



Programa de Doctorado en Medicina Clínica

**NUEVAS APROXIMACIONES AL ESTUDIO DE LA
BIOCOMPATIBILIDAD EN HEMODIÁLISIS:
Modulación fenotípica de las células mononucleares
circulantes.**

**Tesis Doctoral presentada por
PATRICIA MARTÍNEZ MIGUEL**

Directores:

DRA. SUSANA LÓPEZ ONGIL

DR. DIEGO RODRÍGUEZ PUYOL

Alcalá de Henares, 2015.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer constar mi agradecimiento a muchas personas, que de diferente forma, me han apoyado durante el proceso de realización de este laborioso trabajo, pues sin ellas no podría haberlo hecho.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores, la Dra. Susana López Ongil y el Dr. Diego Rodríguez Puyol.

Quiero agradecer a Susana su incondicional apoyo, ilusión, esfuerzo, constancia y generosidad desde el principio hasta el final. Su labor ha sido esencial en la elaboración del trabajo, y durante su desarrollo me ha permitido aprender de ella conocimientos en múltiples áreas novedosas para mí.

Quiero agradecer a Diego su esfuerzo, ilusión y seguimiento durante todo el proceso. Su brillantez, experiencia y conocimientos han sido fundamentales en la dirección y originalidad de este trabajo.

Al Dr. Manuel Rodríguez Puyol, por sus aportaciones e ideas, también basadas en su amplia experiencia, orientándonos con la finalidad de mejorar el resultado final.

Al resto de compañeros de la Fundación de Investigación:

A Diana, que ha participado en la realización de los experimentos, con su detallismo y orden.

Al Dr. Ignacio Arribas, con su ayuda en las consultas de estadística.

A Eva e Inma, que también me han ayudado siempre con gran amabilidad y cercanía.

También agradezco su apoyo a todos mis compañeros del Servicio de Nefrología, especialmente a la Dra. Mercedes Velo Plaza, por sus consejos, su ánimo, y su contribución al trabajo, ayudándome a incluir pacientes en el estudio. A la Dra. Hanane Bouarich, que ha sido mi referencia en muchos aspectos y a la que he consultado múltiples detalles a lo largo del trabajo. A la Dra. Patricia de Sequera Ortiz, que inició con nosotros este proyecto. Gracias también a Loreto, a Noelia, a Lola, a Paqui, y a todos los demás.

Gracias a las enfermeras, auxiliares y pacientes, ya que su colaboración ha sido necesaria para poder llevar a cabo la parte clínica de los estudios.

Agradezco también su apoyo a todos nuestros compañeros de La Universidad, con los que hemos colaborado en múltiples aspectos básicos del trabajo. Con sus ideas también se ha podido mejorar la exposición de los resultados, especialmente agradezco su apoyo a Maripi, Sergio, Laura, Gema y Marta.

Tengo que agradecer también el esfuerzo a todos los nefrólogos de otros hospitales que han colaborado en los diferentes estudios clínicos que han conformado esta tesis, y que son autores de los dos artículos publicados con los resultados de estos estudios.

Agradezco la contribución de Rosa Trueba en la elaboración de la bibliografía.

Finalmente, quiero expresar también mi agradecimiento a mi familia. A mis padres, que desde pequeña me inculcaron el interés por la cultura. A mi madre, que estuvo siempre

pendiente de mi formación. Su esfuerzo, constancia y generosidad, desde que me enseñó a leer hasta ahora, me han permitido seguir adelante con mi carrera profesional. A mi padre, que también ha contribuido con su apoyo y ayuda a que yo pueda sacar adelante este simbólico proyecto.

A Carlos, mi marido, por su apoyo y respeto a mi trabajo. Su ayuda en el cuidado de nuestra familia también ha sido imprescindible para que yo haya conseguido finalizar este estudio.

A mis hermanos, que también han vivido conmigo este proceso de elaboración de tesis.

Por último, quiero dirigir unas palabras a Natalia, para animarla e ilusionarla a aprender como está haciendo, pues el conocimiento nos enriquece y podemos emplearlo para ser mejores personas. El esfuerzo y la generosidad son valores que nos gustaría inculcarle. Lo mismo queremos enseñarle a Javier, que es un niño muy listo y cariñoso.

ABREVIATURAS

ADMA	Del inglés <i>Asymmetric Di-Methyl Arginine</i>
AGE	Productos finales de glicación avanzada, del inglés <i>Advanced Glycosilation End-products</i>
CD14	Receptor de lipopolisacáridos de origen bacteriano, del inglés <i>Cluster of Differentiation</i>
CD16	Receptor de la fracción Fc de la inmunoglobulina G, del inglés <i>Cluster of Differentiation</i>
ECE-1	Enzima conversora de la endotelina-1
ERC	Enfermedad renal crónica
ET-1	Endotelina-1
GH	Hormona del crecimiento, del inglés <i>Growth Hormone</i>
HTA	Hipertensión arterial
Hsp	Proteína de choque térmico, del inglés <i>Heat Shock Protein</i>
HuVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
IL	Interleuquina
NFkB	Factor nuclear kappa B, del inglés <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NO	Oxido nítrico, del inglés <i>Nitric Oxide</i>
NOS	Oxido nítrico sintetasa
PBS	Buffer salino fosfato
PCR	Proteína reactante de fase aguda o proteína C reactiva
PEW	Síndrome de desgaste proteico-energético, del inglés <i>Protein Energy Wasting</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
T ₃	Triyodotironina
T ₄	Tiroxina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés <i>Tumoral Necrosis Factor</i>
TTBS	Tris buffer salino con Tween 20
TWEAK	Citoquina de la familia del TNF inductora débil de apoptosis, del inglés <i>Tumor necrosis factor-like WEAK inducer of apoptosis</i> .

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. La inflamación en la enfermedad renal crónica.....	2
1.1. Definición de la inflamación.....	2
1.2. Cronificación de la respuesta inflamatoria en los pacientes con ERC.....	2
1.3. Inflamación y disfunción endotelial.....	3
1.4. Inflamación y disfunción endotelial. Mecanismos implicados.....	4
2. Causas de inflamación.....	7
2.1. Causas de inflamación en la ERC.....	7
2.1.1. Retención de moléculas pro-inflamatorias.....	6
2.1.2. Insuficiencia cardíaca crónica con sobrecarga de volumen.....	6
2.1.3. Procesos infecciosos intercurrentes.....	8
2.1.4. Obesidad.....	8
2.1.5. Factores genéticos.....	9
2.1.6. Factores inmunológicos.....	9
2.2. Causas de inflamación durante la hemodiálisis.....	9
2.2.1. Biocompatibilidad del sistema de hemodiálisis.....	10
2.2.2. Líquido de diálisis: importancia del líquido ultrapuro.....	10
2.2.3. Líquido de diálisis: efecto del acetato.....	12
2.2.4. Prótesis vasculares y catéteres.....	12
2.2.5. Biocompatibilidad de la membrana de diálisis.....	12
2.2.5.1. Capacidad trombogénica del dializador.....	14
2.2.5.2. Activación del complemento por el dializador.....	14
2.2.5.3. Activación celular por el dializador.....	15
2.2.5.4. Producción de ROS inducida por el dializador.....	15
2.2.5.5. Producción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por el dializador....	16
2.2.6. Importancia del transporte convectivo.....	16
3. Consecuencias de la inflamación en la ERC.....	17
3.1. Síndrome de desgaste proteico-energético.....	17

3.2. Anemia.....	18
3.3. Aterosclerosis.....	18
3.4. Alteración de funciones endocrinas.....	19
3.5. Aumento de mortalidad.....	20
4. Marcadores de inflamación.....	21
4.1. Proteína C reactiva (PCR).....	21
4.2. Citoquinas.....	22
4.2.1. Interleuquina 6 (IL-6).....	22
4.2.2. TWEAK.....	22
4.3. Activación monocitaria.....	24
4.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	26
4.4.1. ROS y hemodiálisis.....	28
4.5. Proteínas de shock térmico (Hsp).....	29
4.5.1. HSP y enfermedad vascular.....	32
4.5.2. HSP y enfermedad renal crónica.....	33
4.5.3. HSP y hemodiálisis.....	34
5. Marcadores de disfunción endotelial.....	35
5.1. Estructura y función del endotelio.....	35
5.2. Endotelina-1 (ET-1).....	36
5.3. Enzima convertora de endotelina-1 (ECE-1).....	37
5.4. Óxido nítrico (NO).....	38
5.5. Enzima óxido nítrico sintetasa (NOS).....	38

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Materiales.....	42
1.1. Reactivos.....	42
1.2. Membranas de diálisis.....	42
2. Diseño del estudio.....	44
2.1. Criterios de inclusión.....	44
2.2. Diseño por estudios.....	45
• Comparación del efecto de dos membranas sintéticas de alta permeabilidad, polietersulfona y polisulfona sobre la funcionalidad endotelial.....	45
• Comparación del efecto de la polinefrona con respecto a otros dializadores sobre la activación monocitaria.....	46
2.3. Recogida de muestras.....	48
3. Métodos.....	48
3.1. Cultivo de células.....	48
3.2. Aislamiento de monocitos y cocultivo con células endoteliales.....	48
3.3. Adhesión de monocitos a células endoteliales.....	49
3.4. Toxicidad celular.....	50
3.5. Expresión de proteínas por Western blot	50
3.6. Producción de ROS.....	50
3.7. Cuantificación del porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺.....	51
4. Análisis estadístico.....	51

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis.....	54
2. Objetivo general.....	54
3. Objetivos específicos.....	54
3.1. Comparar el efecto de dos membranas sintéticas de alta permeabilidad, la polietersulfona y la polisulfona estándar, sobre la funcionalidad endotelial	54
3.2. Comparar el efecto de una membrana de alta permeabilidad sintética, la polinefrona, respecto a otras membranas, como el triacetato de celulosa, la polisulfona y la poliamida, sobre la activación monocitaria	54

RESULTADOS

Objetivo 1.- Comparar el efecto de dos membranas sintéticas de alta permeabilidad, la polietersulfona, respecto a la membrana estándar polisulfona, sobre la funcionalidad endotelial.

1.1. Estudio piloto cuasi experimental (antes-después).....	56
1.1.1. Evaluación del efecto de una sesión de HD.....	57
1.1.2. Evaluación del efecto de 15 días de HD.....	58
1.2. Estudio prospectivo multicéntrico.....	60
1.2.1. Evaluación del efecto de una sesión de HD.....	62
1.2.2. Evaluación del efecto crónico de 3 meses de HD.....	63

Objetivo 2.- Comparación de los efectos de la polinefrona respecto a otros dializadores sobre la activación momocitaria.

2.1- Estudio piloto cuasi-experimental comparando polinefrona y triacetato de celulosa	66
2.1.1. Evaluación de efecto agudo de una sesión de HD.....	67
2.1.2. Evaluación del efecto crónico de 4 meses de HD.....	68
2.2. Estudio multicéntrico controlado y aleatorizado comparando polinefrona con helixona y poliamida.....	71
2.2.1. Evaluación del efecto agudo de una sesión de HD.....	72
2.2.2. Evaluación del efecto crónico de 4 meses de HD.....	74

RESUMEN DE RESULTADOS..... 82

DISCUSIÓN.....84

CONCLUSIONES.....103

BIBLIOGRAFÍA.....105

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. La inflamación en la enfermedad renal crónica:

1.1. Definición de la inflamación:

La inflamación es un proceso complejo, todavía no completamente conocido, que aparece en muchos contextos fisiopatológicos, incluyendo la enfermedad renal crónica (ERC).

Al final de la década de 1990 aparecían las primeras publicaciones que relacionaban la inflamación en la uremia con la enfermedad cardiovascular, la desnutrición proteica (Stenvinkel et al. 1999) y el mal pronóstico de estos pacientes (Zimmermann et al. 1999, Iseki et al. 1999, Noh et al. 1998, Bologna et al. 1998).

Existen diferentes definiciones de este proceso. Desde una perspectiva general, la inflamación podría definirse como una reacción local y precisa que el organismo presenta ante la invasión por parte de un agente infeccioso, antígeno, daño físico, químico o traumático, y que se debe regular con precisión, puesto que tanto las deficiencias como los excesos en una respuesta inflamatoria pueden causar morbilidad y mortalidad (Tracey 2002).

Durante esta última década se ha avanzado mucho en el conocimiento de los complejos mecanismos moleculares que provocan la situación de inflamación en la ERC. Básicamente, podríamos decir que dos aspectos contribuyen a iniciar este proceso: la retención de mediadores inflamatorios, perpetuada por la disminución del aclaramiento renal de los mismos, y la generación de nuevas moléculas pro-inflamatorias, condicionada por diferentes agentes causales que concurren en los pacientes con ERC.

El procedimiento más habitual para cuantificar la inflamación en la práctica clínica consiste en la medida de la concentración plasmática de la proteína reactante de fase aguda o proteína C reactiva (PCR). La mayoría de los estudios publicados muestran hallazgos consistentes sobre una estrecha correlación entre la PCR circulante y las citoquinas pro-inflamatorias, especialmente la IL-6, que depende de la estimulación de TNF- α y de la IL-1. Por lo tanto, la PCR refleja la respuesta hepática a los altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias presentes en el torrente sanguíneo. No obstante, las sucesivas investigaciones en este campo están propiciando la emergencia de nuevos marcadores de inflamación, entre ellos los monocitos activados CD14⁺CD16⁺, presentes en pacientes con procesos inflamatorios crónicos como la ERC (Ramirez, Martin-Malo & Aljama 2011).

1.2. Cronificación de la respuesta inflamatoria en los pacientes con ERC:

Desde la perspectiva de la inflamación, la ERC se caracteriza por ser un proceso inflamatorio crónico que condiciona que sus efectos nocivos permanezcan y finalmente

produzcan sus consecuencias, fundamentalmente un aumento de la morbimortalidad de origen cardiovascular.

En general, la respuesta inflamatoria se desencadena como consecuencia de un daño tisular, con el fin de generar una recuperación de la lesión. Una vez desaparecida dicha agresión, se inhibe la respuesta inflamatoria. Sin embargo, en los pacientes con ERC, con mucha frecuencia la respuesta inflamatoria se mantiene. La propia pérdida de función renal, por sí misma, parece condicionar desde estadios iniciales de la enfermedad, un estado permanente de inflamación, a través de la retención de moléculas pro-inflamatorias. En este sentido, hay estudios que muestran una elevación de marcadores de inflamación desde fases tempranas de la ERC (Oberger et al. 2004). Otros agentes causales relacionados con la hemodiálisis pueden provocar inflamación de un modo intermitente, perpetuando también la respuesta inflamatoria. La actividad de los monocitos tiene especial relevancia en el patrón inflamatorio observado en los pacientes con ERC (Carracedo et al. 1995, Carracedo et al. 1998, Martín-Malo et al. 2000). La inflamación crónica en estos pacientes tiene un perfil parecido a la respuesta inflamatoria descrita en el anciano, caracterizada por un aumento moderado de citoquinas pro-inflamatorias y la presencia de un subtipo de monocitos que expresan el receptor CD14 (receptor de lipopolisacáridos de origen bacteriano) y el receptor CD16 (receptor de la fracción Fc de la inmunoglobulina G) (Nockher, Scherberich 1998, Scherberich, Nockher 2000, Carracedo et al. 2002).

