



## Análisis del estrés oxidativo en pacientes en hemodiafiltración en línea

E. Torregrosa, J. Hernández Jaras, J. Sastre, R. Pons, H. García Calvo, C. Calvo Gordo, M.<sup>a</sup> A. Fenollosa, A. Rius, J. J. Sánchez-Canel, M. Pin, E. Tamarit e I. Rico

Servicio de Nefrología. Hospital General de Castellón. Departamento de Fisiología. Universidad de Valencia.

### RESUMEN

Los pacientes afectados de enfermedad renal crónica presentan una elevada morbimortalidad debido a enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la elevada presencia de estas enfermedades no puede explicarse únicamente por los factores de riesgo tradicionales. En la actualidad, se considera la existencia de factores de riesgo emergentes, entre los que se encuentra el estrés oxidativo. Además se sabe que cuando reciben tratamiento con hemodiálisis, se ven sometidos a un estrés oxidativo adicional. El objetivo de este trabajo ha sido analizar y comparar el grado de estrés oxidativo en dos grupos de pacientes urémicos dializados con diferentes técnicas dialíticas: a. Hemodiafiltración on-line 3 veces/semana (HDFOL). b. Hemodiafiltración on-line diaria 6 veces/semana (HDFOLD). Se estudiaron 9 pacientes afectados de enfermedad renal crónica terminal (Estadio 5), todos ellos varones con una edad media de  $72,5 \pm 6$  años. Cinco pacientes pertenecían al grupo de HDFOLD y cuatro al grupo de HDFOL tres veces por semana. Los pacientes del grupo de HDF-OLD presentaban las siguientes concentraciones de glutatión reducido (GSH) en sangre, pre-diálisis de  $742 \pm 153$  nmol/ml y post-diálisis de  $878 \pm 223$ , sin detectarse diferencias significativas entre ambos. Las concentraciones pre y post-diálisis de glutatión oxidado (GSSG) en sangre eran de  $34 \pm 14$  nmol/ml y  $137 \pm 74$  nmol/ml respectivamente ( $p < 0,03$ ). Los cocientes GSSG/GSH obtenidos fueron: pre-diálisis de  $58 \pm 10$  y post-diálisis  $169 \pm 65$ , con diferencias entre ambos valores ( $p < 0,03$ ). Los pacientes del grupo HDF-OL 3 veces/semana también presentaron un incremento significativo de la concentración de GSSG y del ratio GSSG/GSH tras la sesión de diálisis, de  $99 \pm 45$  nmol/ml a  $179 \pm 66$  nmol/ml y de  $161 \pm 99$  y a  $337 \pm 143$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ). La mediana de los valores de proteína C reactiva eran de 4,12 g/l en el grupo HDFOLD y 7,7 g/l en grupo de HDFOL ( $p < 0,05$ ). No encontramos diferencias estadísticas en la actividad de la xantina oxidasa entre grupos ni tras la sesión de hemodiálisis. **En resumen**, podemos concluir que los pacientes afectados de enfermedad renal crónica terminal que reciben tratamiento sustitutivo se encuentran sometidos a un estrés oxidativo adicional, como muestra el incremento en los ratios GSSG/GSH en ambos grupos. Sin embargo los pacientes en el grupo HDFOLD presentan cocientes GSSG/GSH post-hemodiálisis y valores de PCR inferiores, lo que sugiere que la hemodiálisis diaria podría mejorar la depuración de mediadores inflamatorios.

Palabras clave: **Hemodiafiltración on-line. Estrés oxidativo. Glutatión. Cociente GSSG/GSH. Xantine oxidasa.**

