.*, 2013).

En conclusió, hem trobat que els RCC afecten a la reparació de ferides en cèl·lules tubulars de manera diferenciada. El nostre estudi mostra per primera vegada que el MDA i el GO retarden el tancament de les ferides en l'epiteli tubular mitjançant disrupció de la vimentina i desciliació. Les cèl·lules tractades amb HHE, en canvi, mostren un fenotip propi de la EMT però la nostra hipòtesi és que la menor disrupció de vimentina és suficient per prevenir un increment de la migració. Aquest és el primer estudi que avalua els efectes dels RCC en la reparació de ferides en el ronyó. Les nostres dades i el paper publicat de l'HDAC6 en l'agregosoma i la desciliació, indiquen la possibilitat de que HDAC6 tingui un paper clau en el retard de la reparació de ferides induït per MDA i GO. És necessària una millor comprensió dels

efectes de les toxines urèmiques en la curació de ferides, la fibrosi i la migració cel·lular per tal de buscar mecanismes per a frenar la fibrosi renal.

5.CONCLUSIONS

5. Conclusions

Tenint en compte els objectius inicialment proposats i després de la discussió dels resultats obtinguts, d'aquest treball se'n deriven les següents conclusions:

Respecte als estudis de dany genètic en pacients amb malaltia renal crònica (MRC), podem concloure que :

1. Els pacients amb MRC presenten dany genètic i inestabilitat genòmica, independentment de l'estadi de la malaltia o si estan sotmesos a diàlisi.
2. El temps en hemodiàlisi ajuda a disminuir els nivells de dany en el DNA i incrementa l'habilitat de reparació en els pacients amb MRC.
3. L'hemodiafiltració és una bona alternativa a l'HD per disminuir els nivells de dany genètic dels malalts amb MRC, i millorar la seva capacitat antioxidant.
4. L'ús de membranes de vitamina E, per tal de reduir el dany genètic dels pacients amb MRC, no és aconsellable ja que tot i que redueixen les bases oxidades del DNA, tenen un preu molt elevat i no han demostrat canviar significativament la capacitat antioxidant del plasma ni la freqüència basal de MN i trencaments en el DNA.

Respecte als estudis *in vitro* sobre l'efecte dels compostos reactius carbonils en la reparació de ferides i en la fibrosi en cèl·lules epitelials del túbul proximal, podem concloure que:

5. L'estudi de diferents compostos reactius de carbonil ha permès observar que aquests tenen diferents efectes sobre la reparació de ferides i sobre la transició epiteli-mesènquima (EMT).
6. El malondialdehid i el glioxal endarrereixen la reparació de les ferides mitjançant el col·lapse de la vimentina, que produeix una disminució de mRNAs de col·lagen, i la desciliació de les cèl·lules epitelials.

7. L'hidroxihexenal, i en menor grau el metilglioxal, produeixen canvis morfològics, transcriptòmics i proteics en les cèl·lules epitelials de ronyó compatibles amb l'EMT. La lleu disrupció de la vimentina observada després d'aquests tractaments, evita un increment en la capacitat de migració propi d'una completa EMT.

5. Conclusions

Taking into consideration the planned objectives, and after the discussion of the obtained results we concluded that:

Regarding the studies on the DNA damage in patients with chronic kidney disease (CKD), we concluded that:

1. The CKD patients have high DNA damage and genetic instability, independently of disease stage or whether they are submitted to hemodialysis (HD).
2. The time in HD helped to reduce DNA damage levels and to increase the DNA repair capacity of CKD patients.
3. The hemodiafiltration is a good alternative to the hemodialysis to reduce DNA damage levels in CKD patients and to improve their antioxidant capacity.
4. We do not recommend the use of vitamin-E covered membranes to reduce the DNA damage of CKD because, in spite of the observed reduction in oxidized DNA bases, they are more expensive than normal polysulfone membranes and failed to reduce antioxidant capacity and basal frequency of MN and DNA breaks.

Regarding the *in vitro* studies determining the effect of reactive carbonyl compounds (RCC) on wound healing and fibrosis in proximal epithelial tubular cells, we concluded that:

5. The study of four different RCC allowed us to observe that RCC differentially affects wound healing and epithelial-mesenchymal transition (EMT) potential.
6. Malonyldialdehyde and glyoxal compounds delay wound closure mediated by vimentin disruption, which induces collagen mRNAs reduction, and deciliation.
7. 4-hydroxy-hexenal treated cells (and methylglyoxal in minor degree) exhibited mesenchymal-like phenotype. The minor vimentin disruption observed prevented migration enhancement.

6.BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- Abramowitz, M.K., Meyer, T.W. i Hostetter, T.H. (2010). The Pathophysiology of Uremia. Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney. 3ª ed., 251–64. Elsevier Inc.
- Akhand, A.A., Hossain, K., Mitsui, H., Kato, M., Miyata, T., Inagi, R., Du, J., Takeda, K., Kawamoto, Y., Suzuki, H., Kurokawa, K., Nakashima, I. (2001). Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for map family kinases and caspase activation in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 31: 20–30.
- Alcázar, R., Egocheaga, M.I., Orte, L., Lobos, J.M., González Parra, E., Alvarez Guisasola, F., Górriz, J.L., Navarro, J.F., Martín de Francisco, A.L. (2008). Documento de consenso S.E.N.-semFYC sobre la enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 28: 273–82.
- Arduino, M.J., Patel, P.R., Thompson, N.D. i Favero, M.S. (2010). Hemodialysis-associated infections. *Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney*. 3ª ed., 335–53. Elsevier Inc.
- Arenas Jiménez, M., Gil González, M. i Delgado Conde, P. (2012). Complicaciones por órganos y aparatos, editat per Lorenzo-Sellarés i J.M. López-Gómez, 2ª ed. Barcelona: Sociedad Española de Nefrología. Plusmedica. <http://nefrologiadigital.revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-complicaciones-por-organos-aparatos-XX342164212000360>.
- Armario, P., Brugulat, P., Busqué, A., Cabré, J.J., Calero, F., Dalfó, A., Felip, À. Fuster, J., Galceran, JM., Gibert, E., Henández, JM., Lozano, J., Martínez-Castelao, A., Medina, C., Montanya, E., Pastoret, M., Ramírez, J., Rodríguez, A., Tovillas, X. (2012). Consens català sobre l'atenció a la malaltia renal crònica. http://www.socane.cat/documents_consens.php.
- Bae, E.H., Cho, S., Joo, S.Y., Ma, S.K., Kim, S.H., Lee, J., Kim, S.W. (2011). 4-Hydroxy-2-hexenal-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant*, 26: 3866–73.
- Baeyens, A., i Slabbert, J. (2010). Chromosomal radiosensitivity of HIV positive individuals. *Int. J. Radiat. Biol.*, 86: 584–92.
- Barroso, S. (2007). Is Kt/V the dialysis dose best indicator? *Nefrología*, 27: 667–69.