1.3. Inflamación y disfunción endotelial:

Los pacientes con ERC presentan una mayor tasa de morbimortalidad de causa cardiovascular que la población general desde estadios iniciales de la enfermedad, pudiendo multiplicarse esta tasa por 1000 en estadios avanzados de ERC (estadios 4-5) y en terapia renal sustitutiva (Schiffrin, Lipman & Mann 2007). Hay estudios que refieren un incremento de la muerte súbita de origen cardíaco en pacientes con cifras más elevadas de PCR, IL-6, y valores más bajos de albúmina (Parekh et al. 2008).

Esta elevada tasa de morbimortalidad no se puede explicar únicamente por los factores de riesgo cardiovascular clásicos (diabetes, hipertensión arterial, tabaquismo, hipercolesterolemia y edad); además de estos factores, los pacientes con ERC presentan otros factores de riesgo cardiovascular relacionados con su enfermedad, como son la uremia, la hiperhomocisteinemia, las alteraciones del metabolismo calcio-fósforo, la malnutrición y la inflamación crónica.

Entre estos factores, la inflamación está adquiriendo un papel relevante. Múltiples trabajos recientes en la literatura relacionan el estado de inflamación con la aparición de disfunción endotelial desde estadios iniciales de la ERC. Se sabe que la disfunción endotelial es el primer paso para el posterior desarrollo de aterosclerosis, aunque la forma en que se produce este daño

no está completamente aclarada. Tampoco se conoce con certeza el mecanismo por el que la inflamación crónica presente en los pacientes urémicos produce daño endotelial; se piensa que se trata de una alteración del sistema inmune, relacionada con la persistencia de la inflamación crónica (Stenvinkel 2003, Landray et al. 2004, Ramirez et al. 2007).

1.4. Inflamación y disfunción endotelial. Mecanismos implicados:

Entre los mecanismos propuestos para explicar la relación entre inflamación y daño endotelial, se han sugerido alteraciones relacionadas con el aumento del estrés oxidativo, con el aumento de expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, así como con la elevación en el porcentaje de monocitos activados en sangre periférica CD14⁺CD16⁺ (Ojeda, Aljama 2008).

El endotelio vascular regula el tono del vaso liberando sustancias vasoactivas como el óxido nítrico (NO). Los pacientes con ERC tienen un déficit de NO desde estadios iniciales de la enfermedad (Morena et al. 2005). Esto contribuye a la aparición de disfunción endotelial por alteración de la vasodilatación dependiente del endotelio, favoreciendo la aparición de aterosclerosis y posteriormente de eventos cardiovasculares. Una de las razones que se han propuesto en relación con el descenso de NO es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como es el anión superóxido liberado por los macrófagos reclutados en las zonas de inflamación. La liberación de ROS es la consecuencia de un desequilibrio entre los mecanismos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, a favor de los pro-inflamatorios. A pesar de que el endotelio posee mecanismos antioxidantes para defenderse, las células del endotelio pueden dañarse por las ROS. Si la producción de ROS es muy elevada o se perpetúa en el tiempo, los mecanismos de defensa de la célula endotelial pueden ser insuficientes y se produce el daño endotelial con la posterior aparición de aterosclerosis (Zhang, Gutterman 2007).

También puede producirse una disminución del NO plasmático en los pacientes urémicos por el aumento de la dimetil-arginina asimétrica (*asymmetric dimethyl-arginine* ó ADMA). ADMA es un inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintetasa endotelial. En los pacientes con ERC se ha observado un aumento de ADMA desde estadios iniciales de la ERC. Se cree que esto es debido a una disminución en el aclaramiento renal de este metabolito (Sydow, Munzel 2003).

Otra alteración de la funcionalidad endotelial que se ha podido constatar en estudios *in vitro*, es un aumento de la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión a célula vascular (*vascular cell adhesion molecule 1* ó VCAM-1) o la molécula de adhesión intracelular (*intracellular adhesion molecule 1* ó ICAM-1) en células endoteliales cultivadas en medio urémico. En estudios *in vivo* se ha corroborado el aumento de estas moléculas en

pacientes urémicos, coincidiendo con un aumento en la actividad inflamatoria, todo ello relacionado con un mayor número de eventos cardiovasculares (Stenvinkel et al. 2000, Papayianni et al. 2002).

Otro de los mecanismos que se han propuesto para explicar la relación entre inflamación y daño endotelial es la activación del sistema inmune en la ERC, concretamente el aumento de una subpoblación de monocitos activados en el suero de pacientes urémicos, los monocitos $CD14^+CD16^+$. Estas células se han visto aumentadas en sangre periférica de pacientes urémicos, incluso sin que haya datos clínicos de un proceso inflamatorio activo, y sin que en sangre periférica se determine un aumento de otros marcadores de inflamación, como la PCR o citoquinas pro-inflamatorias (Ramirez et al. 2006). En trabajos publicados recientemente se ha visto una relación directa entre esta subpoblación de monocitos y la aparición de eventos cardiovasculares (Ulrich et al. 2008). Los monocitos $CD14^+CD16^+$ son una subpoblación monocitaria que muestra unas características fenotípicas especiales, con un telómero más corto que los monocitos no activados $CD14^{++}CD16^-$. Los monocitos $CD14^+CD16^+$ muestran un aumento de citoquinas pro-inflamatorias en su citoplasma, que son liberadas al torrente sanguíneo tras ser estimuladas por una agresión exterior (Ramirez et al. 2006, Ulrich et al. 2008). El papel que esta subpoblación de monocitos juega en la producción de daño endotelial en los pacientes con ERC no está claro. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que, en un modelo experimental, se ponen en contacto estos monocitos activados con células endoteliales de vena umbilical humana (HuVEC) en cultivo, observándose el efecto que producen los monocitos sobre estas células. Para evaluar el daño endotelial en este estudio se determinó la actividad de ROS y la apoptosis en las HuVEC mediante citometría de flujo (Merino et al. 2008b). El incremento de la actividad de ROS en las células endoteliales se piensa que juega un papel muy importante en el daño endotelial asociado con la ERC, como se ha descrito previamente. En este trabajo midieron la actividad de ROS en tres cocultivos diferentes: HuVEC con monocitos totales ($CD14^{++}CD16^-$ junto con $CD14^+CD16^+$), HuVEC con monocitos no activados ($CD14^{++}CD16^-$) y HuVEC con monocitos activados ($CD14^+CD16^+$). Sólo las células HuVEC cocultivadas con los monocitos activados mostraron un aumento en la actividad de ROS. De igual modo se observó un aumento en la apoptosis de las HuVEC cocultivadas con monocitos activados, reforzando la idea de que el estrés oxidativo inducido por la microinflamación en la células endoteliales, juega un papel muy importante en la producción de daño endotelial en los pacientes con ERC (Merino et al. 2008a). Este trabajo soporta la hipótesis de que la microinflamación mediada por monocitos activados, $CD14^+CD16^+$, en los pacientes con ERC, induce daño endotelial y esto puede contribuir de forma significativa en el posterior desarrollo de aterosclerosis, y por tanto en la aparición de eventos cardiovasculares, principal causa de morbimortalidad en los pacientes con ERC. Estos datos también apoyan la teoría de la

aparición de disfunción endotelial en la uremia por aumento de apoptosis de las células endoteliales, así como por la presencia de una subpoblación de monocitos activados.

En último término, también hay trabajos realizados con proteómica, en los que se intenta conocer cuáles son las proteínas dañadas en las células endoteliales que van a favorecer el posterior desarrollo de disfunción endotelial. En uno de estos trabajos se cuantificó *in vitro* qué proteínas de las células HuVEC se dañaban cuando eran cultivadas en un medio urémico, comparándolas con las mismas proteínas de células HuVEC incubadas en un medio sin uremia, observándose un aumento de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y con la inflamación en las HuVEC expuestas al medio urémico (Carbo et al. 2008), estando ambos mecanismos implicados en la aparición de daño endotelial desde estadios iniciales de la ERC.

2. Causas de inflamación:

2.1. Causas de inflamación en la ERC:

El estado de inflamación en los pacientes con ERC tiene un origen multifactorial. A continuación se detallan las diferentes causas que se han sugerido como agentes causales de este estado, enunciándose en la Tabla 1.

Tabla 1. Causas de inflamación en la ERC
<ul style="list-style-type: none"> • Causas relacionadas con el paciente: <ol style="list-style-type: none"> 1. Retención de moléculas proinflamatorias 2. Insuficiencia cardíaca crónica con sobrecarga de volumen 3. Procesos infecciosos 4. Obesidad 5. Factores genéticos 6. Factores inmunológicos
<ul style="list-style-type: none"> • Causas relacionadas con la técnica de hemodiálisis: <ol style="list-style-type: none"> 1. Líquido de diálisis <ul style="list-style-type: none"> - Endotoxinas y otros productos bacterianos. - Acetato. 2. Prótesis vasculares y catéteres 3. Biocompatibilidad de la membrana de diálisis

2.1.1. Retención de moléculas pro-inflamatorias:

La propia reducción de la función renal se propone como una causa fundamental en la producción de una respuesta inflamatoria. La disminución del filtrado glomerular provoca la disminución en el aclaramiento de diferentes moléculas, que bien pueden provocar una respuesta inflamatoria, tales como las toxinas urémicas, o que son efectoras de la respuesta inflamatoria en sí mismas, tales como las citoquinas. Las toxinas urémicas provocan un estímulo inmunológico. Hay estudios que sugieren una asociación entre el aumento de determinados agentes tóxicos en la uremia, como los productos finales de la glicación avanzada, y la inflamación (Suliman et al. 2003). Estudios *in vitro* muestran que estos productos pueden desencadenar una respuesta inflamatoria a través de su receptor celular provocando una cascada de señales que activan al factor de transcripción NFkB (Schwedler et al. 2001).

El deterioro de la función renal se asocia también con un aumento en la concentración de citoquinas plasmáticas. Hay estudios que revelan una clara correlación entre los niveles sanguíneos de determinadas citoquinas y sus receptores solubles y el aclaramiento de creatinina (Pecoits-Filho, Lindholm & Stenvinkel 2003, Descamps-Latscha et al. 1995). Otros estudios muestran una disminución en la excreción urinaria de IL-6R en pacientes con ERC respecto a controles sanos (Memoli et al. 2000), y una disminución en el aclaramiento de TNF- α e IL-1 en ratas nefrectomizadas (Bemelmans, Gouma & Buurman 1993, Poole et al. 1990).

2.1.2. Insuficiencia cardíaca crónica con sobrecarga de volumen:

Una complicación frecuente en la ERC es la sobrehidratación, que puede contribuir directamente a mantener el estado de inflamación en estos pacientes.

Diferentes trabajos soportan la teoría de que la insuficiencia cardíaca crónica puede contribuir a perpetuar el estado de inflamación de los pacientes con ERC. Hay estudios que muestran una correlación positiva entre la hipertrofia del ventrículo izquierdo y marcadores de inflamación como la PCR en pacientes sometidos a hemodiálisis (Park et al. 2002). Podemos mencionar una publicación en la que los pacientes en diálisis, con historia de insuficiencia cardíaca, presentan cifras más elevadas de PCR (Wang et al. 2003). Otro estudio refiere una correlación positiva entre los niveles de PCR y la masa ventricular izquierda, con una correlación negativa entre la PCR y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. El mismo estudio revela en el análisis multivariable que el estado de inflamación crónica se considera un factor de riesgo independiente para el desarrollo de hipertrofia cardíaca y disfunción ventricular en los pacientes en hemodiálisis (Losito et al. 2003). Como posible mecanismo para desencadenar la respuesta inflamatoria en estos pacientes, se ha sugerido la translocación bacteriana o de endotoxinas, que podría aparecer en relación con el edema intestinal (Anker, Coats 1999). La pérdida de función renal residual también se ha relacionado con un

empeoramiento de los parámetros de inflamación. Wang y cols. observaron como la pérdida de función renal residual en pacientes con diálisis peritoneal se asociaba con una mayor sobrecarga de volumen y mayor inflamación. No obstante, no pudieron descartar que otros mecanismos, tales como la menor depuración de moléculas de mediano tamaño, estuvieran implicados en provocar el empeoramiento de los parámetros de inflamación (Wang et al. 2004b).

No está claro si el control de la situación de inflamación podría mejorar la morfología y funcionalidad cardíaca (Losito et al. 2003). En este sentido, podría considerarse también la insuficiencia cardíaca, no sólo una causa, sino una consecuencia del proceso inflamatorio.

2.1.3. Procesos infecciosos intercurrentes:

Diferentes estudios confirman que el desarrollo de un proceso infeccioso condiciona una respuesta inflamatoria. Esta respuesta se perpetúa si el proceso infeccioso se cronifica. En los pacientes con ERC, se ha relacionado la infección por determinados microorganismos, como *Chlamydia pneumoniae*, con la progresión de la aterosclerosis (Stenvinkel, Heimbürger & Jogestrand 2002, Zoccali et al. 2003, Kato et al. 2006, Kim et al. 2008). Otros estudios muestran una asociación entre la periodontitis crónica y la elevación de marcadores de inflamación en pacientes en programa de hemodiálisis (Chen et al. 2006, Buhlin et al. 2007). Incluso se ha llegado a demostrar una asociación estadísticamente significativa entre la periodontitis moderada o severa y la muerte de origen cardiovascular en pacientes en hemodiálisis (Kshirsagar et al. 2009), proponiéndose la hipótesis de que el tratamiento de la periodontitis podría reducir la muerte de origen cardiovascular en estos pacientes. En este sentido, un estudio mostró un descenso en los niveles de PCR y en la velocidad de sedimentación glomerular tras el tratamiento periodontal en pacientes en hemodiálisis (Kadiroglu et al. 2006).

2.1.4. Obesidad:

En la población general, la obesidad contribuye al aumento en la actividad inflamatoria. En los adipocitos se producen citoquinas pro-inflamatorias, tales como la IL-6 y el TNF- α . Además, se producen otro tipo de moléculas más específicas, que también tienen un efecto pro-inflamatorio, como la leptina y la visfatina. Los pacientes con ERC que necesitan terapia renal sustitutiva con hemodiálisis presentan menor prevalencia de obesidad que la población general, relacionándose, en este grupo de pacientes, un índice de masa corporal bajo con mayor mortalidad (Port et al. 2002), y el exceso de peso con una mayor supervivencia (Kalantar-Zadeh et al. 2006, Leavey et al. 2001). No obstante, hay estudios en los que se muestra, en la población en hemodiálisis, una asociación entre el depósito de grasa abdominal (Cordeiro et al. 2010) o troncular (Axelsson et al. 2004) y un incremento de inflamación a nivel sistémico.