## STRESS OXIDATIVE ANALYSIS IN PATIENTS ON HEMODIAFILTRATION ON LINE

## SUMMARY

Patients with chronic renal disease have a very high mortality due to cardiovascular disease. However, the traditional risk factors are not the only one explanation. Nowadays, there are new risk factors becoming, and one of these is the oxidative stress. Besides today we know that when these patients receive haemodialysis are being exposed to an additional oxidative stress. The aim of this study was to measure and to compare the degree of oxidative stress in two groups of patients on different dialysis techniques: a) On-Line Haemodiafiltration three times / week (OL-HDF). b) Daily On-Line haemodiafiltration (six times/week) (dOL-HDF) We studied 9 patients with chronic renal disease stage 5 on hemodialysis. They all were men, with a medium age of  $72,5 \pm 6$  years. Five patients were on dOL-HDF and four on tOL-HDF. Glutathione (GSH) concentration of patients on dOL-HDF before dialysis was  $742 \pm 153$  nmol/ml and post-dialysis de  $878 \pm 223$ . Blood GSSG concentration before and after dialysis was  $34 \pm 14$  nmol/ml y  $137 \pm 74$  nmol/ml ( $p < 0,03$ ). GSSG/GSH ratio pre-dialysis was  $58 \pm 10$  and post-dialysis  $169 \pm 65$  ( $p < 0,03$ ). In OL-HDF group GSSG concentration and the ratio GSSG/GSH also increased in a significative way from  $99 \pm 45$  nmol/ml to  $179 \pm 66$  nmol/ml, and from  $161 \pm 99$  to  $337 \pm 143$  ( $p < 0,05$ ). We also found differences in pCR concentrations between both groups;  $3 \pm 1,4$  g/l in dOL-HDF and  $8,75 \pm 5,8$  g/l in HDF OL ( $p < 0,05$ ). We did not find differences between xantine-oxidase activity before and after hemodialysis and between groups. **In conclusion**, patient with terminal chronic renal disease on OL-HDF receive an additional load of oxidative stress, as the increase in GSSG/GSH ratio in both groups shows. However patients on dHDF-OL shows low ratios GSSG/GSH post-hemodialysis and low pCR concentrations, and maybe this could be explained because daily on line haemodiafiltration improves purification of inflammatory mediators. Clue words: Hemodialysis, oxidative stress, glutathione, gssg/gsh ratio, xantine oxidasa.

Key words: **On-line hemodiafiltration. Oxidative stress. Glutathione. GSSG/GSH ratio. Xantine oxidasa.**

## INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal crónica se asocia con los factores clásicos de riesgo cardiovascular, así como con factores derivados de la enfermedad en sí, como la expansión crónica de volumen, trastornos del metabolismo del calcio y fósforo, la hiperhomocisteinemia, y un estado inflamatorio permanente asociado con estrés oxidativo. Estos factores no clásicos están alcanzando una gran importancia, ya que podrían ser en parte los responsables de la alta incidencia de eventos cardiovasculares en estos enfermos.

Los pacientes con enfermedad renal crónica se caracterizan por presentar una alteración del equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y los factores anti-oxidantes<sup>1</sup>.

Las células están defendidas frente a la oxidación por una compleja serie de antioxidantes. El estrés oxidativo aparece cuando existe una alteración del equi-

librio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras<sup>2</sup>.

Las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos son las especies reactivas del oxígeno (ROS), entre las que destacan anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), el oxígeno singlete, y el ácido hipocloroso<sup>3</sup>.

El estrés oxidativo se considera un factor etiológico importante en muchos procesos patológicos del ser humano. Se ha relacionado con la carcinogénesis, la arteriosclerosis, la hipertensión arterial, las enfermedades neurodegenerativas, la insuficiencia renal, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y las complicaciones a largo plazo de la diabetes.

Actualmente existen parámetros fiables y técnicas adecuadas para cuantificar el estrés oxidativo. Entre los más utilizados se encuentran<sup>5</sup>: Glutathión reducido (GSH), Glutathión oxidado (GSSG), niveles de malon-

**Tabla I.** GSH, GSSG, GSSG/GSH y actividad de la xantina oxidasa pre y post-diálisis en HDFOLD y HDFOL tres veces/semana

	GSH (nmol/ml)	GSSG (nmol/ml)	GSSG/GSH	Xantina oxidasa (mU/ml)
<b>HDFOLD</b>				
Prediálisis	741,5 ± 153,47	34 ± 14	58 ± 10	0,36 ± 0,1
Post-dialisis	878 ± 227	138 ± 74*	169 ± 65**	0,33 ± 0,7
<b>HDFOL</b>				
Prediálisis	723 ± 344	99 ± 45	161 ± 99	0,52 ± 0,24
Post-dialisis	564 ± 233	179 ± 66*	337 ± 143**	0,34 ± 0,05

GSH: Glutación reducido. GSSG: Glutación oxidado. HDFOLD: Hemodiafiltración on-line diaria. HDFOL: Hemodiafiltración on-line 3 veces/semana. \*p < 0,05 vs pre-diálisis. \*\*p < 0,05 vs pre-diálisis.

dialdehído (MDA), la 8-OH-desoxi-guanosina, la xantina oxidasa (X.O)<sup>4-6</sup>.