- Bash, L.D., Coresh, J., Kottgen, A., Parekh, R.S., Fulop, T., Wang, Y. i Astor, B.C. (2009). Defining Incident Chronic Kidney Disease in the Research Setting: The ARIC Study. *Am. J. Epidemiol.*, 170: 414–24.
- Baynes, J.W. i Thorpe, S.R. (2000). Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 28: 1708–16.
- Beaulieu, M.C., Curtis, B.M., Levin, A. (2010). Sleep disorders in chronic kidney disease. *Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney*. 3^a ed., 75–86. Elsevier Inc.
- Bedi, S., Vidyasagar, A., Djamali, A. (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis. *Transplant. Rev.*, 22: 1–5.
- Benz, R.L., Pressman, M.R., Hovick, E.T., Peterson, D.D. (2000). Potential novel predictors of mortality in end-stage renal disease patients with sleep disorders. *Am. J. Kidney Dis.*, 35: 1052–60.
- Betton, G.R., Kenne, K., Somers, R., Marr, A. (2005). Protein biomarkers of nephrotoxicity; a review and findings with cyclosporin A, a signal transduction kinase inhibitor and N-phenylanthranilic acid. *Cancer Biomark.*, 1: 59–67.
- Bhatia, A. i Kumar, Y. (2014). Relevance of microscopic indicators of chromosomal instability in routine reporting of malignancies. *Diagn. Cytopathol.*, 42: 181–88.
- Blitzer, A.L., Panagis, L., Gusella, G.L., Danias, J., Mlodzik, M. i Iomini, C. (2011). Primary cilia dynamics instruct tissue patterning and repair of corneal endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108: 2819–24.
- Bohle, A., Mackensen-Haen, S., von Gise, H., Grund, K.E., Wehrmann, M., Batz, C., Bogenschütz, O., Schmitt, H., Nagy, J. i Müller, C. (1990). The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathol. Res. Pract.*, 186: 135–44.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M. Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, MP, Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, MR., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28: 625–31.
- Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Hansteen, IL., Knudsen, LE., Lazutka, J., Rossner, P.,

- Sram, R.J., Boffetta, P. (2008). Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*, 29: 1178–83.
- Boxall, M.C., Goodship, T.H.J., Brown, A.L., Ward, M.C., von Zglinicki, T. (2006). Telomere shortening and haemodialysis. *Blood Purif.*, 24: 185–89.
- Brunelli, S.M. i Berns, J.S. (2010). Anemia in chronic kidney disease. *Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney*. 3^a ed., 87–97. Elsevier Inc.
- Buemi, M., Floccari, F., Costa, C., Caccamo, C., Belghity, N., Campo, S., Pernice, F., Bonvisuto, G., Coppolino, G., Barillà, A., Criseo, M., Crascì, E., Nostro, L., Arena, A. (2006). Dialysis-related genotoxicity: sister chromatid exchanges and DNA lesions in T and B lymphocytes of uremic patients. Genomic damage in patients on hemodiafiltration. *Blood Purif.*, 24: 569–74.
- Buemi, M., Costa, C., Floccari, F., Coppolino, G., Campo, S., Bolignano, D., Sturiale, A., Lacquaniti, A., Buemi, A., Loddo, S., Teti, D.(2010). Genomic damage in endothelial progenitor cells from uremic patients in hemodialysis. *J. Nephrol.*, 23: 328–34.
- Burlinson, B. (2012). The in vitro and in vivo comet assays. *Methods Mol. Biol.*, 817: 143–63.
- Burns, W.C., Twigg, S.M., Forbes, J.M., Pete, J., Tikellis, C., Thallas-Bonke, V., Thomas, M.C., Cooper, M.E., Kantharidis, P. (2006). Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17: 2484–94.
- Cai, Z., Chen, H., Tao, J., Guo, W., Liu, X., Zheng, B., Sun, W., Wang, Y. (2012). Association of base excision repair gene polymorphisms with ESRD risk in a Chinese population. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2012: 928421.
- 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: 2087–93.
- Cao, H., Ye, H., Sun, Z., Shen, X., Song, Z., Wu, X., He, W., Dai, C., Yang, J. (2014). Circulatory mitochondrial DNA is a pro-inflammatory agent in maintenance hemodialysis patients. *PLoS One*, 9: e113179.
- Cardin, R., Piciocchi, M., Bortolami, M., Kotsafti, A., Barzon, L., Lavezzo, E., Sinigaglia, A., Rodriguez-Castro, K.I., Rugge, M., Farinati, F. (2014). Oxidative damage in the progression

- of chronic liver disease to hepatocellular carcinoma: an intricate pathway. *World J. Gastroenterol.*, 20: 3078–86.
- Cengiz, K., Block, A., Hossfeld, D. (1988). Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients. *Cancer Genet. Cytogenet.* 36: 55–67.
- Challa, A.A. i Stefanovic, B. (2011). A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs. *Mol. Cell. Biol.*, 31: 3773–89.
- Chanard, J., Lavaud, S., Randoux, C., Rieu, P. (2003). New insights in dialysis membrane biocompatibility: relevance of adsorption properties and heparin binding. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 18: 252–57.
- Cheung, A.K., Rocco, M. V, Yan, G., Leyboldt, J.K., Levin, N.W., Greene, T., Agodoa, L., Bailey, J., Beck, GJ., Clark, W., Levey, AS., Ornt, DB., Schulman, G., Schwab, S., Teehan, B., Eknoyan, G., (2006). Serum beta-2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients: results of the HEMO study. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17: 546–55.
- Chistiakov, D. (2008). Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol. (Madr)*., 47: 809–24.
- Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Gadbail, A.R., Sharma, A., Tekade, S. (2014). Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncol.*, 50: 10–18.
- Chung, S., Koh, E.S., Shin, S.J., Park, C.W. (2012). Malnutrition in patients with chronic kidney disease. *Open J. Intern. Med.*, 02. Scientific Research Publishing: 89–99.
- Clermont, G., Lecour, S., Cabanne, J.F., Motte, G., Guillard, J.C., Chevet, D., Rochette, L. (2001). Vitamin E-coated dialyzer reduces oxidative stress in hemodialysis patients. *Free Radic. Biol. Med.*, 31: 233–41.
- Cohen, E. (2006). Cancer and chronic kidney disease. October, 2006 - Amsterdam, The Netherlands. <http://kdigo.org/home/conferences/chronic-kidney-disease-as-a-global-public-health-problem-approaches-and-initiatives-2006>.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 26: 249–61.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 17: 1195–1214.

- Coresh, J., Selvin, E., Stevens, L.A., Manzi, J., Kusek, J.W., Eggers, P., Van Lente, F. i Levey, A.S. (2007). Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*, 298. American Medical Association: 2038–47.
- Coronel Díaz, F. i Macía Heras, M. (2012). Indicaciones y modalidades de diálisis peritoneal, editat per Víctor Lorenzo-Sellarés i Juan Manuel López-Gómez, 2ª ed. Barcelona: Sociedad española de nefrología. Plusmedical. <http://nefrologia.digital.revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-indicaciones-modalidades-dialisis-peritoneal-XX342164212000203>.
- Corredor, Z., Stoyanova, E., Rodríguez-Ribera, L., Coll, E., Silva, I., Diaz, J.M., Ballarin, J., Marcos, R., Pastor, S. (2014). Genomic damage as a biomarker of chronic kidney disease status. *Environ. Mol. Mutagen.*, 56: 301–12.
- Costa, A., Scholer-Dahirel, A., Mechta-Grigoriou, F. (2014). The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin. Cancer Biol.*, 25: 23–32.
- Cukor, D., Rosenthal, D.S., Kimmel, P.L. (2010). Depression and neurocognitive function in chronic kidney disease. *Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney*. 3ª ed., 218–30. Elsevier Inc.
- Dee Silverthorn, U. (2014). *Fisiología Humana. un enfoque integrado*. 6th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. <http://www.medicapanamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9786079356224>
- Den Hoedt, C.H., Bots, M.L., Grooteman, M.P.C., van der Weerd, N.C., Mazairac, A.H.A., Penne, E.L., Levesque, R., ter Wee, P.M., Nubé, M.J., Blankestijn, P.J., van den Dorpel, M.A. (2014). Online hemodiafiltration reduces systemic inflammation compared to low-flux hemodialysis. *Kidney Int.*, 86: 423–32.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.*, 32: 1102–15.
- Domenici, F.A., Vannucchi, M.T.I., Jordão, A. a., Meirelles, M.S.S., Vannucchi, H. (2005). DNA Oxidative Damage in Patients with Dialysis Treatment. *Ren. Fail.*, 27: 689–94.
- Doorn, J.A. i Petersen, D.R. (2003). Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chem. Biol. Interact.*, 143-144: 93–100.