2.1.5. Factores genéticos:

Varios estudios han mostrado que el patrón de inflamación en los pacientes urémicos no guarda únicamente relación con factores ambientales, sino que también puede haber una predisposición genética. Según el estudio de Zacho y cols., determinados polimorfismos del gen de la PCR se asocian con un aumento más marcado de esta proteína, no encontrándose asociación entre los distintos polimorfismos de la PCR y el riesgo cardiovascular (Zacho et al. 2008). Un pequeño estudio realizado por Zhang y cols. en pacientes en hemodiálisis mostró que diferentes haplotipos de la PCR predecían los niveles de la proteína, pero no predecían el riesgo cardiovascular (Zhang et al. 2007). Sin embargo, el estudio de Muntinghe y cols. sí mostró una diferencia sobre la mortalidad en 2 cohortes de pacientes en hemodiálisis con una variante diferente en el polimorfismo del receptor de citoquinas pro-inflamatorias CCR5. Según este estudio, los portadores del polimorfismo CCR5-Delta 32 tenían menos efectos adversos debidos a la inflamación y menor mortalidad, pudiendo considerarse el bloqueo de dicho receptor como una diana terapéutica en pacientes en diálisis (Muntinghe et al. 2009). Por otro lado, las variantes genéticas en otras citoquinas como el polimorfismo en TNF- α -308 y en IL-10-1082 se asociaron con un peor pronóstico en pacientes con ERC. Sin embargo, los resultados fueron dudosos en relación con las variantes genéticas o polimorfismos estudiados con la citoquina IL-6 (Stenvinkel et al. 2005a).

2.1.6. Factores inmunológicos:

El retorno a hemodiálisis tras el fracaso de un trasplante renal cada vez es más frecuente. Se ha considerado que podría ser beneficioso para el paciente mantener el injerto renal, incluso con dosis bajas de inmunosupresión, para obtener una mínima función renal residual. Sin embargo, al menos en algunos casos, el trasplante renal puede actuar como un potente activador del proceso inflamatorio. Hay ocasiones en que los pacientes se encuentran asintomáticos, evidenciándose únicamente una elevación en los marcadores de inflamación. La única forma de revertir esta situación es mediante la transplantectomía del injerto renal (Lopez-Gomez et al. 2004).

2.2. Causas de inflamación durante la hemodiálisis:

Hay una amplia evidencia de que diferentes aspectos relacionados con el procedimiento de la hemodiálisis pueden producir inflamación. Se han propuesto diferentes mecanismos para activar este proceso inflamatorio en pacientes en hemodiálisis: en primer lugar, la retención de moléculas pro-inflamatorias eliminadas habitualmente por el riñón; en segundo lugar, el aumento del stress oxidativo; y en último lugar, la estimulación de células presentadoras de antígeno, fundamentalmente los monocitos, de forma directa o a través de diferentes contaminantes.

2.2.1. Biocompatibilidad del sistema de hemodiálisis:

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material, dispositivo o sistema para llevar a cabo su función sin una respuesta significativa del huésped para una aplicación específica (Gurland et al. 1994).

La necesidad de la circulación extracorpórea de la sangre y el contacto de la misma con la membrana y el líquido de diálisis provocan una compleja respuesta humoral y celular por parte del organismo. La situación ideal sería que el material de conducción sanguínea fuese equivalente a la célula endotelial. De todos los elementos involucrados en la diálisis, la composición química y las características intrínsecas de la membrana de diálisis son sin duda los factores más relevantes en la evaluación de la biocompatibilidad (Gurland et al. 1994, Rodríguez Bent, Hernández Herrera & Aljama García 2006). Otro factor fundamental para la biocompatibilidad del sistema de hemodiálisis lo constituye el líquido de diálisis, de ahí la importancia de su pureza (Pérez García, González Parra & Sociedad Española de Nefrología 2006).

2.2.2. Líquido de diálisis: importancia del líquido ultrapuro:

Durante la sesión de hemodiálisis se ha demostrado que es posible la transferencia de diferentes sustancias pirógenas a la sangre, a través del dializador (Tabla 2). Es conocido que las endotoxinas pueden atravesar cualquier tipo de membrana. Las membranas de alta permeabilidad permiten incluso con más facilidad el paso de estas sustancias a la sangre, debido a que con estos dializadores es habitual el fenómeno de la retrofiltración, y de hecho, hay estudios que demuestran que la denominada reacción a pirógenos es más frecuente con membranas de alta permeabilidad que con membranas de baja permeabilidad (Pérez-García et al. 1995). Sin embargo, las membranas de diálisis desarrolladas en los últimos años, como la polisulfona, la poliamida o la polietersulfona, son capaces de absorber endotoxinas, disminuyendo la transferencia de las mismas (Lonnemann 1993) y evitando las reacciones a pirógenos.

Las endotoxinas en contacto con la sangre provocan la activación monocitaria y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. El impacto de este proceso depende de muchos factores, como el tipo o cantidad de endotoxina y las diferentes respuestas del huésped. Por ejemplo, es necesaria la presencia de determinadas proteínas en la sangre, como la proteína transportadora de lipopolisacárido o la proteína bactericida inductora de permeabilidad (Sundaram, King & Pereira 1997), para desencadenar una respuesta inflamatoria. En este sentido, el estado nutricional e inmunológico del paciente puede determinar diferentes respuestas en relación con la misma técnica de hemodiálisis (Jofre et al. 2006).

Tabla 2. Sustancias pirógenas derivadas de bacterias.	
(Adaptado de Jofre et al. 2006)	
Componentes de la pared bacteriana:	<ul style="list-style-type: none"> Lipopolisacáridos Lípido A Otros fragmentos de lipopolisacárido Peptidoglicanos Muramilpéptidos Otros
Otros componentes de la célula:	<ul style="list-style-type: none"> ADN bacteriano
Toxinas secretadas:	<ul style="list-style-type: none"> Exotoxina A Fragmentos de exotoxinas A Otras exotoxinas

Para minimizar el posible paso de sustancias pirógenas a la sangre, en los últimos años se ha reconocido la importancia de utilizar un líquido de diálisis de alta calidad. Para conseguir un líquido de diálisis con estas características es necesario utilizar un agua altamente purificada. Según las guías de calidad, la contaminación bacteriana máxima admisible en el líquido de diálisis estándar predializador es de 1.000 UFC/ml, debiendo ser la concentración de endotoxinas inferior a 0,5 UE/ml (Pérez García, González Parra & Sociedad Española de Nefrología 2006). Cuando se realiza diálisis de alto flujo, con membranas de alta permeabilidad, con las que se produce retrofiltración, y de forma indispensable, con las técnicas de hemofiltración o hemodiafiltración, el líquido de diálisis utilizado que se exige se denomina ultrapuro o altamente purificado. En este caso, la contaminación bacteriana máxima admisible es de 1 UFC/ml, y la de endotoxinas 0,03 UE/ml. Sabemos que se puede producir una estimulación de los monocitos con niveles plasmáticos de endotoxinas tan bajos como 0,05 ng/ml. Por ello, se ha escogido un nivel de endotoxinas para el líquido de diálisis ultrapuro semejante al de los líquidos estériles, con lo que se asegura que no hay endotoxinas suficientes para estimular a los monocitos. Según las guías, para minimizar la inflamación de los pacientes en hemodiálisis, todas las unidades de diálisis deberían trabajar para conseguir un líquido de diálisis ultrapuro para todas las modalidades de diálisis.

2.2.3. Líquido de diálisis: efecto del acetato.

La utilización de acetato como tampón de la solución del líquido de diálisis se sabe que puede producir efectos adversos sobre el paciente, tales como inestabilidad hemodinámica y depresión en la contractilidad miocárdica (Vincent et al. 1982, Herrero et al. 1994). Los mecanismos por los que el acetato produce estos efectos no se conocen con exactitud, aunque hay estudios que refieren un aumento en la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS), enzima productora de óxido nítrico, en células endoteliales incubadas con solución con acetato frente a aquellas células cultivadas con solución sin acetato, en las que no se observaban cambios en la actividad de la NOS (Amore et al. 1997). La estimulación periódica de la NOS en las células endoteliales con el líquido de diálisis tamponado con acetato podría tener relevancia en el desarrollo de la patología cardiovascular de los pacientes en hemodiálisis. No obstante, la mínima cantidad de acetato que se utiliza en la diálisis con bicarbonato, aunque es capaz de producir la activación de la NOS in vitro, probablemente sea rápidamente metabolizada y no llegue a alterar la actividad de la NOS in vivo. También hay estudios que refieren que el acetato es capaz de provocar el aumento de la síntesis de citoquinas, tales como la IL-1 (Bingel et al. 1987).

2.2.4 Prótesis vasculares y catéteres:

El tipo de acceso vascular tiene una gran relevancia en la evolución de los pacientes en hemodiálisis. Los pacientes portadores de catéter tunelizado tienen una mayor comorbilidad y una menor supervivencia en hemodiálisis que los pacientes portadores de fístula arteriovenosa. Respecto a la situación de inflamación, según un estudio, los pacientes con catéter tunelizado tienen cifras más elevadas de PCR y una mayor resistencia a la eritropoyetina que los pacientes portadores de prótesis arteriovenosas, teniendo los pacientes con fístula arteriovenosa autóloga los niveles más bajos de PCR (Movilli et al. 2006). Otros estudios refieren que los pacientes portadores de prótesis arteriovenosas trombosadas tienen cifras más elevadas de PCR, productos finales de glicación avanzada (AGEs) y moléculas de adhesión endotelial (Nassar, Fishbane & Ayus 2002, Cai et al. 2006, Chang et al. 2005). Estos resultados apoyan que el acceso vascular protésico trombosado puede provocar un empeoramiento del estado inflamatorio. Retirar el acceso vascular trombosado condicionaría una mejoría de los parámetros de inflamación (Nassar, Fishbane & Ayus 2002).

2.2.5. Biocompatibilidad de la membrana de diálisis:

En el tratamiento con hemodiálisis, la interacción entre la sangre y la superficie artificial de la membrana de diálisis tiene una especial relevancia, debido a la naturaleza crónica del tratamiento. Las membranas son generalmente polímeros, es decir, una repetición de

monómeros idénticos repetidos. La forma más habitual de clasificar las membranas de diálisis atiende a su composición y grado de permeabilidad (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de las membranas de diálisis (Adaptado de Martin Malo, De Francisco 2010)
<ul style="list-style-type: none"> • Composición del material <p>Celulósicas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Celulósica no modificada (baja permeabilidad) (cuprofán, acetato de celulosa, cuproamónio rayón) 2. Celulósica modificada o regenerada (baja permeabilidad) (hemofán) 3. Celulosa modificada o regenerada (alta permeabilidad) (triacetato de celulosa) 4. Recubiertas de vitamina E <p>Sintéticas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Baja permeabilidad (policarbonato, polisulfona, poliamida) 2. Alta permeabilidad (polisulfona, poliamida, polinefrona, polietersulfona, polimetilmetacrilato, poliacrilonitrilo)
<ul style="list-style-type: none"> • Permeabilidad (según el coeficiente de ultrafiltración (K_{ur})) <p>Alta: >20ml/h/mmHg.</p> <p>Intermedia: 12-20 ml/h/mmHg..</p> <p>Baja: <10-12 ml/h/mmHg.</p>

Hay múltiples estudios que comparan la biocompatibilidad de las membranas evaluando diferentes parámetros. Algunos análisis pueden realizarse fácilmente en el marco clínico habitual, aunque otras técnicas requieren laboratorios especializados. Entre los parámetros que se han utilizado para evaluar la biocompatibilidad de cada dializador se encuentran: su capacidad trombogénica, la capacidad de activar el complemento, la capacidad de activar los leucocitos, la capacidad de inducir la producción de ROS, y la capacidad de inducir la síntesis de diferentes citoquinas (Tabla 4).

Tabla 4. Fenómenos de interacción de la sangre con la membrana de diálisis
<ul style="list-style-type: none"> -Trombogenicidad -Activación del complemento -Activación celular -Incremento de ROS -Incremento de citoquinas proinflamatorias

2.2.5.1. Capacidad trombogénica del dializador:

El potencial trombogénico de un dializador es dependiente del tipo de polímero de membrana, de su permeabilidad, y del diseño del dispositivo, que repercute sobre las condiciones del flujo (Vienken 2006). Los factores responsables del potencial trombogénico de las membranas de diálisis son la energía libre superficial, la carga, la rugosidad, y la composición química de la membrana del dializador (Tsunoda et al. 1999).

El sistema extrínseco de la cascada de coagulación es activado por las superficies cargadas negativamente, por lo que los polímeros de membrana que poseen una superficie aniónica como las membranas de poliacrinonitrilo se pueden considerar más trombogénicas que las membranas de polímeros más neutros como la polisulfona. Por ello, con la membrana AN69 de poliacrinonitrilo se observaron no solo niveles más altos de adsorción del factor XII, sino de autoactivación del factor XIIa (Matata et al. 1996).

Los estudios clínicos que investigan la activación de la coagulación en distintos tipos de membrana y que utilizan la formación *ex vivo* del complejo de trombina-antitrombina III, como parámetro de coagulación, han revelado una mayor formación de dicho complejo con las membranas de poliacrinonitrilo que con las membranas de polisulfona o celulosa regenerada (Mulvihill et al. 1997).

A diferencia de los factores de coagulación, las plaquetas se adhieren más a las cargas catiónicas y a los materiales hidrofóbicos. En este sentido, se ha objetivado una reducción significativa en el recuento plaquetario tras 15 minutos de diálisis con dializadores de acetato de celulosa hidrofóbico (Verbeelen et al. 1991).

2.2.5.2. Activación del complemento provocada por el dializador:

Las membranas de celulosa regenerada y sin modificar generan una mayor activación del complemento que los restantes tipos de membranas de diálisis. Esto se debe a la unión del factor del complemento C3b a los grupos hidroxilo, localizados en la superficie de este tipo de membranas. La sustitución parcial de estos grupos hidroxilo de las membranas por grupos acetilo, dietilaminoetilo o benzilo, o bien el recubrimiento con polietilenglicol, proporcionan una reducción notable de la activación del complemento.

También se ha detectado activación del complemento desencadenada por la unión de proteínas reguladoras como el factor D con la membrana de poliacrinonitrilo (Pascual, Schifferli 1993).

Los parámetros más utilizados para evaluar la activación del complemento por las membranas de hemodiálisis son los factores del complemento C3a y C5a. No obstante, es difícil interpretar los valores de estos parámetros, ya que pueden ser absorbidos o filtrados

por las distintas membranas de diálisis, y pueden unirse a receptores plasmáticos. La síntesis de factores de activación del complemento se produce entre 15 y 30 minutos después de haber iniciado la sesión de hemodiálisis, y se recupera la normalidad prácticamente al final de la sesión. Debido a la estimulación crónica 3 veces por semana, las membranas de celulosa regenerada pueden inducir a largo plazo la supresión de la activación del complemento. El mecanismo no se conoce con exactitud, pero podría estar relacionado con el aumento de proteínas reguladoras del complemento, como el factor H y la proteína asociada al complemento SP-40 (Ohi, Tamano & Sudo 2001).

2.2.5.3. Activación celular provocada por el dializador:

El contacto de la sangre con las distintas membranas de diálisis induce una activación leucocitaria, que puede manifestarse con alteraciones en su funcionalidad. La forma más generalizada de evaluar la activación leucocitaria es la leucopenia que habitualmente se produce entre 15 y 30 minutos después del inicio de la hemodiálisis. Esta leucopenia se debe al aumento en la expresión de los receptores CD11b/CD18 y CD15s, que conduce a la adhesión, agregación y secuestro de los leucocitos en el pulmón. Las alteraciones en la funcionalidad leucocitaria están mediadas en parte por el complemento, por lo que existe una asociación entre la leucopenia y la activación del complemento. Las membranas de celulosa no modificada provocan una leucopenia más severa que las membranas de celulosa modificada. Las membranas sintéticas pueden inducir un descenso de los leucocitos moderado, bajo o muy bajo, dependiendo del polímero que las constituye. Por ejemplo, la poliamida y la polisulfona producen una leucopenia similar, aproximadamente del 12%, después de 15 minutos de hemodiálisis (Vienken 2006).