En los pacientes afectados de enfermedad renal crónica terminal, se sabe que cuando reciben tratamiento con hemodiálisis, se ven sometidos a un estrés oxidativo adicional. En este sentido, cada vez existen más datos que implican a los ROS en el desarrollo de las complicaciones de la hemodiálisis a largo plazo como la amiloidosis, la aterosclerosis, y en general las enfermedades cardiovasculares<sup>7</sup>.

Como posibles inductores de estrés oxidativo en los pacientes en hemodiálisis se han señalado la edad, el tiempo transcurrido en diálisis, la diabetes mellitus, la inflamación, la hemoincompatibilidad de las membranas de diálisis, la pérdida difusiva de sustancias antioxidantes como vitaminas (ácido ascórbico, tocoferoles), el uso de tratamientos complementarios como hierro intravenoso<sup>8-10</sup>.

Se han propuesto diversas estrategias para minimizar el estrés oxidativo durante la diálisis y tratar de prevenir los efectos derivados de él. Por ejemplo, el uso de membranas biocompatibles y líquidos de diálisis ultrapuros. El empleo de membranas que consiguieran eliminar o adsorber del plasma los mediado-

res de la inflamación, la hemolipodiálisis, una nueva técnica que usa líquido de diálisis que contiene vit C, y liposomas con vitamina E, así como variar la frecuencia de sesiones de diálisis semanales<sup>11-14</sup>.

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo ha sido analizar y comparar el grado de estrés oxidativo en dos grupos de pacientes urémicos dializados con hemodiafiltración en línea, con diferencia frecuencia:

- Hemodiafiltración on-line 3 veces/semana (HDFOL).
- Hemodiafiltración on-line diaria 6 veces/semana (HDFOLD).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 9 pacientes que cumplían los siguientes criterios:

- Estar en tratamiento sustitutivo al menos durante seis meses.
- Edad comprendida entre 35-85 años.
- Sexo varón con objeto de evitar la variabilidad intersexo.
- Niveles de ferritina < 600 pg/ml y Hb > 10 g/dl.
- Diuresis residual inferior a 300 ml/min.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: Hipertiroidismo severo (PTH > 500), enfermedad inflamatoria o infecciosa sistémica en fase activa, enfermedad neoplásica no curada, tratamiento inmunosupresor.

La edad media de los pacientes fue de 72,5 ± 6 años. Cinco pacientes pertenecían al grupo de HDFOL diaria, y cuatro al grupo de HDFOLD tres veces por semana.

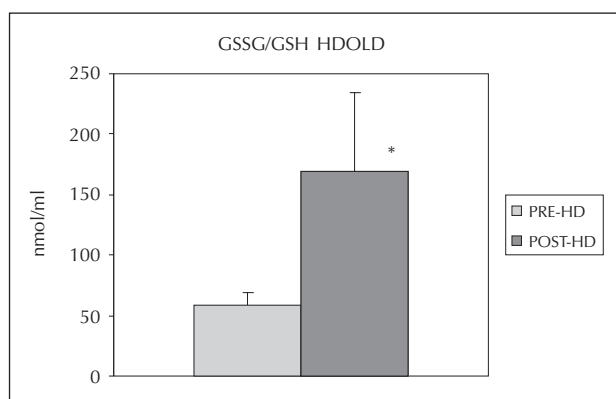


Fig. 1.—Cociente GSSG/GSH pre y post-hemodiálisis en el grupo de hemodiálisis diaria. \*p < 0,05 vs pre-HD.