- Dou, L., Bertrand, E., Cerini, C., Faure, V., Sampol, J., Vanholder, R., Berland, Y., Brunet, P. (2004). The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int.*, 65: 442–51.
- Durantón, F. i Cohen, G. (2012). Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J. Am. Soc. Neph.*, 23: 1258–70.
- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delouvee, A., Koteliansky, V., Babinet, C., Krieg, TA. (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 111: 1897–1907.
- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T., Martin, P. (2000). Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J. Cell Sci.*, 113: 2455–62.
- Eckl, P.M., Ortner, A., Esterbauer, H. (1993). Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes. *Mutat. Res.*, 290: 183–92.
- Eloot, S., Van Biesen, W., Glorieux, G., Neiryneck, N., Dhondt, A., Vanholder, R. (2013). Does the adequacy parameter Kt/V(urea) reflect uremic toxin concentrations in hemodialysis patients? *PLoS One*, 8: e76838.
- ERA-EDTA Registry. (2014). ERA-EDTA Registry Annual Report 2012. Amsterdam, The Netherlands. <http://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2012.pdf>.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, 2: 1084–1104.
- Ferguson, L.R., Chen, H., Collins, A.R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., Malhotra, M., Meeker, A.K., Amedei, A., Amin, A., Ashraf, S.S., Aquilano, K., Azmi, A.S., Bhakta, D., Bilsland, A., Boosani, C.S., Chen, S., Ciriolo, M.R., Fujii, H., Guha, G., Halicka, D., Helferich, W.G., Keith, W.N., Mohammed, S.I., Niccolai, E., Yang, X., Honoki, K., Parslow, V.R., Prakash, S., Rezazadeh, S., Shackelford, R.E., Sidransky, D., Tran, P.T., Yang, E.S., Maxwell, C.A. (2015). Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin. Cancer Biol.*, S1044–1579 doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.005
- Fernández, M.L. i Teruel, J.L.B. (2012). Técnicas de hemodiálisis, editat per Víctor Lorenzo-Sellarés i Juan Manuel López-Gómez, 2nd ed., 437–46. Barcelona: Sociedad española de nefrología. Plusmedical. <http://nefrologiadigital.Revista nefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-tecnicas-hemodialisis-XX342164212000262>.

- Fleming, T.H., Theilen, T.-M., Masania, J., Wunderle, M., Karimi, J., Vittas, S., Bernauer, R., Bierhaus, A., Rabbani, N., Thornalley, P.J., Kroll, J., Tyedmers, J., Nawrothki, R., Herzig, S., Brownlee, M., Nawroth, P.P. (2013). Aging-dependent reduction in glyoxalase 1 delays wound healing. *Gerontology*, 59: 427–37.
- Fox, C.S., Larson, M.G., Leip, E.P., Culeton, B., Wilson, P.W.F., Levy, D. (2004). Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA*, 291: 844–50.
- Fragedaki, E., Nebel, M., Schupp, N. (2005). Genomic damage and circulating AGE levels in patients undergoing daily versus standard haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20: 1936–43.
- Friedman, J., Levi, J., Malachi, T., Slor, H. (1988). Pronounced depressed ability of DNA repair in uremic human lymphocytes. *Transplantation*, 45: 665–66.
- Fyhrquist, F., Saijonmaa, O., Strandberg, T. (2013). The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.*, 10: 274–83.
- Gallagher, M.P., Kelly, P.J., Jardine, M., Perkovic, V., Cass, A., Craig, J.C., Eris, J., Webster, A.C. (2010). Long-term cancer risk of immunosuppressive regimens after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21: 852–58.
- Gandhi, S. i Abramov, A.Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2012:11 pages.
- Gerich, J.E., Meyer, C., Woerle, H.J., Stumvoll, M. (2001). Renal Gluconeogenesis: Its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*, 24: 382–91.
- González-Diez, B. (2001). Progressión de la insuficiència renal crònica i estrés oxidativo <http://www.uninet.edu/cin2001/html/es/programa.html>.
- González-Diez, B., Cavia, M., Torres, G., Abaigar, P., Muñoz, 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. Karger Publishers: 505–10.
- Goova, M.T., Li, J., Kislinger, T., Qu, W., Lu, Y., Bucciarelli, L.G., Nowygrod, S., Wolf, B.M., Caliste, X., Yan, S.F., Stern, D.M., Schmidt, A.M. (2001). Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am. J. Pathol.*, 159: 513–25.

- Gorostidi, M., Santamaría, R., Alcázar, R., Fernández-Fresnedo, G., Galcerán, J.M., Goicoechea, M., Oliveras, A., Portolés, J., Rubio, E., Segura, J., Aranda, P., de Francisco, A., Del Pino, MD., Fernández-Vega, F., Górriz, J.L., Luño, J., Marín, R., Martínez, I., Martínez-Castelao, A., Orte, LM., Quereda, C., Rodríguez-Pérez, J.C., Rodríguez, M., Ruilope, LM. (2014). Documento de la sociedad española de nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 34: 302–16.
- Gradilone, S.A., Radtke, B.N., Bogert, P.S., Huang, B.Q., Gajdos, G.B., LaRusso, N.F. (2013). HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth. *Cancer Res.*, 73: 2259–70.
- Grooteman, M. (2012). Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 23: 1087–96.
- Gupta-Elera, G., Garrett, A.R., Robison, R.A. and O'Neill, K.L. (2012). The role of oxidative stress in prostate cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, 21: 155–62.
- Hain, D.J. (2008). Cognitive function and adherence of older adults undergoing hemodialysis. *Nephrol. Nurs. J.*, 35: 23–29.
- Harris, R.C., Neilson, E.G. (2006). Toward a unified theory of renal progression. *Annu. Rev. Med.*, 57: 365–80.
- Hashimoto, H., Mio, T., Sumino, K. (1996). Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta.*, 252: 137–45.
- Haucke, E., Navarrete-Santos, A., Simm, A., Silber, R.-E., Hofmann, B. (2014). Glycation of extracellular matrix proteins impairs migration of immune cells. *Wound Repair Regen.*, 22: 239–45.
- Hedayati, S.S., Bosworth, H.B., Briley, L.P., Sloane, R.J., Pieper, C.F., Kimmel, P.L., Szczech, L.A. (2008). Death or hospitalization of patients on chronic hemodialysis is associated with a physician-based diagnosis of depression. *Kidney Int.*, 74: 930–36.
- Herman, M., Weinstein, T., Korzets, A. (2001). Effect of cyclosporin A on DNA repair and cancer incidence in kidney transplant recipients. *J. Lab. Clin. Med.*, 137: 14–20.
- Hertig, A., Anglicheau, D., Verine, J., Pallet, N., Touzot, M., Ancel, P.-Y., Mesnard, L., Brousse, N., Baugey, E., Glotz, D., Legendre, C., Rondeau, E., Xu-Dubois, YC (2008). Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19: 1584–91.

- Hewitson, T.D. (2009). Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 296: F1239–44.
- Ho, C., Lee, P.-H., Huang, W.-J., Hsu, Y.-C., Lin, C.-L., Wang, J.-Y. (2007). Methylglyoxal-induced fibronectin gene expression through Ras-mediated NADPH oxidase activation in renal mesangial cells. *Nephrology*, 12: 348–56.
- Hodkova, M., Dusilova-Sulkova, S., Kalousova, M., Soukupova, J., Zima, T., Mikova, D., Malbohan, I.M., Bartunkova, J. (2006). Influence of oral vitamin E therapy on micro-inflammation and cardiovascular disease markers in chronic hemodialysis patients. *Ren. Fail.*, 28: 395–99.
- Horowitz, H.I. (1970). Uremic Toxins and Platelet Function. *Arch. Intern. Med.*, 126. American Medical Association: 823–26.
- Hsu, C.C., Kao, W.H.L., Coresh, J., Pankow, J.S., Marsh-Manzi, J., Boerwinkle, E. and Bray, M.S. (2005). Apolipoprotein E and progression of chronic kidney disease. *JAMA*, 293: 2892–99.
- Huang, J., Yi, B., Li, A.-M., Zhang, H. (2015). Effects of vitamin E-coated dialysis membranes on anemia, nutrition and dyslipidemia status in hemodialysis patients: a meta-analysis. *Ren. Fail.*, 37: 398-407.
- Huijberts, M.S.P., Schaper, N.C., Schalkwijk, C.G. (2008). Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, 24 Suppl 1: S19–24.
- Hung, A., Pupim, L., Yu, C., Shintani, A., Siew, E., Ayus, C., Hakim, R.M., Ikizler, T.A. (2008). Determinants of C-reactive protein in chronic hemodialysis patients: relevance of dialysis catheter utilization. *Hemodial. Int.*, 12: 236–43.
- Ikizler, A. i Pupim, L.B. (2010). Nutrition and metabolism in kidney disease. *Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney. 3^a ed.*, 75–86. Elsevier Inc.
- Ivaska, J., Pallari, H.-M., Nevo, J., Eriksson, J.E. (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.*, 313: 2050–62.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 110: 341–50.
- Jackson, P., Loughrey, C.M., Lightbody, J.H., McNamee, P.T., Young, I.S. (1995). Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin. Chem.*, 41: 1135–38.