Las membranas de diálisis también pueden inducir la apoptosis de los neutrófilos, tanto de forma directa, como a través de la interacción con los monocitos. La producción de ROS parece influir en este proceso. Hay estudios que refieren un porcentaje de apoptosis más elevado con los dializadores de hemofán y cuprofán, moderado con los dializadores de diacetato de celulosa y relativamente bajo con los de poliacrilonitrilo y polisulfona (Martin-Malo et al. 2000).

2.2.5.4. Producción de ROS inducida por el dializador:

El tratamiento con hemodiálisis induce un mayor estrés oxidativo en los pacientes con ERC, que ya basalmente presentan una deficiencia en los sistemas antioxidantes. La producción de ROS puede detectarse indirectamente, a través de la medición de los niveles plasmáticos de productos de oxidación de las proteínas, como la oxidación de los grupos tiol de las proteínas plasmáticas. El incremento más acusado de ROS durante la diálisis se

ha descrito con las membranas que producen una mayor activación del complemento (Himmelfarb et al. 1993, Bonomini et al. 1999).

Entre las medidas que se han considerado para intentar evitar la inducción del estrés oxidativo, se encuentra la utilización de membranas recubiertas con vitaminas antioxidantes, como la vitamina E. Así, un estudio realizado con este tipo de membrana (Excebrane) mostró, tras tres meses de tratamiento, un aumento del 10% en las concentración plasmática de vitamina E. Sin embargo, este estudio no reveló una mejoría en cuanto a la reducción del estrés oxidativo (Galli, Canestrari & Buoncrisiani 1999).

2.2.5.5. Producción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por el dializador:

Las características de cada dializador pueden influir sobre la cantidad de citoquinas pro-inflamatorias circulantes. Entre los factores que pueden determinar la cantidad de citoquinas se encuentran la permeabilidad del dializador, la tasa de ultrafiltración y la capacidad de adsorción de citoquinas por el mismo (Bingel et al. 1988, Lonnemann et al. 1988).

Un estudio *in vitro* realizado para comparar el efecto de distintos dializadores, reveló una mayor proporción de monocitos con alto contenido en citoquinas con la membrana de hemofán que con la de poliamida. En este estudio pudo confirmarse que al poner los monocitos en contacto con un estímulo como el lipopolisacárido de origen bacteriano fueron secretadas más citoquinas de origen monocitario con hemofán que con poliamida. Concluyeron en este estudio que la hemodiálisis con poliamida y el hemofán no inducían cambios en la concentración plasmática de citoquinas, pero con hemofán se observó una mayor preactivación monocitaria. Los monocitos preactivados contienen una mayor cantidad de citoquinas, que podrían ser liberadas con un segundo estímulo, como es el contacto con endotoxinas (Girndt, Heisel & Kohler 1999).

Qian J y cols. evaluaron los niveles plasmáticos y la expresión génica de IL-1 β con distintos dializadores. No observaron diferencias en los niveles plasmáticos de IL-1 β , pero la expresión génica fue tres veces superior con la celulosa regenerada, comparada con el polimetilmetacrilato y con la polisulfona (Qian et al. 1995). Esto indicaría que las membranas de celulosa regenerada propician la expresión génica de citoquinas, pero no necesariamente su liberación desde las células, pudiendo permanecer estables los niveles plasmáticos de las citoquinas durante el tratamiento.

2.2.6. Importancia del transporte convectivo:

En los últimos años ha habido avances muy significativos respecto al tratamiento con hemodiálisis, particularmente en relación con la introducción de técnicas con mayor transporte convectivo, como la hemodiálisis *on-line*. Se han realizado varios estudios para analizar los

posibles efectos beneficiosos de esta técnica sobre el estado inflamatorio. Estos estudios muestran una reducción en el porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺ con la hemodiálisis *on-line* respecto a la hemodiálisis convencional de alto flujo (Ramirez et al. 2011, Kim et al. 2011), así como un descenso en los marcadores de daño endotelial (Carracedo et al. 2006). Esta mejoría parece claramente dependiente del transporte convectivo, ya que cuando los pacientes recibían tratamiento con hemodiálisis de alto flujo la proporción de monocitos CD14⁺CD16⁺ volvía a aumentar (Carracedo et al. 2006). No obstante, a pesar de la mejoría en los parámetros de inflamación y daño endotelial en estos pacientes, el porcentaje de monocitos activados no llegaba a ser tan bajo como en un sujeto sano.

3. Consecuencias de la inflamación en la ERC:

3.1. Síndrome de desgaste proteico-energético:

Los pacientes con ERC avanzada de forma muy frecuente presentan anorexia, lo que conduce a una pérdida progresiva de peso, con disminución del tejido adiposo y de la masa muscular (Stenvinkel, Heimbürger & Lindholm 2004, Pupim, Ikizler 2003). El concepto clásico de malnutrición urémica o caquexia urémica (Stenvinkel et al. 1999) ha evolucionado en los últimos años gracias al mejor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados, como la inflamación, el hipermetabolismo proteico y la anorexia (Gracia-Iguacel et al. 2013). La valoración del impacto de la malnutrición sobre la ERC está dificultada por la existencia de diferentes criterios diagnósticos y definiciones. Recientemente, se ha definido el síndrome de *protein energy wasting* (PEW) (Fouque et al. 2008), en un intento de unificar las terminologías asociadas al concepto de malnutrición en la ERC. El Grupo de Trabajo de Nutrición de la Sociedad Española de Nefrología ha propuesto el término desgaste proteico-energético como el que mejor define en habla hispana el concepto anglosajón del PEW (Gracia-Iguacel et al. 2013). El síndrome de desgaste proteico-energético se define como un estado patológico en el que hay un descenso o desgaste continuado tanto de los depósitos proteicos como de las reservas energéticas, incluyendo la pérdida simultánea de grasa y músculo en el paciente urémico. Diferentes estudios han mostrado que la inflamación está implicada en este proceso, observando que la masa muscular estaba inversamente correlacionada con la IL-6 y con la PCR en pacientes en hemodiálisis, incluso tras haber ajustado los valores por edad y sexo (Wang et al. 2004a). Johansen y cols. encontraron una asociación entre el descenso de los marcadores de masa muscular y la elevación de los niveles de IL-1 β en el seguimiento durante 1 año de pacientes en hemodiálisis (Johansen et al. 2003).

Las citoquinas pro-inflamatorias interactúan a través de diferentes vías con el sistema nervioso central, afectando áreas relacionadas con la regulación del apetito. Existen algunos estudios que demuestran una asociación entre la pérdida de apetito y la elevación de parámetros de inflamación como IL-6 y TNF- α en pacientes en hemodiálisis (Carrero et al. 2007a,

Kalantar-Zadeh et al. 2004). La IL-6 derivada del tejido músculo-esquelético podría contribuir al incremento de IL-6 que se produce durante la sesión de hemodiálisis (Raj et al. 2005, Garibotto et al. 2006). Además, niveles elevados de IL-6 se han relacionado con diferentes parámetros de desnutrición en pacientes urémicos (Pecoits-Filho et al. 2002), indicando la importancia que tiene esta citoquina en el desarrollo de la desnutrición y del catabolismo muscular (Axelsson et al. 2004, Carrero et al. 2008).

3.2. Anemia:

La principal causa de la anemia secundaria a la ERC es la deficiencia de eritropoyetina, pero también se han propuesto otros factores etiológicos relacionados con la inflamación. Los monocitos activados producen citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1, IL-6, TNF- α o INF- γ , implicadas en la inhibición de la eritropoyesis. El mecanismo exacto no se conoce, aunque parece haber una inducción de la apoptosis de células progenitoras de la serie eritroide (Macdougall, Cooper 2005).

Otro mecanismo relacionado con la inflamación es la producción de hepcidina en el hígado, un péptido que inhibe la absorción intestinal de hierro, y que es secretado al torrente sanguíneo por los macrófagos. La transcripción de hepcidina está inducida por la citoquina IL-6 (Nicolas et al. 2002, Atanasiu, Manolescu & Stoian 2007, Lee et al. 2005), por lo tanto, en situaciones de mayor inflamación, aumenta la expresión de hepcidina y disminuye la absorción de hierro, aumentando como consecuencia la anemia.

3.3. Aterosclerosis:

La aterosclerosis se considera, al menos en parte, un proceso inflamatorio. Sin embargo, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos por los que la inflamación conduce a la progresión de la aterosclerosis.

En los pacientes con ERC, la calcificación vascular tiene un papel fundamental en la generación de la aterosclerosis. En estos pacientes, se produce un proceso similar a la mineralización ósea en la pared vascular, con el depósito de cristales de fosfato cálcico. Recientemente, se ha demostrado que estos cristales podrían interactuar con los monocitos, induciendo inflamación por la vía de la proteína quinasa C y las MAP kinasas (Nadra et al. 2005).

La Fetuína-A es el inhibidor de osificación mejor estudiado. Ratones deficientes en el gen de la Fetuína-A desarrollan de forma temprana calcificaciones en los tejidos blandos y mueren jóvenes (Schafer et al. 2003). En los pacientes con ERC, los bajos niveles circulantes de Fetuína-A se asocian con un aumento en la mortalidad de origen cardiovascular (Ketteler et al. 2003, Stenvinkel et al. 2005b, Hermans et al. 2007). La inflamación se ha propuesto como un factor desencadenante del descenso de los niveles de Fetuína-A en los pacientes con ERC, ya

que la presencia de citoquinas pro-inflamatorias regula a la baja los niveles de Fetuína-A circulante (Gangneux et al. 2003, Moe, Chen 2005). También existen estudios en pacientes en programa de diálisis peritoneal en los que se asocian los niveles de Fetuína-A con calcificación de las válvulas cardiacas y con el estado de inflamación de los pacientes (Wang et al. 2005).

Hay otros estudios que sugieren una asociación entre inflamación y calcificación vascular. La citoquina TNF- α puede inducir mineralización de las células vasculares in vitro (118, seminars). El cocultivo de estas células con monocitos o macrófagos (productores de citoquinas) acelera el proceso de mineralización (Tintut et al. 2002).

3.4. Alteración de funciones endocrinas:

El riñón tiene un papel modulador de las funciones endocrinas. Como consecuencia, el estado de uremia se asocia con anormalidades en la síntesis y acción de muchas hormonas. La disfunción hormonal puede agravarse por el estado de inflamación crónica. Diferentes estudios corroboran esta hipótesis. Por ejemplo, hay un estudio que refiere que la inflamación inhibe la acción de la hormona del crecimiento (GH) (Cooney, Shumate 2006). La resistencia al efecto anabólico del eje hormona del crecimiento/factor del crecimiento insulínico tipo 1 (GH/IGF-1) podría ser otro factor que contribuye a la pérdida de fuerza y de masa muscular que habitualmente presentan los pacientes con ERC. Según un estudio realizado en pacientes en hemodiálisis, la infusión de GH a pacientes sin inflamación disminuía el potasio plasmático y tenía una repercusión sobre el balance proteico, pero no producía ningún efecto sobre los pacientes inflamados (Garibotto et al. 2008). Esto indicaría que la resistencia a la GH no está relacionada con la uremia, sino con el estado de inflamación.

Las hormonas tiroideas, tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3), son responsables de la regulación del metabolismo. La proporción T_4/T_3 en la sangre es aproximadamente 20/ 1. La T_4 se transforma en el hígado y en otros órganos en la forma metabólicamente activa, la T_3 (tres a cuatro veces más potente que la T_4). Sus efectos son el aumento del metabolismo basal, indispensable para un correcto desarrollo fetal, y el funcionamiento adecuado de varios sistemas como el cardiovascular, el músculo-esquelético, el hematopoyético, y el hormonal. Se sabe que la inflamación crónica también puede inducir un hipotiroidismo subclínico, situación que se observa con relativa frecuencia en los pacientes con enfermedad renal terminal (Zoccali et al. 2005, Carrero et al. 2007b). La inyección de IL-6 en sujetos sanos reduce la conversión de T_4 a T_3 (Torpy et al. 1998). Hay estudios clínicos que han demostrado que la disminución en los niveles de la hormona T_3 se correlaciona con marcadores de inflamación sistémica, y es un predictor independiente de mortalidad en pacientes con ERC estadio 5 (Carrero et al. 2007b), en pacientes en hemodiálisis (Zoccali et al. 2006), y en pacientes en diálisis peritoneal (Enia et al. 2007). La disminución de los niveles de la hormona T_3 circulante también se relaciona con un empeoramiento de la funcionalidad cardiaca (Zoccali et al. 2006, Kang et al. 2008). En estudios

realizados en pacientes portadores de trasplante renal, la disminución en los niveles de la hormona T₃ antes del trasplante predijo una menor supervivencia del injerto (Rotondi et al. 2008).

La inflamación persistente también puede producir una disminución en los niveles de testosterona. Según Carrero y cols., más del 50% de los pacientes con ERC terminal podrían padecer un déficit de testosterona, lo cual está relacionado con marcadores de inflamación sistémica y con un riesgo incrementado de mortalidad (Carrero et al. 2009).

3.5. Aumento de mortalidad:

La enfermedad cardiovascular es la causa más frecuente de muerte en los pacientes con ERC terminal, siendo la causa de fallecimiento en aproximadamente la mitad de los pacientes en hemodiálisis.

La PCR, proteína reactante de fase aguda que se eleva de forma característica en situaciones de inflamación, es predictora de la mortalidad de origen cardiovascular en la población general. En pacientes en hemodiálisis, los niveles más elevados de PCR se asocian con el aumento de riesgo de muerte de cualquier causa de origen cardiovascular (Zimmermann et al. 1999).

Se considera que el estado inflamatorio puede tener un efecto catalizador sobre otros factores de riesgo. De este modo, se propone la hipótesis de que la inflamación persistente de grado bajo, frecuentemente observada en los pacientes con ERC, podría modular el efecto de otros factores de riesgo como la malnutrición y la enfermedad cardiovascular (Carrero, Stenvinkel 2009), empeorando la situación del paciente. La inflamación se considera un factor etiológico de malnutrición, pero también puede interactuar con el estado de malnutrición y la enfermedad cardiovascular para incrementar el riesgo de mortalidad. Según el estudio de Mutsert y cols, la presencia de inflamación, enfermedad cardiovascular y malnutrición se asoció con 16 muertes/100 personas al año, una tasa de mortalidad más alta que la esperada para cada uno de estos factores por separado (De Mutsert et al. 2008). En este sentido, las observaciones epidemiológicas se traducen en el acuñamiento del nuevo síndrome MIA (malnutrición, inflamación y aterosclerosis), en el cual “el todo es más que la suma de sus partes”. Parekh y cols observaron que, aunque la muerte súbita es más frecuente en los pacientes con ERC terminal, ésta aumentaba significativamente si existía malnutrición e inflamación, independientemente de los factores de riesgo cardiovascular clásicos. Específicamente, los pacientes que tenían niveles más altos de PCR y niveles más bajos de albúmina, presentaban con más frecuencia muerte súbita (Parekh et al. 2008). En otro estudio realizado en pacientes en hemodiálisis, el incremento de la PCR y de los monocitos activados CD14⁺CD16⁺ aumentaba el

riesgo de mortalidad, sugiriendo un efecto sinérgico de ambos parámetros de inflamación sobre la mortalidad (Heine et al. 2008).