**Tabla II.** Principales parámetros analíticos

	Hb	Urea	Creat	Alb	PTH	Ferritina	IST%
HDFOLD	13 ± 2	69,5 ± 1	6 ± 1	3,7 ± 0,2	269 ± 144	507 ± 572	36 ± 18
HDFOL	13,7 ± 1	92 ± 32	8 ± 2	3,7 ± 0,2	147 ± 119	572 ± 580	38 ± 14

HDFOLD: Hemodiafiltración On-line diaria. HDF OL: Hemodiafiltración «on-line» 3 veces/semana. Hb: Hemoglobina g/dl. Creat: Creatinina mg/dl. Alb: Albúmina g/dl. PTH: Parathormona pg/ml. IST: Índice de saturación de transferrina %.

Los pacientes en el grupo de HDFOLD se dializaban 6 veces/semana, un promedio de  $143 \pm 9$  minutos por sesión, con un volumen de convección y subsiguiente reinfusión post-dilución de 15,4 litros/sesión. El tiempo de permanencia en programa de hemodiálisis era  $14 \pm 0,8$  años.

Los pacientes de HDFOL tres veces por semana se dializaban un promedio de  $262 \pm 15$  min por sesión, con un volumen de convección y subsiguiente reinfusión post-dilución de 22 litros/sesión, y el tiempo en hemodiálisis de  $9 \pm 5$  años.

Las etiologías de la enfermedad renal crónica en los diferentes pacientes fueron: Nefropatía vascular 5 casos, poliquistosis renal 2 casos y nefropatía diabética y desconocida en 1 caso.

La composición del líquido de diálisis era la siguiente: Sodio 140 meq/l, potasio 3 meq/l, calcio 3 meq/l, magnesio 1,5 meq/l, cloro 117 meq/l, bicarbonato 30 meq/l, ácido acético 2 meq/l. Los dializadores empleados eran de polisulfona de alta permeabilidad de 1,89 m<sup>2</sup> en los 5 pacientes de HDF OL diaria, de 2 m<sup>2</sup> en 3 pacientes de HDF OL tres veces por semana y de 1,89 m<sup>2</sup> en el restante.

Todos los pacientes recibían durante la diálisis una perfusión de hierro sacarosa y al final de la hemodiálisis se les administraba eritropoyetina vía intravenosa. Asimismo, todos los pacientes recibían de manera crónica suplementos vitamínicos post-diálisis tres veces por semana con vit B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, H, 200 mg de vitamina C y ácido fólico.

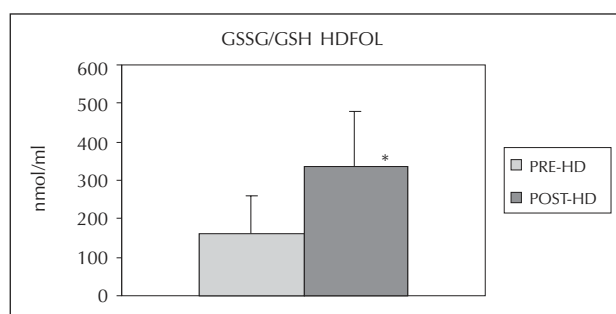


Fig. 2.—Cociente GSSG/GSH pre y post-hemodiálisis en el grupo de HDFOL 3 veces/semana. \* $p < 0,05$  vs pre-HD.

**Extracción de las Muestras:** Se extrajeron 20-25 ml de sangre de la rama arterial del paciente en tubos anticoagulados con EDTA (tapón morado), antes e inmediatamente después de la sesión de diálisis. Las muestras inmediatamente fueron desproteinizadas para la determinación de glutatión oxidado y reducido (ver métodos). Tras ser desproteinizadas, se procedía a ultracentrifugar las muestras a 15.000 g durante 15 minutos, y una vez centrifugadas los sobrenadantes se almacenaban en un congelador a  $-40^{\circ}$  C.

## MÉTODOS

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de glutatión oxidado, reducido, y la actividad de la xantina oxidasa.

Para determinar el glutatión reducido se empleó el método de la glutatión-S-transferasa de Brigelius, pero modificado<sup>15</sup>. Para la determinación de glutatión oxidado (GSSG) se utilizó el método de Asensi y cols.<sup>16</sup>. Con respecto a la actividad de la xantina oxidasa, para su determinación se empleó el Kit (A-22182) Amplex<sup>®</sup> rojo Xantina/ Xantina oxidasa.

Para comparar las dosis de diálisis empleamos la fórmula del «eKR» de Casino, o equivalente del aclaramiento renal de urea, que nos permite cuantificar el aclaramiento total de urea (renal y dialítico) en función del tiempo para cualquier tipo de diálisis, independientemente de la duración del mismo<sup>17</sup>.