- James, M.T., Hemmelgarn, B.R. i Tonelli, M. (2010). Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet*, 375. Elsevier Ltd: 1296–1309.
- Jones, T.J., Adapala, R.K., Geldenhuys, W.J., Bursley, C., AbouAlaiwi, W.A., Nauli, S.M., Thodeti, C.K. (2012). Primary cilia regulates the directional migration and barrier integrity of endothelial cells through the modulation of hsp27 dependent actin cytoskeletal organization. *J. Cell. Physiol.*, 227: 70–76.
- Kan, E., Ündeğer, Ü., Bali, M., Başaran, N. (2002). Assessment of DNA strand breakage by the alkaline COMET assay in dialysis patients and the role of Vitamin E supplementation. *Mutat. Res.*, 520: 151–59.
- Kang, Y., Edwards, L.G., Thornalley, P.J. (1996). Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leuk. Res.*, 20: 397–405.
- Kannel, W.B., Feinleib, M., McNamara, P.M., Garrison, R.J., Castelli, W.P. (1979). An investigation of coronary heart disease in families. The Framingham offspring study. *Am. J. Epidemiol.*, 110: 281–90.
- Kao, P.C., Shiesh, S.-C., Wu, T.-J. (2006). Serum C-reactive protein as a marker for wellness assessment. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 36: 163–69.
- Kasai, H., Kumeno, K., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Nagao, M., Fujita, Y., Sugimura, T., Nukaya, H., Kosuge, T. (1982). Mutagenicity of methylglyoxal in coffee. *Gan*, 73: 681–83.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., Yao, T.-P. (2003). The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell*, 115: 727–38.
- KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) CKD Work Group. (2013). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Suppl.*, 3: 4–4.
- Kobras, K. i Schupp, N. (2006). Relation between different treatment modalities and genomic damage of end-stage renal failure patients. *Kidney Blood Press. Res.*, 29: 10–17.
- Kovesdy, C.P. i Kalantar-Zaddeh, K. (2010). Inflammation in chronic kidney disease. Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney. 3^a ed., 183–97. Elsevier Inc.

- Krieter, D.H. i Canaud, B. (2003). High permeability of dialysis membranes: what is the limit of albumin loss? *Nephrol. Dial. Transplant.*, 18: 651–54.
- Kriz, W. i LeHir, M. (2005). Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int.*, 67: 404–19.
- Kueper, T., Grune, T., Prah, S., Lenz, H., Welge, V., Biernoth, T., Vogt, Y., Muhr, G-M., Gaemlich, A., Jung, T., Boemke, G., Elsässer, H-P., Wittern, K-P., Wenck, H., Stäb, F., Blatt, T. (2007). Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *J. Biol. Chem.*, 282: 23427–36.
- Kuncio, G.S., Neilson, E.G., Haverty, T. (1991). Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int.*, 39: 550–56.
- Lai, K., Lam, M., Leung, J., Chan, L., Lam, C., Chan, I.S., Chan, H., Li, C., Wong, S., Ho, Y., Cheuk, A., Tong, M., Tang, S. (2012). A study of the clinical and biochemical profile of peritoneal dialysis fluid low in glucose degradation products. *Perit. Dial. Int.*, 32: 280–91.
- Lam, H.C., Cloonan, S.M., Bhashyam, A.R., Haspel, J.A., Singh, A., Sathirapongsasuti, J.F., Cervo, M., Yao, H., Chung, A.L., Mizumura, K., An, C.H., Shan, B., Franks, J.M., Haley, K.J., Owen, C.A., Tesfaigzi, Y., Washko, G.R., Quackenbush, J., Silverman, E.K., Rahman, I., Kim, H.P., Mahmood, A., Biswal, S.S., Ryter, S.W., Choi, A.(2013). Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 123: 5212–30.
- Levey, A.S., Bosch, J.P., Lewis, J.B., Greene, T., Rogers, N., Roth, D. (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Intern. Med.*, 130: 461–70.
- Levey, A.S., Stevens, L.A., Schmid, C.H., Zhang, Y.L., Castro, A.F., Feldman, H.I., Kusek, J.W., Eggers, P., Van Lente, F., Greene, T., Coresh, J. (2009). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.*, 150: 604–12.
- Levey, A.S., de Jong, P.E., Coresh, J., El Nahas, M., Astor, B.C., Matsushita, K., Gansevoort, R.T., Kasiske, B.L., Eckardt, K.-U. (2011). The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.*, 80. International Society of Nephrology: 17–28.

- Li, P.K.T., Szeto, C.C., Piraino, B., Bernardini, J., Figueiredo, A.E., Gupta, A., Johnson, D.W. Kuijper, E.J., Lye, W-C., Salzer, W., Schaefer, F.(2010). Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update. *Perit. Dial. Int.*, 30: 393–423.
- 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: 37–41.
- Liangos, O. i Jaber, B.L. (2010). Acute complications associated with hemodialysis. *Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney*. 3^a ed., 354–69. Elsevier Inc.
- Lines, S.W., Carter, A.M., Dunn, E.J., Lindley, E.J., Tattersall, J.E., Wright, M.J. (2014). A randomized controlled trial evaluating the erythropoiesis stimulating agent sparing potential of a vitamin E-bonded polysulfone dialysis membrane. *Nephrol. Dial. Transplant*, 29: 649–56.
- Liu, CS. (2001). Biomarkers of DNA damage in patients with end-stage renal disease: mitochondrial DNA mutation in hair follicles. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16: 561–65.
- Liu, Y., Rajur, K., Tolbert, E. and Dworkin, L.D. (2000). Endogenous hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal injury by activating matrix degradation pathways. *Kidney Int.*, 58: 2028–43.
- Liu, Y. (2010). New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21: 212–22.
- Loarca, L., Sassi-Gaha, S., Artlett, C.M. (2013). Two α -dicarbonyls downregulate migration, invasion, and adhesion of liver cancer cells in a p53-dependent manner. *Dig. Liver Dis.*, 45: 938–46.
- Locatelli, F., Altieri, P., Andrulli, S., Bolasco, P., Sau, G., Pedrini, L.A., Basile, C. David, S., Feriani, M., Montagna, G., Di Iorio, BR., Memoli, B., Cravero, R., Battaglia, G., Zoccali, C. (2010). Hemofiltration and hemodiafiltration reduce intradialytic hypotension in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21: 1798–1807.
- Lorenzo-Sellarés, V. (2012). Principios físicos: definiciones y conceptos, editat per Víctor Lorenzo-Sellarés i Juan Manuel López-Gómez, 2nd ed., 355–68. Barcelona: Sociedad española de nefrología. Plusmedical. http://nefrologiadigital.revista_nefrologia.com/es-libros-monografias-actualizables-nefrologia-dia.