Todos estos datos son un reflejo de la importancia que tiene intentar corregir la situación de inflamación crónica en los pacientes con ERC, un proceso clínicamente insidioso, pero cuyas consecuencias son tan relevantes como un aumento de mortalidad en estos pacientes.

4. Marcadores de inflamación:

4.1. Proteína C reactiva (PCR):

La PCR es el marcador de inflamación más extensamente utilizado en la práctica clínica. Esta proteína se eleva rápidamente tras un estímulo inflamatorio. Se produce en los hepatocitos, principalmente en respuesta a una elevación en los niveles de IL-6. También la IL-1 β y los glucocorticoides inducen la síntesis hepática y liberación de la PCR. Una vez liberada, la PCR se une a su ligando principal, la fosfocolina, que es un componente de la pared bacteriana y de los hongos, disparando así la activación de la cascada del complemento y la respuesta fagocítica. En humanos, la PCR es la proteína de fase aguda más estudiada y puede aumentar hasta 1000 veces entre 24 y 48 horas después de una infección, inflamación o daño tisular. Su vida media es de 19 horas, lo que facilita su detección en la circulación sanguínea. Los valores de PCR en un sujeto sano deben ser menores de 0,15 mg/L. No obstante, un estilo de vida no saludable, como el sedentarismo, obesidad y consumo de tabaco puede hacer que se incrementen los niveles de PCR. Los niveles medios de PCR en la población general oscilan entre 1 y 3 mg/L. En algunos estudios se ha utilizado la PCR ultrasensible, aunque recientemente se ha demostrado que la cuantificación convencional de PCR en pacientes en hemodiálisis predice el riesgo de mortalidad con la misma eficacia que la PCR ultrasensible (Kanaan et al. 2008, Grootendorst et al. 2007).

Los pacientes europeos en diálisis tienen unos niveles medios de PCR de 7-8 mg/L, siendo estos niveles algo más elevados en Estados Unidos, y sustancialmente más bajos en Corea y Japón (Wang et al. 2004a, Nascimento et al. 2004, Stenvinkel et al. 2002, Kaizu et al. 2003, Muntner et al. 2004, Avesani et al. 2004). Según el estudio NHANES, aproximadamente el 50% de los pacientes con filtrado glomerular estimado entre 15-60 ml/min tienen unos niveles de PCR >2,1 mg/L. Los pacientes diabéticos generalmente tienen niveles algo más elevados de PCR que los no diabéticos (Wanner et al. 2005).

4.2. Citoquinas:

4.2.1. Interleuquina 6 (IL-6):

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica expresada en muchas células. Inicialmente recibió diferentes nombres en relación con las distintas funciones que realizaba, aunque posteriormente se descubrió que todas estas acciones estaban relacionadas con un gen común, que fue denominado IL-6 (Kishimoto 1989, Van Snick 1990). Es una molécula de 212 aminoácidos, con estructura helicoidal y que en ocasiones puede estar glicosilada. El receptor funcional para IL-6 es un complejo de dos glicoproteínas transmembrana, la glicoproteína gp130 de 130 KDa, encargada de transducir la señal, y la glicoproteína gp80 de 80 KDa, encargada de unirse al ligando o IL-6, denominándose receptor de IL-6 (IL-6R). En el organismo muchas células expresan IL-6, destacando principalmente las células beta de los islotes pancreáticos, pero también se expresa en células T CD8⁺, fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales, monocitos y células B, entre otras.

La IL-6 circulante se encuentra en sangre a niveles de 1 pg/ml en individuos normales. Los niveles se elevan ligeramente en la menstruación, moderadamente en el cáncer tipo melanoma (10 pg/ml) y de un modo sustancial tras una cirugía (30-430 pg/ml).

Su función se considera crucial en la respuesta inflamatoria aguda, ya que promueve la activación y proliferación linfocitaria, la diferenciación de células B, el reclutamiento de leucocitos y la regulación de la síntesis de PCR, IL-4, fibrinógeno y albúmina (Stenvinkel et al. 2005). Tiene efectos tanto pro-inflamatorios como anti-inflamatorios. También modula la reabsorción del hueso y promueve hematopoyesis (Kishimoto 1989, Van Snick 1990).

La IL-6 se considera el mejor marcador pronóstico de mortalidad en pacientes con ERC, siendo incluso mejor que la PCR, el TNF- α o la albúmina (Barreto et al. 2010, Zoccali, Tripepi & Mallamaci 2006, Pachaly et al. 2008). El aumento de esta citoquina en plasma se ha asociado de manera independiente con el aumento de la PCR, la albúmina y el grado de severidad de la insuficiencia renal. Por el momento, a pesar de ello, no es tan accesible en la práctica clínica habitual como otros marcadores.

4.2.2. TWEAK:

El TWEAK es una citoquina que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Como el TNF, es un inductor débil de la apoptosis celular. Ejerce sus efectos biológicos a través de su unión al receptor Fn14, destacando su efecto como mediador de la respuesta inflamatoria al activar la expresión de genes pro-inflamatorios por la vía de NF-kB (Figura 1) (Dogra et al. 2007). Estudios experimentales en animales sugieren que TWEAK podría estar implicado en la progresión de la ERC, participando en reacciones inflamatorias en el túbulo renal (Sanz et al. 2010, Sanz et al. 2008, Justo et al. 2006). La IL-6 induce la producción de

Fn14, el receptor de TWEAK. En este sentido, se ha sugerido que la inflamación crónica podría intensificar los efectos de TWEAK, a través del aumento de la síntesis de su receptor (Winkles 2008). En la actualidad se cree que la inhibición de la actividad de TWEAK podría retrasar la progresión de la ERC y la pérdida de masa muscular. Por otro lado, Yilmaz y cols refieren en su estudio que el tratamiento antihipertensivo en pacientes diabéticos con ERC estadio 1 reduce la proteinuria y la concentración de TWEAK en pacientes hipertensos (Yilmaz et al. 2010).

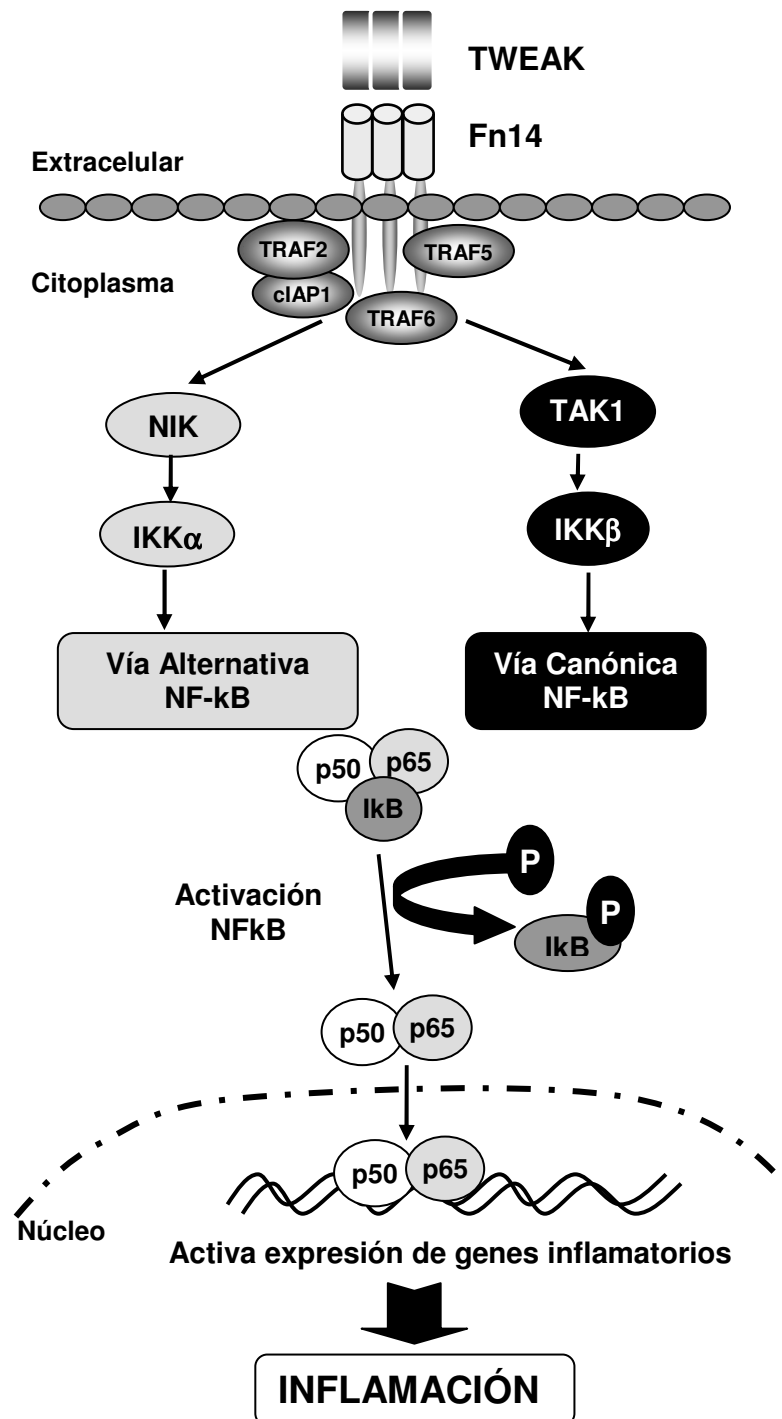


Figura 1.- Mecanismo del TWEAK sobre la inflamación.

4.3. Activación monocitaria:

Los monocitos son células de la línea mieloide que se originan a partir de células de origen hematopoyético en la médula ósea, en respuesta al factor estimulador de la colonia de macrófagos. Las células progenitoras se diferencian en monoblastos y luego en pro-monocitos, los cuales llegan a la corriente sanguínea como monocitos. Los monocitos circulan en sangre periférica antes de entrar en los tejidos en forma de macrófagos.

En ratones, los monocitos circulantes se clasifican en 2 poblaciones basándose en la expresión de marcadores específicos de superficie, dando lugar a monocitos inflamatorios o monocitos residentes. En humanos, existe gran heterogeneidad de monocitos circulantes que podemos resumir como monocitos clásicos y monocitos no clásicos según expresen mayor o menor cantidad de los marcadores CD14 y CD16. Los monocitos clásicos son los que aparecen normalmente en personas sanas como población mayoritaria, con expresión alta de CD14 y baja de CD16 ($CD14^{++}CD16^{-}$), mientras que los monocitos no clásicos expresan ambos receptores.

CD14 es una glicoproteína de unos 55 KDa expresada preferentemente en monocitos y macrófagos, y actúa cooperando con otras proteínas para mediar la respuesta inmune innata, actuando como receptor del lipopolisacárido bacteriano. CD16 es una glicoproteína de 50 a 80 KDa, receptor Fc de baja afinidad, que actúa uniendo la porción Fc de anticuerpos IgG. Su función biológica en la célula es mediar la fagocitosis y la citotoxicidad debida a células dependientes de anticuerpos. Se expresa en neutrófilos, células Natural Killer y en macrófagos (Ramirez, Martin-Malo & Aljama 2011).

La población de monocitos no clásicos suele aparecer en determinadas situaciones patológicas, caracterizada por una expresión variable de CD14 y coexpresión de CD16. En relación con la expresión de estas dos moléculas, se han descrito tres subpoblaciones monocitarias diferentes: en primer lugar, los monocitos con una expresión elevada de CD14, pero que no expresan CD16 ($CD14^{++}CD16^{-}$), son los monocitos clásicos que presentan los sujetos sanos. Los monocitos $CD14^{++}CD16^{+}$, son una subpoblación monocitaria que típicamente presentan los pacientes con patología cardiovascular (Rogacev et al. 2011). Por último, los monocitos $CD14^{+}CD16^{+}$ están presentes en los pacientes con cualquier proceso inflamatorio crónico, incluidos los pacientes con ERC (Nockher, Scherberich 1998, Scherberich, Nockher 2000, Carracedo et al. 2002).

Diferentes estudios confirman un incremento en el porcentaje de monocitos activados $CD14^{+}CD16^{+}$ en los pacientes con ERC, constituyendo más de un 30% de los monocitos circulantes en estos pacientes (Carracedo et al. 2006, Merino et al. 2011, Sester et al. 2001, Nockher, Wiemer & Scherberich 2001) (Figura 2).

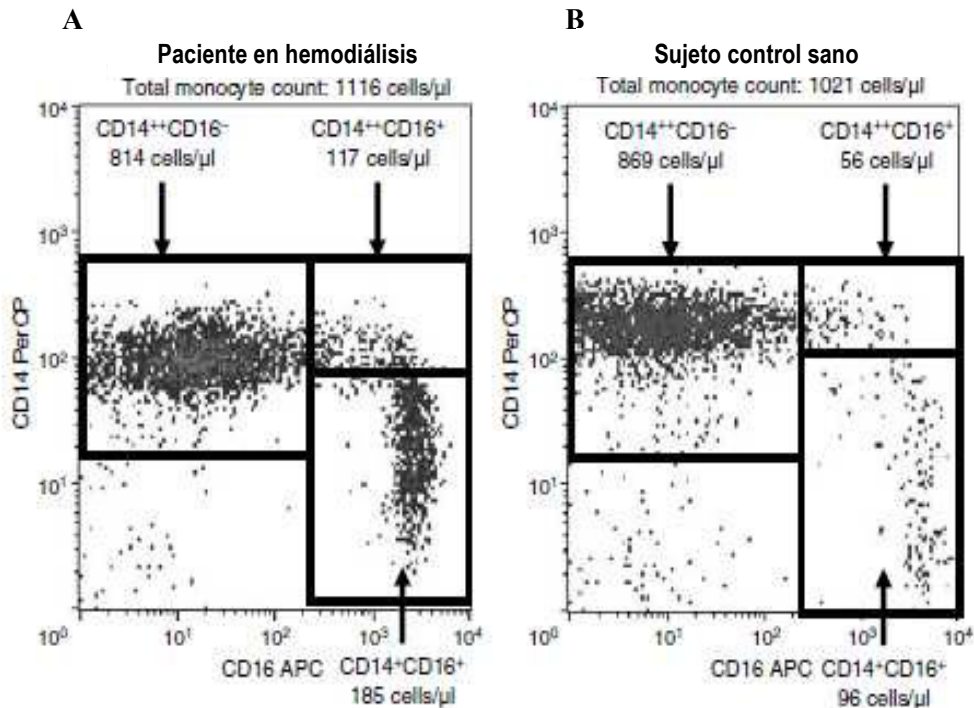


Figura 2.- Subpoblaciones monocitarias de un paciente en hemodiálisis (A) y de un sujeto sano (B).
(Adaptado de Heine et al. 2008).

Los monocitos CD14⁺CD16⁺ son células activadas que muestran unas características fenotípicas especiales, con una expresión elevada de antígenos HLA-DR y moléculas de adhesión, y que contienen en su citoplasma una cantidad elevada de citoquinas pro-inflamatorias preformadas (Ramirez et al. 2006, Ziegler-Heitbrock 2007).