Los pacientes fueron informados y firmaron un consentimiento informado para participar en el mismo.

## Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  desviación típica. Para la comparación de parámetros cuantitativos se ha empleado el análisis de la varianza (ANOVA) en primer lugar y la *t* de Student. La correlación entre variables numéricas se determinó por el método de Pearson. Se consideró significativo una  $p < 0,05$ .

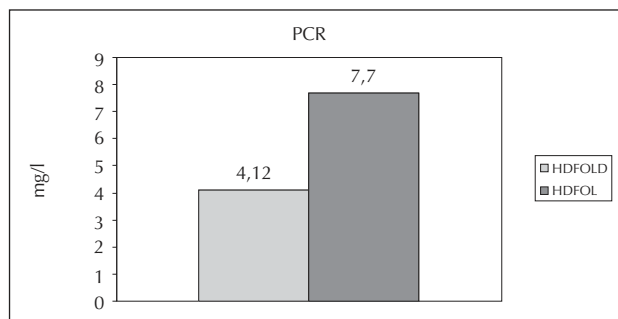


Fig. 3. — Mediana de concentración de proteína C reactiva en los grupos de HDF OL 3 veces/semana y HDFOL diaria.

## RESULTADOS

Los pacientes del grupo de HDF-OLD presentaban una concentración de glutatión reducido en sangre de  $742 \pm 153$  y de  $878 \pm 223$  nmol/ml pre y postdiálisis, respectivamente (ns).

Las concentraciones pre y post-diálisis de glutatión oxidado en sangre eran de  $34 \pm 14$  nmol/ml y  $137 \pm 74$  nmol/ml respectivamente, siendo las diferencias entre ambos significativas ( $p < 0,03$ ). Los cocientes GSSG/GSH obtenidos fueron de  $58 \pm 10$  nmol/ml y  $169 \pm 65$  nmol/ml pre y post-diálisis, respectivamente ( $p < 0,03$ ) (fig. 1).

Por su parte, los pacientes del grupo HDFOL 3 veces/semana presentaban pre-diálisis una concentración de GSH de  $723 \pm 344$  nmol/ml y tras la sesión de  $564 \pm 233$  nmol/ml (ns).

Con respecto al glutatión oxidado las concentraciones pre y post-diálisis fueron de  $99 \pm 45$  nmol/ml y  $179 \pm 66$  nmol/ml respectivamente ( $p < 0,05$ ). El cociente GGSG/GSH obtenido pre-diálisis fue de  $161 \pm 99$  y post-diálisis de  $337 \pm 143$  ( $p < 0,05$ ) (fig. 2).

No apreciamos diferencias significativas entre grupos con respecto a la concentración de GSSG pre y post-diálisis.

Se apreció una tendencia en el grupo de HDFOLD a mostrar cocientes GGSG/GSH inferiores post-diálisis ( $p = 0,05$ ).

Con respecto a la actividad de xantina oxidasa los valores pre-diálisis fueron de  $0,36 \pm 0,1$  mU/ml y  $0,52 \pm 0,24$  mU/ml en los grupos HDFOLD y HDFOL tres veces/semana, respectivamente. La actividad post-diálisis de la enzima fue de  $0,33 \pm 0,8$  mU/ml y  $0,34 \pm 0,05$  mU/ml, respectivamente (tabla I).

No se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los siguientes parámetros: hemoglobina (Hb), urea, creatinina, albúmina (alb), proteínas totales (Pt), PTH, ferritina, índice de saturación de transferrina (IST) y ácido úrico (tabla II).

Los pacientes del grupo de HDFOLD presentaban un eKR de  $28,1 \pm 2,3$  ml/min y los del grupo de HDFOL 3 veces/semana, de  $18,7 \pm 4,3$  ml/min ( $p < 0,05$ ).

El valor mediana de proteína C reactiva eran de  $4,12$  g/l en HDFOLD y de  $7,7$  g/l en grupo de HDFOL 3 veces/semana ( $p < 0,05$ ) (fig. 3).