- Loughlin, D.T., Artlett, C.M. (2009). 3-Deoxyglucosone-collagen alters human dermal fibroblast migration and adhesion: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. *Wound Repair Regen.*, 17: 739–49.
- Loughlin, D.T. i Artlett, C.M. (2011). Modification of collagen by 3-deoxyglucosone alters wound healing through differential regulation of p38 MAP kinase. *PLoS One*, 6. Public Library of Science: e18676.
- Maduell, F., Moreso, F., Pons, M., Ramos, R., Mora-Macià, J., Carreras, J., Soler, J., Torres, F., Campistol, J.M., Martínez-Castelao, A. (2013). High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 24: 487–97.
- 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: 93–99.
- Malachi, T., Zevin, D., Gafer, U., Chagnac, A. (1993). DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients. *Kidney Int.*, 44: 385–89.
- Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.*, 424: 83–95.
- Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21: 361–70.
- Martín-Malo, A. i de Francisco, A.L.M. (2012). *Dializadores y membranas de diálisis*, editat per Víctor Lorenzo-Sellarés i Juan Manuel López-Gómez, 2^a ed. Barcelona: Sociedad española de nefrología. Plusmedical. [http://nefrologiadigital.Revista nefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-dializadores-membranas-dialisis-XX342164212000352](http://nefrologiadigital.Revista_nefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-dializadores-membranas-dialisis-XX342164212000352).
- Martyniuk, C.J., Fang, B., Koomen, J.M., Gavin, T., Zhang, L., Barber, D.S., Lopachin, R.M. (2011). Molecular mechanism of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by α,β -unsaturated carbonyl derivatives. *Chem. Res. Toxicol.*, 24: 2302–11.
- Memoli, B., Minutolo, R., Bisesti, V., Postiglione, L., Conti, A., Marzano, L., Capuano, A. Andreucci, M., Balletta, M.M., Guida, B., Tetta, C. (2002). Changes of serum albumin and C-reactive protein are related to changes of interleukin-6 release by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients treated with different membranes. *Am. J. Kidney Dis.*, 39: 266–73.

- Mendez, M.G., Kojima, S.-I., Goldman, R.D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.*, 24: 1838–51.
- Menko, A.S., Bleaken, B.M., Libowitz, A.A., Zhang, L., Stepp, M.A., Walker, J.L. (2014). A central role for vimentin in regulating repair function during healing of the lens epithelium. *Mol. Biol. Cell*, 25: 776–90.
- Meran, S., Steadman, R. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.*, 92: 158–67.
- Miyata, T., Oda, O., Inagi, R., Iida, Y., Araki, N., Yamada, N., Horiuchi, S., Taniguchi, N., Maeda, K., Kinoshita, T. (1993). Beta 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J. Clin. Invest.*, 92: 1243–52.
- Miyata, T., Sugiyama, S., Saito, A., Kurokawa, K. (2001). Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity (“carbonyl stress”). *Kidney Int. Suppl.*, 78: S25–31.
- Moe, S.M. (2010). Chronic kidney disease - mineral bone disorder. *Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney*. 3^a ed., 98–114. Elsevier Inc.
- Morgera, S., Klonower, D., Rocktäschel, J., Haase, M., Priem, F., Ziemer, S., Wegner, B., Göhl, H., Neumayer, H.-H. (2003). TNF-alpha elimination with high cut-off haemofilters: a feasible clinical modality for septic patients? *Nephrol. Dial. Transplant*, 18: 1361–69.
- Mostovaya, I.M., Blankestijn, P.J., Bots, M.L., Covic, A., Davenport, A., Grooteman, M.P.C., Hegbrant, J., Locatelli, F., Vanholder, R., Nubé, M.J. (2014). Clinical Evidence on Hemodiafiltration: A Systematic Review and a Meta-analysis. *Semin. Dial.*, 27: 119–27.
- Mozdarani, H. (2005). Cytogenetic radiosensitivity of g0-lymphocytes of breast and esophageal cancer patients as determined by micronucleus assay. *J. Radiat. Res.*, 46: 111–16.
- Müller, C., Eisenbrand, G., Gradinger, M., Rath, T., Albert, F.W., Vienken, J., Singh, R., Farmer, P.B., Stockis, J.-P., Janzowski, C. (2004). Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients. *Free Radic. Res.*, 38: 1093–1100.
- Murillo, J., Wang, Y., Xu, X., Klebe, R.J., Chen, Z., Zardeneta, G., Pal, S., Mikhailova, M. i Steffensen, B. (2008). Advanced glycation of type I collagen and fibronectin modifies periodontal cell behavior. *J. Periodontol.*, 79: 2190–99.

- Nakamura, T., Ushigome, H., Takata, T., Nakao, T., Harada, S., Koshino, K., Suzuki, T., Ito, T., Nobori, S., Yoshimura, N. (2015). Histopathologic impacts of everolimus introduction on kidney transplant recipients. *Transplant. Proc.*, 47: 630–34.
- Nath, K.A., Grande, J., Croatt, A., Haugen, J., Kim, Y., Rosenberg, M.E. (1998). Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression. *Kidney Int.*, 53: 367–81.
- National Kidney Foundation. (2002). K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.*, 39: S1–266.
- National Kidney Foundation. (2005). K/DOQI Clinical practice guidelines for cardiovascular disease in dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 45: S1–153.
- National Kidney Foundation. (2006). KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for 2006 Updates: Hemodialysis Adequacy, Peritoneal Dialysis Adequacy and Vascular Access. *Am. J. Kidney Dis.*, 48 Suppl 1: S248–73.
- National Kidney Foundation. (2007). Getting Ready for a “New Normal.” https://www.kidney.org/sites/default/files/docs/11-10-0306_dialysistransitionbk1_oct07_lr_bm.pdf.
- National Kidney Foundation. (2013). Guide for CKD Patients. HEMODIALYSIS: What You Need to Know. https://www.kidney.org/sites/default/files/11-50-0214_hemodialysis.pdf.
- Nemec, A.A., Wallace, S.S., Sweasy, J.B. (2010). Variant base excision repair proteins: contributors to genomic instability. *Semin. Cancer Biol.*, 20: 320–28.
- Nishitani, Y., Iwano, M., Yamaguchi, Y., Harada, K., Nakatani, K., Akai, Y., Nishino, T., Shiiki, H., Kanauchi, M., Saito, Y., Neilson, E. (2005). Fibroblast-specific protein 1 is a specific prognostic marker for renal survival in patients with IgAN. *Kidney Int.*, 68: 1078–85.
- Niwa, T., Miyazaki, S., Katsuzaki, T., Tatemichi, N., Takei, Y., Miyazaki, T., Morita, T., Hirasawa, Y. (1995). Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int.*, 48: 771–78.
- Nourazarian, A.R., Kangari, P., Salmaninejad, A. (2014). Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15: 4745–51.
- Oates, T., Pinney, J.H., Davenport, A. (2011). Haemodiafiltration versus high-flux haemodialysis: Effects on phosphate control and erythropoietin response. *Am. J. Nephrol.*, 33: 70–75.

- Ok, E., Asci, G., Toz, H. and Ok, E. (2013). Mortality and cardiovascular events in online haemodiafiltration (OL-HDF) compared with high-flux dialysis: results from the Turkish OL-HDF Study. *Nephrol. Dial. Transplant*, 28: 192–202.
- Otero, A., de Francisco, A., Gayoso, P. and García, F. (2010). Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia*, 30: 78-86.
- Overgaard, C.E., Sanzone, K.M., Spiczka, K.S., Sheff, D.R., Sandra, A., Yeaman, C. (2008). Deciliation Is Associated with Dramatic Remodeling of Epithelial Cell Junctions and Surface Domains. *Mol. Biol. Cell*, 20. American Society for Cell Biology: 102–13.
- Pamplona, R. (2011). Advanced lipoxidation end-products. *Chem. Biol. Interact.*, 192. Elsevier Ireland Ltd: 14–20.
- Panichi, V., Rizza, G.M., Paoletti, S., Bigazzi, R., Aloisi, M., Barsotti, G., Rindi, P. Donati, G., Antonelli, A., Panicucci, E., Tripepi, G., Tetta, C., Palla, Roberto et al. (2008). Chronic inflammation and mortality in haemodialysis: effect of different renal replacement therapies. Results from the RISCAVID study. *Nephrol. Dial. Transplant*, 23: 2337–43.
- Panichi, V., Scatena, A., Rosati, A., Giusti, R., Ferro, G., Malagnino, E., Capitanini, A., Piluso, A., Conti, P., Bernabini, G., Migliori, M., Caiani, D., Tetta, C., Casani, A., Betti, G., Pizzarelli, F.(2014). High-volume online haemodiafiltration improves erythropoiesis-stimulating agents (ESA) resistance in comparison with low-flux bicarbonate dialysis: results of the REDERT study. *Nephrol. Dial. Transplant*, 30: 682–89.
- Pardo, A. i Selman, M. (2006). Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc*, 3: 383–88.
- Pazour, G.J., San Agustin, J.T., Follit, J.A., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B. (2002). Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr. Biol.*, 12: R378–80.
- Pedrini, L.A., De Cristofaro, V., Comelli, M., Casino, F.G., Prencipe, M., Baroni, A., Campolo, G., Manzoni, C., Coli, L., Ruggiero, P., Acquistapace, I., Auriemma, L. (2011). Long-term effects of high-efficiency on-line haemodiafiltration on uraemic toxicity. A multicentre prospective randomized study. *Nephrol. Dial. Transplant*, 26: 2617–24.
- Penne, E.L., van der Weerd, N.C., van den Dorpel, M.A., Grooteman, M.P.C., Lévesque, R., Nubé, M.J., Bots, M.L., Blankestijn, P.J., ter Wee, P.M. (2010). Short-term effects of online hemodiafiltration on phosphate control: a result from the randomized controlled Convective Transport Study (CONTRAST). *Am. J. Kidney Dis.*, 55: 77–87.