Los monocitos CD14⁺CD16⁺ también se sobreexpresan en personas de edad avanzada y en pacientes con cualquier causa de inflamación crónica. La producción de este subtipo monocitario está favorecida por la estimulación repetida de los monocitos en un entorno con abundantes citoquinas pro-inflamatorias. Los monocitos CD14⁺CD16⁺ presentan características de células senescentes, con acortamiento de los telómeros y expresión del enzima β -galactosidasa. Estos datos conducen a considerar la hipótesis de que los monocitos CD14⁺CD16⁺ podrían ser células activadas, que en presencia de citoquinas inflamatorias no serían sometidas a apoptosis, prolongando su supervivencia y transformándose en células senescentes con modificación de su fenotipo y de su actividad.

De hecho, hay estudios que refieren que los monocitos CD14⁺CD16⁺, parecen diferenciarse a partir de los monocitos clásicos CD14⁺⁺CD16⁻, ante la presencia de factores tróficos y/o citoquinas pro-inflamatorias (Merino et al. 2011, Ancuta, Weiss & Haeffner-Cavaillon 2000, Li, Hangoc & Broxmeyer 2004). En el curso de una respuesta inmune adecuada, cuando el estímulo inmunogénico desaparece, la eliminación de los factores tróficos induciría a estas células a

entrar en un estado de apoptosis (16Cocultivos1). Sin embargo, en el estado de inflamación crónica que presentan los pacientes con ERC, estas células no llegarían nunca a la situación de apoptosis, sino que prologarían su supervivencia y se acumularían en la circulación en un estado de células senescentes (Ramirez et al. 2005, Carracedo et al. 2005). Como ocurre con otras células senescentes, los monocitos $CD14^+CD16^+$ provocan un aumento en la producción y secreción de moléculas como citoquinas pro-inflamatorias, capaces de perpetuar el proceso inflamatorio en los pacientes con ERC.

Mientras que el aumento en el porcentaje de monocitos $CD14^{++}CD16^+$ se relaciona con la enfermedad cardiovascular, el aumento de los monocitos $CD14^+CD16^+$ parece condicionar un daño endotelial. Los monocitos $CD14^+CD16^+$ producen *in vitro* mayor estrés oxidativo y apoptosis en células de estirpe endotelial (Ziegler-Heitbrock 2007). En los pacientes con ERC, el aumento de los monocitos $CD14^+CD16^+$ se correlaciona también con marcadores de daño endotelial, como el incremento en los niveles plasmáticos de micropartículas de origen endotelial o el número de células progenitoras endoteliales (Ramirez et al. 2007, Merino et al. 2008b, Merino et al. 2008a). Por otro lado, este subtipo celular presenta una expresión aumentada de moléculas de adhesión y de citoquinas, así otros marcadores de superficie como CX3CR1, CCR5 y CCR7 facilitan la interacción entre los monocitos y el endotelio, generando una respuesta inflamatoria local que induce aumento del estrés oxidativo y apoptosis de células endoteliales (Merino et al. 2011, Merino et al. 2010).

Respecto a las situaciones con ERC en las que hay un incremento de los monocitos activados $CD14^+CD16^+$, hay múltiples estudios que refieren su elevación en pacientes en hemodiálisis, aunque hay menos información sobre el porcentaje de estas células en pacientes con ERC estadio 4-5 o en pacientes en diálisis peritoneal. Merino y cols. describieron como los pacientes con ERC estadio 4-5 presentaban un porcentaje de monocitos $CD14^+CD16^+$ significativamente mayor que los sujetos sanos, aumentando aún más este porcentaje cuando los pacientes iniciaban el tratamiento con hemodiálisis (Merino et al. 2010). Los pacientes que reciben tratamiento con diálisis peritoneal, sin embargo, tienen un porcentaje de monocitos activados similar al de los sujetos sanos, y no hay diferencias en relación con el grado de función renal residual.

4.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS):

Las ROS son productos del metabolismo normal de la célula. La producción de ROS intracelular puede ser, según el contexto, dañina o beneficiosa (Valko et al. 2006). Los efectos beneficiosos de las ROS se producen a concentraciones bajas o moderadas, participando en procesos fisiológicos como agentes antiinfecciosos o como reguladores de diferentes vías de señalización intracelular. Los efectos deletéreos causados por los radicales libres se deben a los cambios estructurales y funcionales que se producen como consecuencia de la interacción de

altas concentraciones de estas moléculas con elementos celulares normales, como los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, en un proceso denominado estrés oxidativo (Valko et al. 2006, Valko et al. 2001, Kovacic, Jacintho 2001).

Las ROS son moléculas pequeñas o fragmentos de moléculas que, en la mayor parte de los casos, contienen uno o más electrones desapareados en los orbitales moleculares (Halliwell, Gutteridge 1999). Poseen una vida media corta, porque el electrón o electrones desapareados son altamente reactivos, y por esta razón son denominados radicales libres.

Las células generan energía aeróbicamente reduciendo el oxígeno molecular a agua. La enzima citocromo C oxidasa mitocondrial cataliza esta reacción que conlleva la transferencia de 4 electrones al oxígeno, dando lugar a diferentes ROS como el anión superóxido (O_2^-), el agua oxigenada (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Figura 3). Esta reacción puede activarse también por radiación de luz ultravioleta, agentes químicos, agentes tóxicos o drogas.

El organismo posee mecanismos de protección frente al estrés oxidativo, pudiendo prevenir la generación de ROS, destruir los oxidantes una vez formados, o reparar los daños producidos por ellos. En condiciones fisiológicas la célula mantiene un delicado equilibrio entre la producción y la destrucción de ROS (Droge 2002). Los mecanismos de detoxificación pueden ser enzimáticos o no enzimáticos y se definen como sistemas antioxidantes (Figura 4). La superóxido dismutasa dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno mediante una reacción espontánea y rápida, siendo el anión superóxido más tóxico que el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se descompone por tres mecanismos, 1) por enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa, que catalizan el paso de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno, o de peróxido de hidrógeno a 2 moléculas de agua, respectivamente. 2) El peróxido de hidrógeno, por la acción de la mieloperoxidasa en los neutrófilos, se convierte en ácido hipocloroso, molécula muy oxidante con acción bactericida en las células fagocíticas. Cuando este ácido reacciona con peróxido de hidrógeno libera agua y oxígeno en singlete. 3) El peróxido de hidrógeno, en presencia de hierro, se transforma espontáneamente en el radical hidroxilo a través de la denominada reacción de Fenton. Este radical es altamente reactivo y puede interaccionar con moléculas biológicas como lípidos, ácidos grasos, proteínas, ácidos nucleicos o carbohidratos, captando un átomo de hidrógeno de sus moléculas para producir otros radicales que siguen reaccionando, aunque son más duraderos y estables. Como consecuencia de los cambios producidos, las moléculas biológicas pueden sufrir pérdida de su función o de su estructura, induciendo daño celular, como ocurre en la peroxidación lipídica. La interacción entre el peróxido de hidrógeno y el hierro, y sus efectos deletéreos, pueden evitarse con sistemas como la lactoferrina, que secuestra el hierro, o la vitamina E, que puede bloquear la acción del anión hidroxilo.

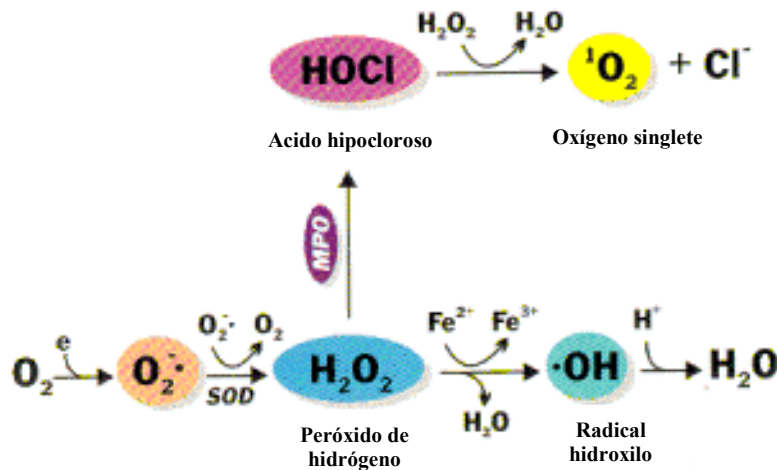


Figura 3.- Generación de ROS a partir del oxígeno molecular (O_2).

MPO: Mieloperoxidasa, SOD: superóxido dismutasa, $O_2^{\cdot-}$: anión superóxido, e^- : electrones, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, HOCl: ácido hipocloroso, $\cdot OH$: radical hidroxilo, Fe: hierro. (R&D Systems 2014)

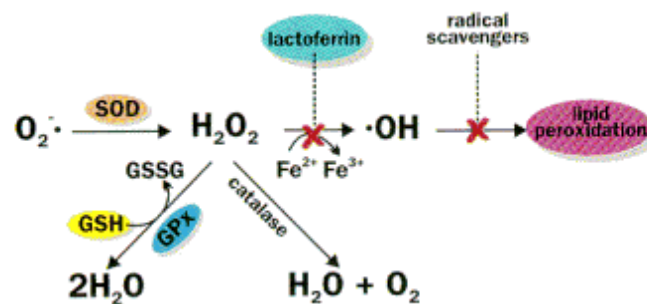


Figura 4.- Mecanismos antioxidantes de la célula frente a los ROS.

SOD: superóxido dismutasa, GPx: glutatión peroxidada, GSH: glutatión. (R&D Systems 2014)

Entre las principales fuentes de producción de ROS se encuentra la activación celular en los procesos de inflamación (Inoue et al. 2003). También se produce el efecto inverso, y los ROS pueden provocar efectos proinflamatorios. Por ejemplo, se ha demostrado que determinadas ROS, como el peróxido de hidrógeno, activan el factor de transcripción de NFkB, promoviendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, ampliando la cascada de la respuesta inflamatoria (Akiyama et al. 2003, Wang, Zhang & Li 2002).

4.4.1. ROS y hemodiálisis:

Existe una relación entre inflamación, estrés oxidativo y daño endotelial en pacientes con ERC (Morena et al. 2005). El estrés oxidativo, con la consecuente producción de citoquinas, se ha implicado en la pérdida de masa muscular, en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular y en la mayor susceptibilidad a las infecciones en estos pacientes. Los monocitos circulantes pueden generar ROS y citoquinas pro-inflamatorias (Nguyen et al. 1985), pudiéndose producir esta activación por el contacto con la membrana de diálisis. La activación del complemento al usar membranas con baja biocompatibilidad induce generación de ROS (Himmelfarb, Lazarus

& Hakim 1991). Ward y cols. sugirieron que la utilización de membranas de alto flujo normalizaría la producción de ROS por parte de los neutrófilos (Ward, Ouseph & McLeish 2003). Sin embargo, Raj y cols. encontraron un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno intradiálisis por parte de los linfocitos, a pesar de usar una membrana biocompatible como la polisulfona (Raj et al. 2007). Estos autores argumentaron que dicho aumento podría deberse a la interacción de la sangre con el dializador y al posible efecto de factores pirogénicos bacterianos debido a la retrofiltración que provocan las membranas de alto flujo. No obstante, este efecto debería estar minimizado en la actualidad, con la mejora de la calidad del líquido de diálisis y por la utilización de filtros absorbentes de endotoxinas que se suelen utilizar en las modalidades de diálisis *on-line* y de alto flujo.

4.5. Proteínas de shock térmico (Hsp):

Las proteínas Hsp son un grupo de proteínas presentes constitutivamente en todas las especies (Pockley 2002). Son sintetizadas en situaciones de estrés. En la tabla 5 se detallan las circunstancias que pueden desencadenar la síntesis de las proteínas Hsp.

Tabla 5. Factores desencadenantes de la síntesis de Hsp

- Aumento o disminución de la temperatura (5°C respecto a la temperatura normal de las células).
- Cambios en la presión osmótica.
- Presencia de sustancias tóxicas:
Toxinas, quimioterapia, drogas, alcohol, citoquinas, etc.
- Aumento de la presión.
- Cambios bruscos de pH.
- Estrés oxidativo.
- Infecciones virales.
- Deficiencias nutricionales.
- Presencia de metales pesados.
- Traumatismos.
- Isquemia.
- Radiaciones ionizantes.

La estructura tridimensional de las proteínas es una característica indispensable para que puedan llevar a cabo su función. Cuando por estrés o situaciones de agresión celular la proteína pierde su estructura tridimensional, se desnaturaliza y, como consecuencia, pierde su función. Las proteínas Hsp estabilizan y protegen al resto de proteínas intracelulares frente a estas

situaciones, uniéndose a ellas para evitar que se degraden. Así, cuando la situación de estrés desaparece, estas proteínas pueden adquirir su conformación tridimensional y volver a ser activas.

Algunas proteínas Hsp pertenecen a la familia de las chaperonas. Las chaperonas son unas proteínas cuya función es contribuir al plegamiento de otras recién sintetizadas. Uniéndose a estas proteínas, facilitan su plegamiento, ensamblaje y transporte celular a aquella parte de la célula donde la proteína realice su función. Las Hsp no llevan a cabo el plegamiento de la proteína en sí, ya que esta información reside en la estructura primaria de la propia proteína, sino que únicamente facilitan que la proteína se pliegue adecuadamente, manteniéndola estable para que no se agregue a otras proteínas.

Las Hsp se clasifican en 2 familias, la familia de las chaperoninas (Hsp60, Hsp10, Hsp70 y Hsp90) y la familia de las nucleoplasminas (proteínas nucleares o nucleosomas).

El nombre utilizado para denominarlas especifica su peso molecular, por ejemplo, la proteína Hsp70 indica que pesa 70 KDa. De todas las conocidas, las estudiadas con más profundidad han sido la Hsp60, la Hsp70 y la Hsp90. Las proteínas Hsp constituyen del 5 al 10% del contenido proteico celular en condiciones adecuadas de crecimiento, y su síntesis se puede estimular, llegando al 15-25% del contenido proteico en situaciones de estrés. Se consideran isoformas constitutivas la Hsp70 y la Hsp90-beta, e inducibles las isoformas Hsp60, Hsp70 y la Hsp90-alfa (Musial, Zwolinska 2011).

La Hsp70 es una chaperona o proteína de choque térmico a altas temperaturas que trabaja asociada a la Hsp40 para revertir el proceso de desnaturalización y agregación proteica, facilitar el plegamiento correcto de proteínas sintetizadas de novo y asistir a la translocación de proteínas a través de la membrana de mitocondrias y cloroplastos. La Hsp90, chaperona de 90 KDa, tiene una función esencial para la supervivencia celular. Favorece el plegamiento, estabilización y montaje de proteínas transductoras de señales como tirosina quinasas, factores transcripción y proteínas estructurales. Su sobreexpresión se ha relacionado con algunos cánceres por promover la supervivencia de células tumorales.