Las dosis de hierro y EPO administradas fueron de  $10$  mg/sesión y  $2000$  UI semanales en el grupo HDFOLD, y de  $12,5$  mg/sesión y  $5.500$  UI/ semanales en el grupo de HDFOL. No existían diferencias significativas entre grupos con respecto al tratamiento con hierro, pero si en relación con las dosis de eritropoyetina administradas ( $p < 0,05$ ).

Las dosis de heparina (Nandroparina sódica) fueron de  $0,35 \pm 0,15$  ml/sesión en el grupo de diaria y  $0,5 \pm 0,1$  ml/sesión en el grupo de días alternos ( $p < 0,05$ ).

Se apreció una correlación significativa entre la concentración de proteína C reactiva y el cociente post-diálisis GSSG/GSH ( $r = 0,65$ ,  $p = 0,02$ ) (fig. 4).

## DISCUSIÓN

Los niveles de GSSG en sangre y el cociente GSSG/GSH son índices de estrés oxidativo en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas. Además el glutatión en sangre refleja el estado del glutatión en otros tejidos menos accesibles.

Los pacientes afectos de enfermedad renal crónica terminal presentan valores disminuidos de GSH en sangre. Esto ya ha sido demostrado en diversos trabajos previos, aunque en la mayoría de ellos la determinación de GSH se realizaba a nivel eritrocitario<sup>18-20</sup>. Por el contrario, la concentración de GSSG se encuentra elevada con respecto a la población normal.

En nuestros pacientes, no apreciamos diferencias significativas en las concentraciones de GSH tras la sesión de hemodiálisis en ninguno de los 2 grupos estudiados. En estudios previos existe controversia en relación con los cambios en la concentración de GSH tras la sesión de hemodiálisis<sup>21</sup>.

Con respecto al GSSG, se observó un incremento significativo de la concentración de glutatión oxidado tras la sesión de hemodiálisis. No apreciándose diferencias significativas entre grupos con respecto a la concentración de GSSG pre y post-diálisis.

Este incremento en la concentración de glutatión oxidado pone de manifiesto que la hemodiálisis provoca un incremento del estrés oxidativo, confirmando lo indicado en trabajos previos<sup>11,22,23</sup>.

De igual manera, cuando analizamos el cociente GSSG/GSH, uno de los indicadores más sensibles de estrés oxidativo, pudimos comprobar que tras la se-

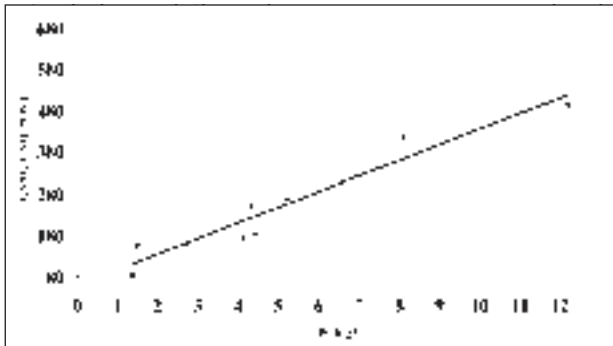


Fig. 4.— Correlación entre el cociente GSSG/GSH post-diálisis y la concentración de proteína C-Reactiva.

manera significativa con ambas técnicas de hemodiálisis<sup>18</sup>.

En el grupo de HDFOLD se apreciaba una tendencia a presentar cocientes GSSG/GSH más bajos, lo que sugeriría que el estrés oxidativo de los pacientes sometidos a esta técnica es inferior a la HDFOL. Los valores de PCR inferiores en los pacientes en HDFOLD avalan esta hipótesis.

Estos hallazgos podrían justificarse por el hecho de que estos pacientes presentan mejores dosis de diálisis, mejor depuración de moléculas de mediano peso molecular, y una menor sobrecarga crónica de volumen, factores todos ellos implicados en la respuesta inflamatoria crónica encontrada en estos pacientes.

Turi y cols., demostraron que la reducción en la capacidad antioxidante y en el contenido de GSH era el resultado de la acumulación de metabolitos de los glóbulos rojos y toxinas urémicas. Esta situación no mejoraba tras la hemodiálisis porque la mayoría de ellas no eran dializables<sup>24</sup>. Nuestros dos grupos de pacientes estaban sometidos a hemodiafiltración en línea, aunque los pacientes del grupo de 3 sesiones por semana recibían mayor número de litros de convección en comparación con los del grupo de diaria.