- Pillon, N.J., Soulère, L., Vella, R.E., Croze, M., Caré, B.R., Soula, H.A., Doutheau, A., Lagarde, M., Soulage, C.O. (2010). Quantitative structure-activity relationship for 4-hydroxy-2-alkenal induced cytotoxicity in L6 muscle cells. *Chem. Biol. Interact.*, 188: 171–80.
- Puchades, M.J., Saez, G., Muñoz, M.C., Gonzalez, M., Torregrosa, I., Juan, I., Miguel, A. (2013). Study of oxidative stress in patients with advanced renal disease and undergoing either hemodialysis or peritoneal dialysis. *Clin. Nephrol.*, 80: 177–86.
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., Golemis, E.A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*, 129: 1351–63.
- Quan, T.E., Cowper, S.E., Bucala, R. (2006). The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 8: 145–50.
- Quarmby, L.M. (2004). Cellular Deflagellation. *Int Rev Cytol.*, 233: 47–91.
- Radford, R., Slattery, C., Jennings, P., Blacque, O., Blaque, O., Pfaller, W., Gmuender, H., Van Delft, J., Ryan, M.P., McMorrow, T. (2012). Carcinogens induce loss of the primary cilium in human renal proximal tubular epithelial cells independently of effects on the cell cycle. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 302: F905–16.
- Radwan, W.M., Elbarbary, H.S., Alsheikh, N.M. (2015). DNA repair genes XPD and XRCC1 polymorphisms and risk of end-stage renal disease in Egyptian population. *Ren. Fail.*, 37: 122–28.
- Rangel-López, A., Paniagua-Medina, M.E., Urbán-Reyes, M., Cortes-Arredondo, M., Alvarez-Aguilar, C., López-Meza, J., Ochoa-Zarzosa, A., Lindholm, B., García-López, E., Paniagua, J.R. (2013). Genetic damage in patients with chronic kidney disease, peritoneal dialysis and haemodialysis: a comparative study. *Mutagenesis*, 28: 219–25.
- Rath, T. i Oliveira-Frick, V. (2009). Mutagenicity of immunosuppressive medications among renal transplant recipients. *Am. J. Nephrol.*, 30: 514–20.
- Rathje, L.-S.Z., Nordgren, N., Pettersson, T., Rönnlund, D., Widengren, J., Aspenström, P., Gad, A.K.B. (2014). Oncogenes induce a vimentin filament collapse mediated by HDAC6 that is linked to cell stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111: 1515–20.
- REER (Registro Español de Enfermos Renales). (2013). Informe de diálisis y transplante 2013. Congr. Nac. La Soc. Española Nefrol., Barcelona. <http://www.senefro.org/modules.php?name=webstructure&idwebstructure=128>

- Remuzzi, G., Benigni, A., Remuzzi, A. (2006). Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J. Clin. Invest.*, 116: 288–96.
- Rigalleau, V. i Gin, H. (2005). Carbohydrate metabolism in uraemia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 8: 463–69.
- Robson, R., Cecka, J.M., Opelz, G., Budde, M. and Sacks, S. (2005). Prospective registry-based observational cohort study of the long-term risk of malignancies in renal transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Am. J. Transplant*, 5: 2954–60.
- Rosansky, S.J., Clark, W.F., Eggers, P., Glasscock, R.J. (2009). Initiation of dialysis at higher GFRs: is the apparent rising tide of early dialysis harmful or helpful? *Kidney Int.*, 76: 257–61.
- Rossini, M., Cheunsuchon, B., Donnert, E., Ma, L.J., Thomas, J.W., Neilson, E.G., Fogo, A.B. (2005). Immunolocalization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), its receptor (FGFR-1), and fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) in inflammatory renal disease. *Kidney Int.*, 68. *International Society of Nephrology*: 2621–28.
- Roth, J., Restani, R., Goncalves, T. (2008). Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test. *Genet Mol. Res.*, 7: 433–43.
- Sanaka, T., Mochizuki, T., Kinugasa, E., Kusano, E., Ohwada, S., Kuno, T., Kojima, K., Kobayashi, S., Satoh, M., Shimada, N., Nakao, K., Nakazawa, R., Nishimura, H., Noiri, E., Shigematsu, T., Tomo, T., Maeda, T.(2013). Randomized controlled open-label trial of vitamin E-bonded polysulfone dialyzer and erythropoiesis-stimulating agent response. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 8: 969–78.
- Sandoval, S.B., Stoyanova, E., Coll, E., Pastor, S., Reyes, J., Andrés, 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: 603–8.
- Sandoval, S.B., Pastor, S., Stoyanova, E., Rodríguez-Ribera, L., García-Quispes, W.A., Coll, E., Reyes, J., Andrés, E., Ballarin, J., Marcos, R. (2012). Genomic instability in chronic renal failure patients. *Environ. Mol. Mutagen.*, 53: 343–49.
- Satoh, M., Yamasaki, Y., Nagake, Y., Kasahara, J., Hashimoto, M., Nakanishi, N., Makino, H. (2001). Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney Int.*, 59: 1943–50.
- Schainuck, L.I., Striker, G.E., Cutler, R.E., Benditt, E.P. (1970). Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Hum. Pathol.*, 1: 631–41.

- Schiffli, H., Lang, S.M., Stratakis, D., Fischer, R. (2001). Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol. Dial. Transplant*, 16: 1863–69.
- Schiffli, H. (2007). Prospective randomized cross-over long-term comparison of online haemodiafiltration and ultrapure high-flux haemodialysis. *Eur. J. Med. Res.*, 12: 26–33.
- Schinzel, R., Münch, G., Heidland, A., Sebekova, K. (2001). Advanced Glycation End Products in End-Stage Renal Disease and Their Removal. *Nephron*, 87: 295–303.
- Schneider, L., Cammer, M., Lehman, J., Nielsen, S.K., Guerra, C.F., Veland, I.R., Stock, C., Hoffmann, E.K., Yoder, B.K., Schwab, A., Satir, P., Christensen, S.T (2010). Directional cell migration and chemotaxis in wound healing response to PDGF-AA are coordinated by the primary cilium in fibroblasts. *Cell. Physiol. Biochem.*, 25: 279–92.
- 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. N. Y. Acad. Sci.*, 1043: 685–95.
- Schupp, N., Stopper, H. i Rutkowski, P. (2006). Effect of different hemodialysis regimens on genomic damage in end-stage renal failure. *Semin. Nephrol.*, 26: 28–32.
- Schupp, N., Dette, E.M., Schmid, U., Bahner, U., Winkler, M., Heidland, A., Stopper, H. (2008). Benfotiamine reduces genomic damage in peripheral lymphocytes of hemodialysis patients. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 378: 283–91.
- Schupp, N., Heidland, A., Stopper, H. (2010). Genomic damage in endstage renal disease- contribution of uremic toxins. *Toxins.*, 2: 2340–58.
- SEN, Sociedad Española de Nefrología. (1999). Tratamiento sustitutivo de la insuficiencia renal crónica. *Normas de Actuación Clínica en Nefrología*. <http://www.senefro.org/modules.php?name=webstructure&idsectionXX=2&id webstructure=140>.
- Shafi, T., Coresh, J. (2010). Chronic kidney disease: definition, epidemiology, cost, and outcomes, editat per Jonathan Himmelfarb i Mohamed H Sayegh. *Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney*. 3ª ed., 3–21. Elsevier Inc.
- Shah, N.R. i Mahmoudi, M. (2015). The role of DNA damage and repair in atherosclerosis: A review. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 86: 147–57.