Aunque es ampliamente conocida su función intracelular, también estas proteínas parecen tener un papel en el espacio extracelular, considerándose mediadoras en la respuesta inflamatoria. La forma precisa en que estas proteínas son liberadas al espacio extracelular no ha sido completamente aclarada, aunque se describen 3 mecanismos fundamentales: 1) liberación por lisis celular, mecanismo observado en células tumorales dañadas (Mambula, Calderwood 2006), 2) liberación mediante formación de vesículas secretoras o exosomas (MacKenzie et al. 2001), y 3) liberación mediante la entrada de estas proteínas en endosomas lisosomales secretores, que migran a la superficie celular y se liberan al espacio extracelular (Baraldi, Di

Virgilio & Romagnoli 2004). Los dos últimos mecanismos de secreción han sido observados en macrófagos estimulados por lipopolisacáridos.

Se considera que las proteínas Hsp extracelulares actúan como moléculas marcadores de señal intracelular para realizar su efecto pro-inflamatorio. Por ello, deben actuar sobre receptores de membrana celulares. El receptor antigénico CD14, conocido como el receptor de lipopolisacáridos de origen bacteriano en monocitos, ha sido identificado como el receptor para Hsp60 (Kol et al. 2000) y para Hsp70 (Asea et al. 2000). Al unirse al receptor CD14, la Hsp70 induce cambios en el flujo intracelular de calcio, estimulando la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α . También ha sido descrita la producción de TNF- α por un mecanismo calcio-dependiente, pero independiente del receptor CD14 (Asea et al. 2000).

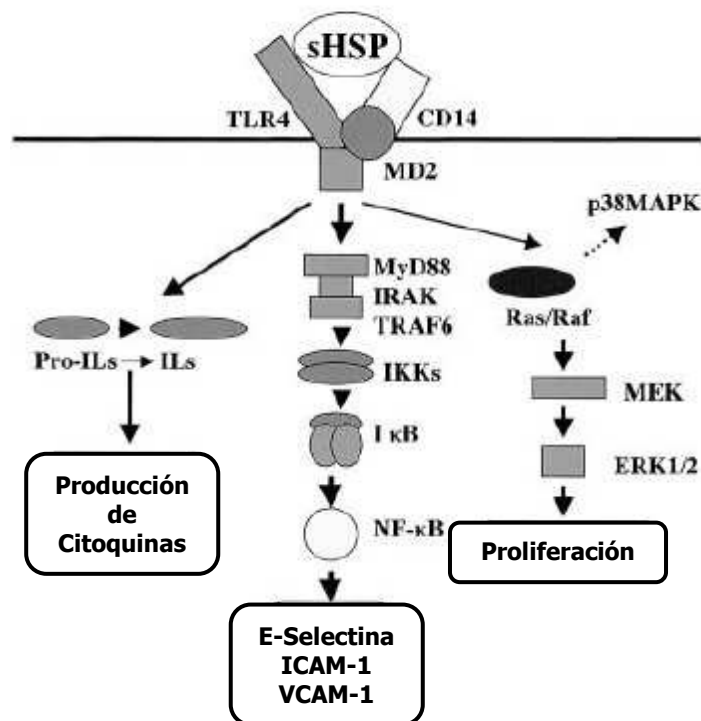


Figura 5. Vías de señalización de las proteínas Hsp. (Adaptado de Xu 2002).

La actividad pro-inflamatoria de estas moléculas se ha descrito en diferentes estudios. Las Hsp de bacterias y micobacterias inducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1, IL-6 y TNF- α (Galdiero, de l'Ero & Marcatili 1997, Retzlaff et al. 1994). Tanto la Hsp60 bacteriana como la humana estimulan la secreción de IL-6 y TNF- α en células endoteliales, células musculares lisas, monocitos y macrófagos (Kol et al. 2000, Galdiero, de l'Ero & Marcatili 1997, Peetermans et al. 1995, Kol et al. 1999). La Hsp70 también parece inducir la producción de IL-6 y TNF- α , mientras que la Hsp90, en estudios *in vitro*, estimula la producción de INF- γ e IL-4, activando los linfocitos Th1 y Th2 (Businaro et al. 2009). En este sentido, el papel de la proteína Hsp90 respecto a la inflamación no está tan claro, ya que los

linfocitos activan a los macrófagos provocando diferentes respuestas según sea el subtipo linfocitario. Los macrófagos activados clásicamente (fenotipo Th1 o clase I) promueven inflamación, destrucción de matriz extracelular y apoptosis, mientras que los macrófagos con fenotipo Th2 o clase II promueven síntesis de matriz extracelular, proliferación celular y angiogénesis. En resumen, los Th1 tienden a provocar inflamación crónica y daño tisular, mientras que los Th2 resuelven la inflamación y favorecen la cicatrización o reparación de heridas.

4.5.1. HSP y enfermedad vascular:

Parece cada vez más evidente que las proteínas Hsp tienen un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad vascular. El modo preciso en el que las Hsp influyen en la aterogénesis no está claro. Existen numerosos estudios que reflejan la asociación entre la expresión de Hsp y la inducción de la respuesta inflamatoria que caracteriza al desarrollo de la aterosclerosis. De hecho, hay diferentes estudios que relacionan la presencia de las proteínas Hsp con la aterogénesis. Aunque las proteínas Hsp60 y Hsp70 se encuentran en suero en individuos sanos, los niveles de Hsp60 se han correlacionado con la formación temprana de aterosclerosis (Pockley et al. 2000, Xu et al. 2000), y los niveles de Hsp70 se encuentran elevados en suero en pacientes con enfermedad vascular periférica y enfermedad renal (Wright et al. 2000). La expresión de Hsp en las fases tempranas de la aterosclerosis podría deberse a una o más causas. Los factores de riesgo vascular como dislipemia, diabetes, tabaco e hipertensión (HTA) causan estrés oxidativo. Se sabe que el estrés oxidativo induce la expresión de Hsp en células musculares lisas vasculares (Liao et al. 2000). Factores hemodinámicos como la elevación de la presión arterial también se han relacionado con el aumento de las proteínas Hsp. El *shear stress* induce la expresión de Hsp60 en células endoteliales humanas en cultivo (Liao et al. 2000). También se ha detectado un aumento de Hsp60 en la pared de la carótida de ratas sometidas a un incremento del *shear stress* en la pared vascular (Hochleitner et al. 2000). Respecto a la dislipemia, se ha observado que la exposición *in vitro* a lipoproteínas oxidadas induce la expresión de Hsp60 en monocitos y de Hsp70 en células endoteliales y musculares lisas humanas (Frostegard et al. 1996).

La elevación en los niveles de anticuerpos anti-Hsp circulantes también se ha asociado con la presencia y progresión de la enfermedad vascular. Aunque se ha detectado su existencia a niveles bajos en sujetos sanos, parece haber un incremento en los niveles de anticuerpos circulantes en determinadas situaciones. Por ejemplo, se han detectado unos niveles elevados de anticuerpos anti-Hsp60 en la enfermedad vascular periférica (Wright et al. 2000). También hay estudios *in vitro* que muestran citotoxicidad de células endoteliales provocada por el contacto con suero anti-Hsp60 (Xu et al. 1994, Schett et al. 1995, Mayr et al. 1999), sugiriendo un papel de estos anticuerpos en el daño vascular y la patogénesis de la aterosclerosis.

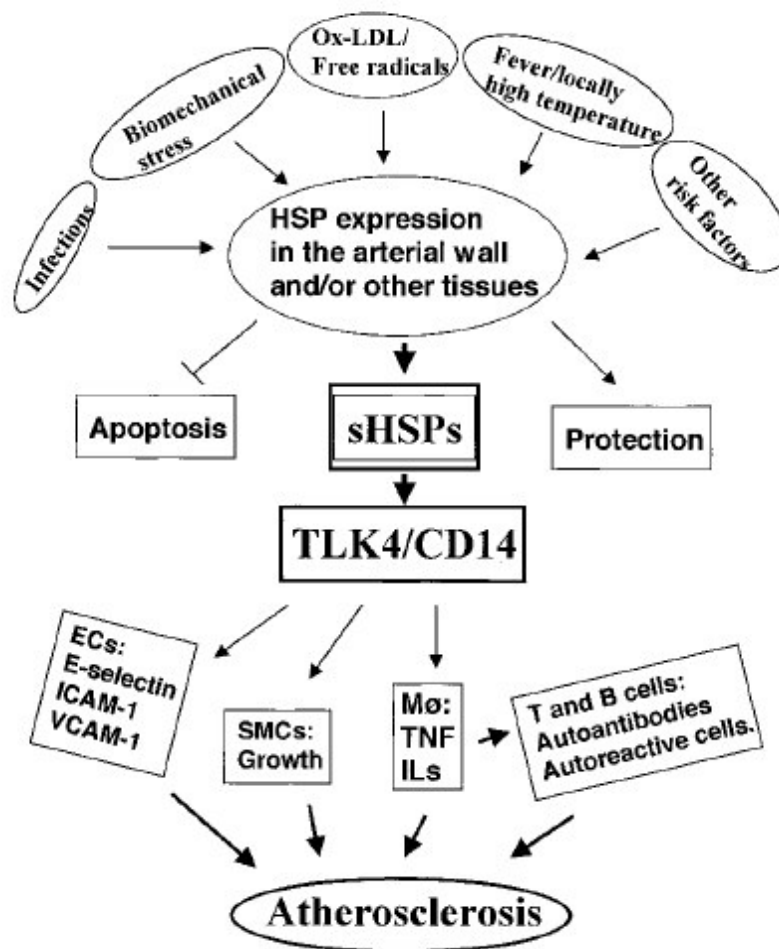


Figura 6. Posible implicación de la Hsp60 en la formación de aterosclerosis. (Adaptado de Xu 2002).

4.5.2. HSP y enfermedad renal crónica:

Hay muy pocos estudios que hayan evaluado la importancia de las proteínas Hsp en la progresión de la ERC. La primera investigación realizada *in vitro* mostró un incremento de la proteína Hsp72 en células de neuroblastoma tratadas con urea (Maddock, Westenfelder 1996). Sin embargo, en pacientes adultos con ERC, se encontró un descenso en la expresión de Hsp72 intramonocitaria. Este descenso fue interpretado como un empeoramiento en la capacidad de respuesta inmunológica en los pacientes con ERC (Marzec et al. 2009). El estudio realizado por Musial y cols. compara la concentración en suero de Hsp60, anti-Hsp60, Hsp70, anti-Hsp70 y Hsp90-alfa en niños con ERC respecto a sujetos sanos, observándose un descenso en la concentración sérica de Hsp60, que se correspondía con un incremento de los anticuerpos anti-Hsp60 en los niños con ERC. Sin embargo, los niveles de Hsp70 fueron similares al de los sujetos sanos, con niveles de anti-Hsp70 más bajos. Los autores consideran que existe un *feedback* entre las concentraciones de proteína Hsp y su anticuerpo, implicando el aumento del anticuerpo con una disminución en la concentración sérica de su proteína Hsp. Respecto a la

concentración de la Hsp90-alfa, encontraron un incremento en los pacientes con ERC, que se relaciona con un incremento del estrés oxidativo y de la inflamación (Musial et al. 2010).

4.5.3. HSP y hemodiálisis:

La mayoría de estudios que analizan el comportamiento de las proteínas Hsp en pacientes en diálisis tratan de evaluar la biocompatibilidad del sistema de diálisis. Un estudio realizado con pacientes en hemodiálisis, reveló un descenso en el ARN mensajero de Hsp72 en monocitos de pacientes en diálisis respecto a los controles (Marzec et al. 2009). Sin embargo, la expresión de Hsp72 fue similar en los macrófagos de dichos pacientes respecto a los controles. No obstante, los macrófagos respondían peor ante una subida de temperatura, incrementando la apoptosis (Reuter et al. 2009).

El estudio de Musial y cols. realizado en niños en hemodiálisis no mostró diferencias en la concentración sérica de Hsp70 y anti-Hsp70 respecto a los controles, aunque sí se observó un descenso en los niveles de Hsp60 acompañado de un incremento en la concentración de anticuerpos anti-Hsp60 en los pacientes en diálisis. La concentración sérica de Hsp90-alfa se encontró más elevada en los pacientes en diálisis que en los sujetos sanos (Musial et al. 2009).

En este mismo estudio se observó que el impacto de una única sesión de hemodiálisis con polisulfona aumentaba la concentración sérica de Hsp60 y Hsp90-alfa al finalizar la sesión, y descendía la concentración de anticuerpos anti-Hsp60 y anti-Hsp70. En este trabajo no se mostraron datos referentes a la Hsp70 (Musial et al. 2009). Acorde con este estudio, Raj et al encontraron un incremento de Hsp70 monocitaria al finalizar la sesión de hemodiálisis con polisulfona (Raj et al. 2007). En estos estudios, los incrementos de Hsp60 y Hsp70 al finalizar la sesión de hemodiálisis fueron atribuidos a la situación de estrés celular que constituye la sesión de hemodiálisis, al posible contacto de las células con endotoxinas y a las posibles reacciones de bioincompatibilidad que puede provocar el dializador. Existen diferentes posibilidades que podrían explicar el descenso en los niveles de anticuerpos anti-Hsp, como la absorción de estos por la membrana del dializador, la formación de complejos Hsp-anti-Hsp o el paso de los anticuerpos a la solución de diálisis. No obstante, es arriesgado interpretar estos resultados, con tan pocos estudios.

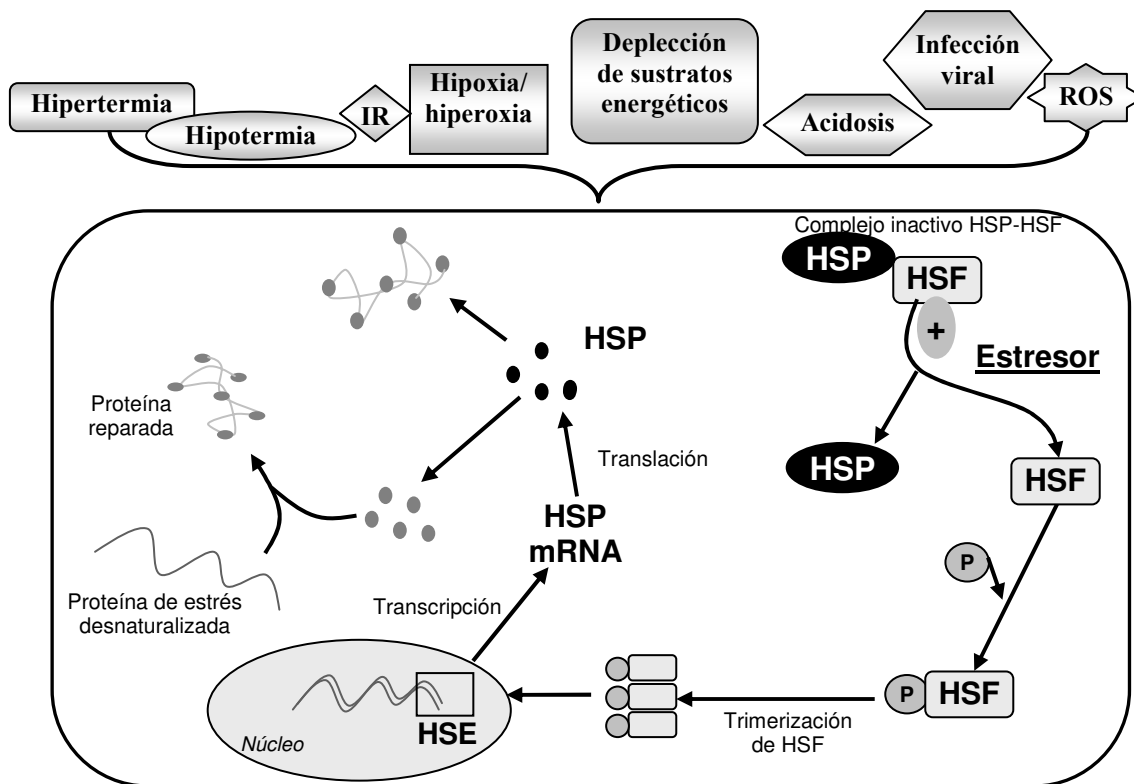


Figura 7.- Mecanismos de acción y regulación de las Hsp. (Adaptado de Kregel, 2002)

5. Marcadores de disfunción endotelial:

5.1. Estructura y función del endotelio:

Las paredes de los vasos sanguíneos están dispuestas formando tres capas concéntricas, íntima, media y adventicia (Figura 8). La íntima consta de una monocapa de células endoteliales llamada endotelio, con poco tejido conjuntivo subendotelial y en contacto directo con la luz del vaso, separada de la capa media por una densa membrana elástica denominada lámina elástica interna. La capa media está formada por varias capas de células musculares lisas inmersas en matriz extracelular y se separa de la adventicia por la lámina elástica externa. La adventicia, última capa del vaso, está constituida principalmente por fibroblastos, formando un tejido conjuntivo de revestimiento junto a fibras nerviosas y vasos sanguíneos.