En trabajos previos se ha comprobado que el empleo de técnicas con alto volumen convectivo provoca la pérdida importante de vitaminas hidrosolubles, entre ellas la vitamina C, uno de los principales antioxidantes<sup>25</sup>.

Con respecto a la eritropoyetina, los pacientes del grupo de hemodiálisis diaria recibían menores dosis EPO (2.000 UI/semanales). Estos menores requerimientos de eritropoyetina podrían estar relacionados, como ya hemos comentado, con una mejor dosis de diálisis y también con una menor exposición al estrés oxidativo objetivada en este grupo.

En este sentido, Locatelli y cols., sugieren que el suplemento con antioxidantes en estos pacientes po-

dría mejorar la anemia y disminuir los requerimientos de EPO<sup>1</sup>.

El grupo de HDFOLD recibía una mayor dosis de diálisis (eKR) que el grupo de HDFOL ( $p = 0,0009$ ) y como se ha mencionado previamente, este factor podría explicar los menores requerimientos de eritropoyetina, cocientes GSSG/GSH más reducidos y a nivel inflamatorio, concentraciones de PCR menores. En relación con esto, se puede apreciar una correlación significativa entre los niveles de PCR y el cociente post-diálisis GSSG/GSH, es decir, a mayor concentración de PCR, mayores cocientes. En general podríamos decir que los pacientes del grupo HDFOLD presentaban un menor estado inflamatorio.

Obviamente, el escaso número de pacientes incluidos en el trabajo, el hecho de que los pacientes no fueran sus propios controles y la variabilidad de las dos muestras poblacionales son grandes limitaciones del mismo, pero pese a todo la tendencia mostrada en este pequeño grupo de HDFOLD es a presentar una mejoría en marcadores tan sensibles de estrés oxidativo como es el cociente GSSG/GSH. Este hecho junto con otros ya ampliamente demostrados, como el mejor control de la hipertensión arterial, de la anemia, de la osteodistrofia nos hace ver otra probable ventaja de la HDFOLD.

La actividad de la xantina oxidasa, enzima generadora de anión superóxido, se encuentra elevada en el plasma y en el hígado de pacientes con patologías asociadas a estrés oxidativo.

La inhibición de la xantina oxidasa ha demostrado ser eficaz para mejorar la disfunción endotelial en pacientes con hipercolesterolemia. Recientemente, Butler y cols., han demostrado que el alopurinol protege contra la disfunción endotelial en pacientes diabéticos con hipertensión arterial leve<sup>26</sup>. También se ha comprobado que los pacientes con sepsis presentan una activación de la xantina oxidasa que se relaciona con una elevada concentración de radicales libres<sup>27</sup>. No hemos encontrado diferencias significativas en los valores de xantina oxidasa tanto antes como después de la diálisis. Aunque al determinar la actividad pre y post-diálisis de esta enzima comprobamos en ambos grupos una tendencia hacia un descenso no significativo.