- Sharaf, H., Matou-Nasri, S., Wang, Q., Rabhan, Z., Al-Eidi, H., Al Abdulrahman, A., Ahmed, N. (2015). Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Biochim. Biophys. Acta*, 1852: 429–41.
- Shi, L., Chen, H., Yu, X., Wu, X. (2013). Advanced glycation end products delay corneal epithelial wound healing through reactive oxygen species generation. *Mol. Cell. Biochem.*, 383: 253–59.
- Simonson, M.S. (2007). Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, 71: 846–54.
- Singh, L., Singh, G., Sharma, A., Sinha, A., Bagga, A., Dinda, A.K. (2015). A comparative study on renal biopsy before and after long-term calcineurin inhibitors therapy: an insight for pathogenesis of its toxicity. *Hum. Pathol.*, 46: 34–39.
- Sitaraman, S., Babu, K.T., Badarinath, A., Pazhanimuthu, A., Saraswathy, R. (2014). Assessment of DNA damage using cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes of dilated cardiomyopathy patients. *Genet. Res.*, 96: e001.
- Sliman, S.M., Eubank, T.D., Kotha, S.R., Kuppusamy, M.L., Sherwani, S.I., Butler, E.S.O., Kuppusamy, P., Roy, S., Marsh, C.B., Stern, D.M., Parinandi, N.L. (2010). Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. *Mol. Cell. Biochem.*, 333: 9–26.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., LLeonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.*, 12: 376–90.
- Speit, G. i Hartmann, A. (2006). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.*, 314: 275–86.
- 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: 1408–13.
- Stadtman, E.R. i Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 899: 191–208.
- Stengel, B. (2010). Chronic kidney disease and cancer: a troubling connection. *JN J. Nephrol.*, 23: 253–62.

- Stopper, H., Meysen, T., Böckenförde, A. (1999). Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, 34: 433–37.
- Stopper, H., Boullay, F., Heidland, A. (2001). Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 38: 296–301.
- Stopper, H., Schinzel, R., Sebekova, K., Heidland, A. (2003). Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. *Cancer Lett.*, 190: 151–56.
- Stopper, H., Treutlein, A., Bahner, U. (2008). Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 23: 3272–79.
- Stoyanova, E., Sandoval, S.B., Zúñiga, L.A., El-Yamani, N., Coll, E., Pastor, S., Reyes, J., Andrés, E., Ballarin, J., Xamena, N., Marcos, R. (2010). Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 25: 879–85.
- Stoyanova, E., Pastor, S., Coll, E., Azqueta, A., Collins, A.R. and Marcos, R. (2014). Base excision repair capacity in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis treatment. *Cell Biochem. Funct.*, 32: 177–82.
- Taniguchi, H., Horinaka, M., Yoshida, T., Yano, K., Goda, A.E., Yasuda, S., Wakada, M., Sakai, T. (2012). Targeting the glyoxalase pathway enhances TRAIL efficacy in cancer cells by downregulating the expression of antiapoptotic molecules. *Mol. Cancer Ther.*, 11: 2294–2300.
- Tarng, D., Huang, T., Liu, T., Chen, H. (2000). Effect of vitamin E-bonded membrane on the 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients. *Kidney Int.*, 58: 790–99.
- Tarng, D., Tsai, T., Chen, W. (2001). Effect of Human OGG1 1245C→G Gene Polymorphism on 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Levels of Leukocyte DNA among Patients Undergoing Chronic Hemodialysis, 2338–47.
- The ARIC investigators. (1989). The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: design and objectives. The ARIC investigators. *Am. J. Epidemiol.*, 129: 687–702.
- Thornalley, P.J., Langborg, A. and Minhas, H.S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, 344: 109–16.

- Trabulus, S., Guven, G.S., Altiparmak, M.R., Batar, B., Tun, O., Yalin, A.S., Tunckale, A., Guven, M. (2012). DNA repair XRCC1 Arg399Gln polymorphism is associated with the risk of development of end-stage renal disease. *Mol. Biol. Rep.*, 39: 6995–7001.
- Tyedmers, J., Mogk, A. i Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11: 777–88.
- Vajdic, C.M., McDonald, S.P., McCredie, M.R.E., van Leeuwen, M.T., Stewart, J.H., Law, M., Chapman, J.R., Webster, A.C., Kaldor, J.M., Grulich, A.E. (2006). Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA*, 296: 2823–31.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 27: 120–39.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160: 1–40.
- Vamvakas, S., Bahner, U., Becker, P., Steinle, A., Götz, R., Heidland, A. (1996). Impairment of DNA repair in the course of long-term hemodialysis and under cyclosporine immunosuppression after renal transplantation. *Transplant. Proc.*, 28: 3468–73.
- Vamvakas, S., Bahner, U., Heidland, A. (1998). Cancer in End-Stage Renal Disease: Potential Factors Involved. *Am. J. Nephrol.*, 18: 89–95.
- Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A. (2003). Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, 143-144 : 341–51.
- Vanholder, R., Smet, R. De, Glorieux, G., De Smet, R., Glorieux, G., Argilés, A., Baurmeister, U., Brunet, P., Clark, W., Cohen, G., De Deyn, PP., Deppisch, R., Descamps-Latscha, B., Henle, T., Jörres, A., Lemke, HD., Massy, ZA., Passlick-Deetjen, J., Rodriguez, M., Stegmayr, B., Stenvinkel, P., Tetta, C., Wanner, C., Zidek, W. (2003). Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.*, 63: 1934–43.
- Vanholder, R., Van Laecke, S., Glorieux, G. (2008). What is new in uremic toxicity? *Pediatr. Nephrol.*, 23: 1211–21.
- Vanholder, R., Glorieux, G. i Eloit, S. (2015). Once upon a time in dialysis: the last days of Kt/V? *Kidney Int.*, 88: 460–65.

- Vaziri, N.D., Dicus, M., Ho, N.D., Boroujerdi-Rad, L., Sindhu, R.K. (2003). Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.*, 63: 179–85.
- Veland, I.R., Lindbaek, L., Christensen, S.T. (2014). Linking the Primary Cilium to Cell Migration in Tissue Repair and Brain Development. *Bioscience*, 64. Oxford University Press: 1115–25.
- Vergheze, E., Weidenfeld, R., Bertram, J.F., Ricardo, S.D., Deane, J.A. (2008). Renal cilia display length alterations following tubular injury and are present early in epithelial repair. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 23: 834–41.
- Vilar, E., Fry, A.C., Wellsted, D., Tattersall, J.E., Greenwood, R.N., Farrington, K. (2009). Long-term outcomes in online hemodiafiltration and high-flux hemodialysis: a comparative analysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 4: 1944–53.
- Villa, G., Rodríguez-Carmona, A., Fernández-Ortiz, L., Cuervo, J., Rebollo, P., Otero, A. Arrieta, J. (2011). Cost analysis of the Spanish renal replacement therapy programme. *Nephrol. Dial. Transplant*, 26: 3709–14.
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.*, 47 Suppl 1: 3–27.
- Vongwiwatana, A., Tasanarong, A., Rayner, D.C., Melk, A., Halloran, P.F. (2005). Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am. J. Transplant*, 5: 1367–74.
- Waters, A.M. i Beales, P.L. (2011). Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr. Nephrol.*, 26: 1039–56.
- Weiner, D.E. (2007). Causes and consequences of chronic kidney disease: implications for managed health care. *J. Manag. Care Pharm. JMCP*, 13: S1–9.
- Wells-Knecht, K.J., Zyzak, D. V, Litchfield, J.E., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1995). Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, 34: 3702–9.
- Willis, B.C., Borok, Z. (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 293: L525–34.
- Workman, P. (2004). Inhibiting the phosphoinositide 3-kinase pathway for cancer treatment. *Biochem. Soc. Trans.*, 32: 393–96.

- Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.*, 117: 524–29.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.*, 214: 199–210.
- Yang, C.-C., Hsu, S.-M.S.-P., Wu, M.-S., Chien, C.-T. (2006). Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-induced oxidative stress. *Kidney Int.*, 69: 706–14.
- Yang, J., Liu, Y. (2001). Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 159: 1465–75.
- Yang, K., Qiang, D., Delaney, S., Mehta, R., Bruce, W.R., O'Brien, P.J. (2011). Differences in glyoxal and methylglyoxal metabolism determine cellular susceptibility to protein carbonylation and cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.*, 191: 322–29.
- Yeun, J.Y. i Depner, T.A. (2010). Principles of hemodialysis. Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : companion to Brenner & Rector's the kidney. 3^a ed., 277–302. Elsevier Inc.
- Yoder, B.K., Hou, X., Guay-Woodford, L.M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13: 2508–16.
- Yoon, J.-H., Kim, J.-Y., Park, J.-K., Ko, S.-B. (2015). Oxidative damage markers are significantly associated with the carotid artery intima-media thickness after controlling for conventional risk factors of atherosclerosis in men. *PLoS One*, 10: e0119731.
- Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., Kalluri, R. (2003). BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.*, 9: 964–68.
- Zeisberg, M. i Neilson, E.G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.*, 119: 1429–37.
- Zeisberg, M. i Neilson, E.G. (2010). Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21: 1819–34.
- Zevin, D., Malachi, T., Gafter, U. (1990). Impaired DNA repair in patients with end-stage renal disease and its improvement with hemodialysis. *Miner. Electrolyte Metab.*, 17: 303–6.
- Zhang, Q.-L. i Rothenbacher, D. (2008). Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health*, 8:117-124

Zhou, W., Otto, E.A., Cluckey, A., Airik, R., Hurd, T.W., Chaki, M., Diaz, K., Lach, F.P., Bennett, G.R., Gee, H.Y., Ghosh, A.K., Natarajan, S., Thongthip, S., Veturi, U., Allen, S.J., Janssen, S., Ramaswami, G., Dixon, J., Burkhalter, F., Spöndlin, M., Moch, H., Mihatsch, M.J., Verine, J., Reade, R., Soliman, H., Godin, M., Kiss, D., Monga, G., Mazzucco, G., Amann, K., Artunc, F., Newland, R.C., Wiech, T., Zschiedrich, S., Huber, T.B., Friedl, A., Slaats, G.G., Joles, J.A., Goldschmeding, R., Washburn, J., Giles, R.H., Levy, S., Smogorzewska, A., Hildebrandt, F. (2012). FAN1 mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair. *Nat. Genet.*, 44: 910–15.

7.ANNEXOS

7. ANNEXOS

7.1 ANNEX 1. ARTICLE 4

Does the use of vitamin E-coated dialysis membranes reduce the levels of genetic damage in hemodialysis patients?

Lara Rodríguez-Ribera¹, Zuray Corredor¹, Irene Silva², Juan Manuel Diaz², José Ballarin², Ricard Marcos^{1,3}, Susana Pastor^{1,3}, Elisabet Coll^{2,*}

¹*Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain.*

²*Fundació Puigvert, Barcelona, Spain*

³*CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Madrid, Spain*

* Corresponding author.

E-mail address: ecoll@terra.com (E. Coll)

ABSTRACT

Background: End-stage renal failure patients present an oxidative stress status that can affect their genetic material. Although some of this oxidative stress is related to the pathology itself, those patients submitted to hemodialysis (HD) exhibit an extra input of oxidative stress resulting from the bioincompatibility reactions induced by contact with the different dialysis materials (membranes, plastic lines and dialysis fluids). To minimize such effects different proposals have been set up including the use of polysulfone (PS) membranes coated with vitamin E (PSE).

Methods: We have evaluated in a set of 29 patients potential variations in the levels of genetic damage when move from conventional HD to the use of PSE membranes. The level of genetic damage was measured using the micronucleus (MN) and the comet assay at two sampling time, before and after 6 months using PSE membranes.

Results: When we used the comet assay complemented with formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) enzyme a significant decrease in the levels of oxidative damage was detected after the use of PSE membranes (35.64 ± 2.548 *versus* 22.05 ± 2.846). Nevertheless, no effects were detected neither in the levels of direct DNA breaks by the comet assay (8.65 ± 0.735 *versus* 9.49 ± 0.473), nor by the MN assay when PSE membranes were used (8.69 ± 1.38 *versus* 10.66 ± 1.66).

Conclusions: In spite of the ability of PSE membranes to reduce oxidized bases on DNA, we were unable to demonstrate significant changes in the antioxidant status of the patients as measured using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay.

Keywords: Hemodialysis; Vitamin E-coated membranes; Micronucleus assay; Comet assay; Oxidative damage.

(En via de publicació)

Article disponible a la vesió de la tesi impresa

7.2 ANNEX 2. ARTICLE 5

Reactive carbonyl compounds impair wound healing by vimentin collapse and loss of the primary cillium

Lara Rodríguez-Ribera¹, Craig Slattery², Tara Mc Morrow², Ricard Marcos^{1,3,*}, Susana Pastor^{1,3,*}

¹*Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain.*

²*UCD School of Biomolecular and Biomedical Science, UCD Conway Institute, University College Dublin, Dublin, Ireland.*

³*CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Madrid, Spain*

* Corresponding authors. Tel.: +34 93 5812052; fax: +34 93 5812387.

E-mail address: ricard.marcos@uab.es (R. Marcos)

susana.pastor@uab.es (S. Pastor)

ABSTRACT

Background: Tubulo-interstitial fibrosis has an important role in renal function loss and it is the common end of most nephropathies. This pathology results from an aberrant wound-healing ability where the normal epithelial tissue is substituted for scar tissue caused by accumulation of extracellular matrix proteins (ECM). During the wound-healing process, epithelial cells undergo epithelial-mesenchymal transition (EMT) acquiring a mesenchymal-like phenotype that allows cells to migrate and re-epithelialize the wound site. It has been reported that chronic inflammation and uremic milieu are involved in wound-healing and enhanced kidney damage in chronic kidney disease (CKD) patients. In this study we evaluated reactive carbonyl compounds (RCC) effects on renal wound healing.

Methods: The compounds resulting from carbonyl stress evaluated in this study were Glyoxal (GO), methylglyoxal (MGO), malonyldialdehyde (MDA) and 4-hydroxy-hexenal (HHE). Wound repair ability was evaluated by the wound healing assay using HK-2 cells. EMT was evaluated by morphological, protein and transcriptomic changes using microscopy, western blot, zymography and RT-qPCR. Changes in the vimentin network and primary cilia were assessed by immunofluorescence.

Results: Our data demonstrated that MDA and GO delay wound closure mediated by vimentin disruption, which caused collagen I mRNA decrease, and deciliation. In contrast, HHE treatment (and MGO in minor degree) induced morphological changes, mesenchymal markers expression and increased gelatinase activity in HK-2 cells.

Conclusion: In this study, we have demonstrated for the first time that exposure to RCC differentially affects wound healing in proximal tubular epithelia. Our study shows that MDA and GO delay wound closure mediated by vimentin disruption and deciliation. HHE treated cells, in contrast, exhibited EMT-like phenotype but we hypothesize that minor vimentin disruption observed prevent migration enhancement. A better comprehension of effects of uremic toxins on wound healing and fibrosis and migration is necessary to seek mechanisms to slow down renal fibrosis.

(En via de publicació)

Article disponible a la versió de la tesi impresa