En resumen, podemos concluir que los pacientes afectados de enfermedad renal crónica terminal que reciben tratamiento sustitutivo se encuentran sometidos a un estrés oxidativo adicional. La hemodiafiltración en línea realizada de manera diaria mejora el estrés oxidativo. Sin embargo, aún hay mucho que trabajar con el fin de encontrar un técnica sustitutiva lo más fisiológica posible. Quizá la hemodiálisis diaria, como vemos en este trabajo, sea una posible opción de futuro.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido llevado a cabo en parte, por una beca de la Fundación de la Comunidad Valenciana «Hospital Provincial de Castellón» y con la colaboración del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Locatelli F, Canaud B, Kai-Uwe E, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C: Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1272-1280, 2003.
2. Sies H: «Biochemistry of oxidative stress». *Angewandte Chem* 25: 1058-1071.
3. Rodríguez Puyol D, Lucio J, Ruiz P, López Ongils, Iglesias MC: Radicales libres y daño glomerular. *Nefrología XVI (S3):* 29-34, 1996.
4. Pasaoglu H, Muhtaroglu S, Günes M, Utas C: The Change of Glutathione dependent Anti-oxidant mechanism in patients with chronic renal disease by hemodialysis. *Tr. J. Of Medical Sciences* 28: 75-78, 1998.
5. Viña J: Ed. (1990). Glutathione metabolism and physiological functions. CRC Press, Boca Raton.
6. Desco Mari-Carmen, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó F, Sastre J, Viña J: Xanthine Oxidase is involved in free radical production in Type 1 Diabetes. Protection by Allopurinol. *Diabetes* 51: April 2002.
7. Chung SN, Jain S, Agrawal N, Sharma A: Evaluation of oxidative stress before and after haemodialysis in chronic renal failure. *J. Assoc Physicians India* 48 (10): 981-4, 2000.
8. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M y cols.: Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 16: 335-340, 2001.
9. Canaud B, Cristol J, Morena M, Leray-Moragues H y cols.: Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif* 17 (2-3): 99-106, 1999.
10. Lim PS, Chan EC, Lu TC, Yu YL y cols.: Lipophilic antioxidants and iron status in ESRD patients on hemodialysis. *Nephron* 86: 428-435, 2000.
11. Wratten ML, Tetta C, Ursini F and Sevanina A: Oxidant stress in hemodialysis: Prevention and treatment strategies. *Kidney Int* 58 (S76): 126-132, 2000.
12. Buoncristiani U, Galli F, Rovidati S, Albertini M: Oxidative damage during hameodialysis using a vitamin E modified dialysis membrane: a preliminary characterization. *Nephron* 77: 57-61, 1997.
13. Mune M, Yukawa S, Kishino M, Otani H: Effect of vitamin E on lipid metabolism and atherosclerosis in ESRD patients. *Kidney Int (Supl. 71):* S 126-129, 1999.
14. Nemeth I, Turi S, Haszon I, And Bereczki C: Vitamin E alleviates the oxidative stress of erythropoietin in uremic children on hemodialysis. *Pediatr Nephrol* 14 (1): 13-7, 2000.
15. Brigelius R, Merckel C, Akerboom T, Sies H: Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 32: 2529-2534, 1983.
16. Asensi, M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrella JM, Viña J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical Biochemistry* 217: 323-328, 1994.
17. Casino F: The EKRc Graph: a Simple method to estimate the time-averaged urea clearance. *Seminars in Dialysis* 12(1): 11-14, 1999.
18. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen A, Thévenin M, Jaudon M, Zingraff J, Verger C, Jingers P, Descamps-Latscha B: Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radical Biology and Medicine* 21: 845-853, 1996.
19. Weinstein T, Chagnac A, Korzets A, Boaz M, Ori Y, Herman M, Ma T, Gafer U: Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defense mechanisms against oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant* 15 (6): 883-887, 2000.
20. Mohamed-Saïel S: Impairment of glutathione biosynthetic pathway in uraemia and diálisis. *Nephrol Dial Transplant* 20: 124-128, 2005.
21. González Rico M, Puchades MJ, García Ramón R, Sáez G, Tormos MC, Miguel A: Efecto del tratamiento con hemodiálisis sobre el estrés oxidativo en pacientes con insuficiencia renal crónica. *Nefrología* 26 (2): 218-225, 2006.
22. Ozden Meltzem, Maral Hale, Akaydin Derva: Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clinical Biochemistry* 35: 269-273, 2002.
23. Der-Cher Tarng, Tung-Po H, Yau-Huei W, Tsung-Yung L, Haw-Wen C, Tzen Wen C, and Wu-Chang Y: 8-Hydroxi-2'-Deoxyguanosine of Leukocyte DNA as a marker of Oxidative stress in Chronic Hemodialysis patients. *AMJKD* 36 (5): 934-944, 2000.
24. Turi S, Nemeth H, Vargha H, Matkovies B, Dobos E: Erythrocyte defense mechanism against free oxygen radicals in haemodilysed uraemic children. *Ped Neph* 5: 174-79, 1980.
25. Morena M, Cristol J-P, Bosc J-Y, Tetta C, Forret G, Leger C-L, Delcourt C, Papoz L, Descomps B, Canaud B: Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 17: 422-427, 2002.
26. Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD: Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetic with mild hypertension. *Hypertensión* 35: 746-751, 2000.
27. Galley HF, Davies MJ, Webster NR: Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit Care Med* 10: 1649-53, 1996.