La integridad estructural y funcional del endotelio es esencial para el mantenimiento de la homeostasia de la pared vascular y la función circulatoria. El endotelio vascular es un tejido multifuncional con numerosas propiedades metabólicas y de síntesis. Entre sus funciones se pueden citar el control del tono vascular, la regulación del paso de macromoléculas desde el torrente circulatorio hacia el espacio extravascular, la participación en el proceso de remodelación vascular, la modulación de la coagulación sanguínea, el metabolismo de las lipoproteínas, el control de las respuestas inflamatorias e inmunes y la regulación de la neovascularización.

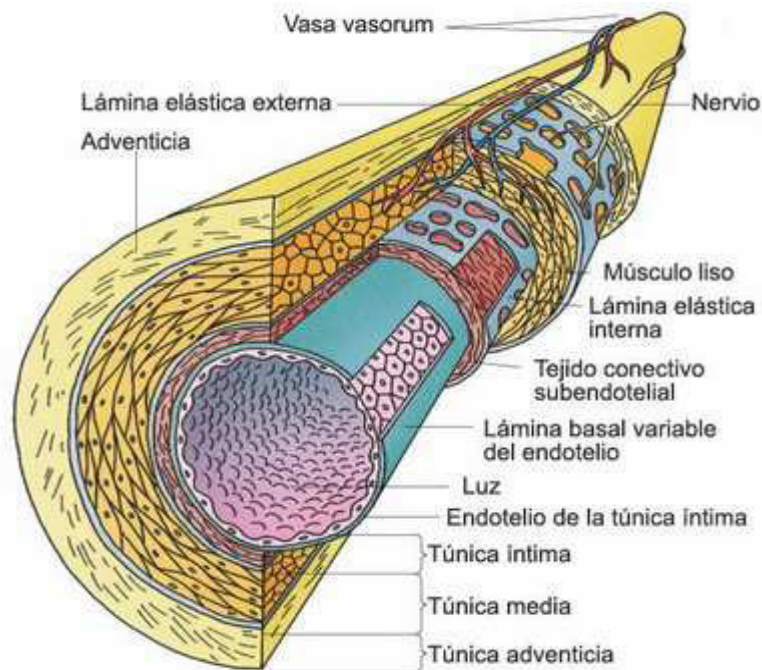


Figura 8. Estructura de un vaso. (Adaptado de Garcia, monografias.com)

La disfunción endotelial hace referencia a un estado de desequilibrio homeostático, en donde la respuesta del endotelio frente a un estímulo ambiental no es la adecuada. Los desencadenantes de la disfunción endotelial han sido y son todavía objeto de estudio en nuestros días, habiéndose propuesto, entre otros, la presencia de niveles anormales de citoquinas, productos bacterianos, compuestos lipídicos, proteínas anormales, radicales libres y fármacos, así como cambios en las propias fuerzas mecánicas intravasculares. Como consecuencia de la presencia de estos estímulos, se produciría un desequilibrio entre la síntesis o biodisponibilidad de factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) (Lopez-Ongil et al. 2002, Yang, Ming 2006) y vasoconstrictores como la endotelina-1 (ET-1) (Amiri et al. 2004, Hoher et al. 2004), con el subsiguiente desarrollo de cambios en la función endotelial. La síntesis de NO depende fundamentalmente de la óxido nítrico sintetasa (NOS), mientras que la síntesis de la ET-1 depende de la enzima convertora de endotelina-1 (ECE-1). La alteración de estos sistemas enzimáticos estaría por tanto relacionada con la disfunción endotelial.

5.2. Endotelina-1 (ET-1):

La ET-1 es un péptido de 21 aminoácidos. Es el vasoconstrictor más potente conocido hasta la fecha. Existen 3 isoformas de endotelina, la ET-1, la ET-2 y la ET-3, y todas contienen 2 puentes disulfuro esenciales. Se sintetizan inicialmente como prepro-polipéptidos de unos 200 aminoácidos que se codifican por distintos genes. Estos péptidos sufren una rotura proteolítica dando lugar a un pro-polipéptido inactivo de unos 40 aminoácidos llamado big-endotelina (big-

endotelina-1, 2 o 3). La big-endotelina-1 se rompe por acción específica de una metaloproteasa unida a la membrana llamada ECE-1, dando lugar a un péptido maduro y activo de 21 aminoácidos, la ET-1.

Se han caracterizado dos receptores para la ET, el receptor ET_A y el receptor ET_B. Ambos son estructural y funcionalmente distintos, pero comparten similitudes. Ambos son receptores típicos de 7 dominios transmembrana acoplados a través de la proteína G a la fosfolipasa C, y poseen un dominio N-terminal largo extracelular. El receptor ET_A tiene gran afinidad por la ET-1 y menos por la ET-2 y ET-3. El receptor ET_B tiene afinidad similar para las tres endotelinas. El receptor ET_A se encuentra en células musculares lisas y va a mediar el efecto vasoconstrictor típico de la ET, mientras que el receptor ET_B se localiza principalmente en células endoteliales y es responsable del efecto relajante al inducir la producción de NO.

Una inyección de ET-1 provoca un descenso inicial de la presión arterial seguida de un prolongado aumento de la presión arterial que dura entre 1 y 3 horas. Puesto que su respuesta es lenta pero duradera, parece que estos péptidos participan en los cambios a largo plazo y no en la respuesta aguda a un estímulo.

5.3. Enzima convertora de endotelina-1 (ECE-1):

La ECE-1 es una proteína ampliamente distribuida en distintos tejidos y especies, lo que sugiere que tiene un papel biológico importante. Hay estudios que han demostrado un papel relevante del sistema ET-1/ECE-1 en la aparición de disfunción endotelial y en procesos de remodelado vascular (D'Uscio et al. 2002). En 1997, Minamino y cols., demostraron que la ECE-1 estaba presente en las células musculares de la neointima de las arterias de rata lesionadas con balón y también en células musculares y macrófagos de lesiones ateroscleróticas humanas. Además, al inhibir la actividad de la ECE-1 con fosforamidón, disminuyeron los efectos adversos sobre la neointima de los vasos lesionados (Minamino et al. 1997).

En vasos coronarios humanos con diferentes estadios de aterosclerosis, se ha observado que las placas ateroscleróticas tempranas presentan un aumento en la expresión de ECE-1 predominantemente en células endoteliales localizadas en la luz del vaso y en células musculares de la íntima. En contraste, en placas con estadios más avanzados existe un mayor contenido de ECE-1 en macrófagos y en células endoteliales ubicadas dentro del ateroma, que en las células endoteliales de la íntima. El aumento de ECE-1 podría contribuir a la proliferación de células musculares y a generar vasoconstricción en estadios tempranos, promoviendo la desestabilización de la placa en estadios avanzados (Hai et al. 2004). La co-expresión de ECE-1 y ET-1 en las lesiones ateromatosas demuestra que un aumento en la expresión de ECE-1 se refleja en su actividad. Más importante aún, es que los ateromas que están en estado inflamatorio contienen más ET-1 que aquellos que no lo están. También se sabe que la ET-1

puede inducir liberación y expresión de factores quimiotácticos, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, jugando probablemente un papel relevante en el proceso de inflamación. Queda claro que una estimulación positiva del sistema ECE-1/ET-1 está estrechamente relacionada con la presencia de inflamación crónica y que este efecto aparece desde estadios muy tempranos cuando aún la lesión no es clínicamente perceptible (Ihling et al. 2001).

5.4. Óxido nítrico (NO):

El NO es una molécula con una semivida muy corta, capaz de difundir fácilmente a través de la membrana y reaccionar con muchas dianas. En solución acuosa se oxida formando nitritos y nitratos, que son productos estables.

De todas las funciones del NO, la más ampliamente descrita es su capacidad de regular el tono vascular, pero destacan otras, como su papel neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, su acción bactericida y citotóxica en la respuesta inmune e inflamatoria por parte de macrófagos y neutrófilos, su capacidad para regular el crecimiento y la muerte celular, así como la síntesis de matriz extracelular y sus efectos anticoagulantes.

El NO puede comportarse como un arma de doble filo. Por un lado es beneficioso como mensajero o modulador frente a la defensa de microorganismos, pero por otro, en concentraciones elevadas, es potencialmente tóxico. Esta toxicidad es debida fundamentalmente al hecho de que el NO se une con gran afinidad al anión superóxido formando peroxinitritos, que son aún más citotóxicos. Además, el NO puede unirse directamente a las tirosinas de algunas proteínas, nitrosilándolas e inactivándolas irreversiblemente. Niveles anormalmente elevados de NO están involucrados en la hipotensión asociada al shock séptico, en la reacción inflamatoria en respuesta al daño tisular, en la artritis o en enfermedades neurodegenerativas. Por el contrario, el NO está disminuido en enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, hipertensión o diabetes.

5.5. Enzima óxido nítrico sintetasa (NOS):

El NO es generado enzimáticamente por las NOS. Estas enzimas catalizan la reacción estequiométrica de oxidación del aminoácido L-Arginina a L-Citrulina, liberando una molécula de NO (Figura 9).

Las NOS pertenecen a la familia de las flavoproteínas, y se conocen al menos 3 isoformas distintas (Stuehr 1997, Andrew, Mayer 1999), la neuronal denominada nNOS o NOS-1, la inducible llamada iNOS o NOS-2 y la endotelial denominada eNOS o NOS-3.

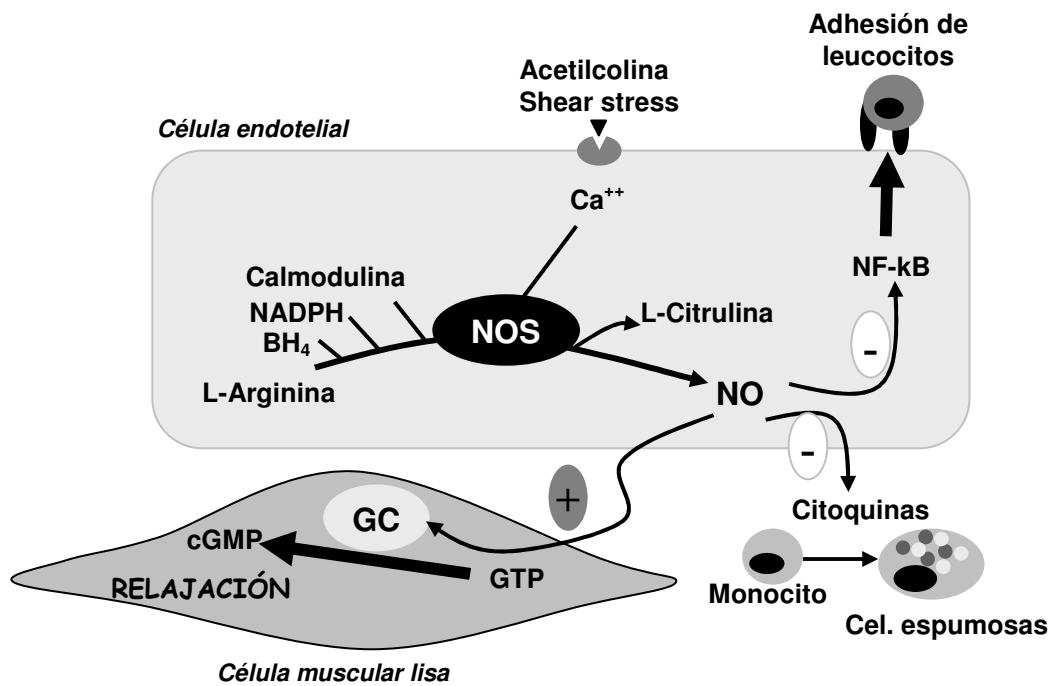


Figura 9.- Síntesis de óxido nítrico por la NOS

Las tres isoformas requieren una serie de cofactores para actuar, como dinucleótido de flavina adenina (FAD), riboflavina 5'-fosfato (FMN), grupo hemo, calmodulina y tetrahidrobiopterina (BH₄). Para sintetizar NO necesitan estar en forma de homodímero. Contienen 3 dominios importantes. El dominio reductasa, donde se une FAD y FMN, y es el que transfiere los electrones al dominio oxidasa. El dominio de unión a calmodulina, que responde a calcio, y es necesario para activar todas las isoformas. El dominio oxigenasa, encargado de catalizar la conversión de arginina a citrulina y NO, y es donde se unen el grupo hemo, la BH₄ y la arginina. Existe otro dominio que depende de cada isoforma y le confiere una localización específica, siendo la NOS3 y NOS1 isoformas unidas a la membrana, y la NOS2 una isoforma citosólica.

La NOS1 se expresa en el sistema nervioso central y periférico, y en músculo esquelético. El NO en cerebro actúa como neuromodulador y regula el comportamiento y la memoria. En el sistema nervioso periférico es un neurotransmisor controlando el músculo liso, la motilidad gastrointestinal y la función neuroendocrina. En el músculo esquelético regula el metabolismo y la contractilidad muscular. Es un enzima que se expresa constitutivamente, pero también puede ser regulado por estímulos fisiopatológicos, como *shear stress* y daño nervioso.

La NOS3 es también una isoforma constitutiva, pero puede regularse en respuesta al *shear stress*, ejercicio, hipoxia crónica o fallo cardíaco. Se expresa en células endoteliales y cardiomiocitos mayoritariamente, y regula fundamentalmente el flujo sanguíneo y la presión arterial, influyendo en la función del sistema cardiovascular.

Cuando la NOS1 y la NOS3 se activan, producen NO rápidamente, pero en poca cantidad, lo que genera un efecto protector en el sistema nervioso y cardiovascular, respectivamente. Así, en el proceso de inflamación o en la aterosclerosis, bajas concentraciones de NO previenen la muerte de células endoteliales por apoptosis, preservando la integridad de la monocapa endotelial. El NO producido también inhibe la agregación plaquetaria, la expresión de moléculas de adhesión y la proliferación de células musculares lisas. Cuando se reduce la producción de NO o su biodisponibilidad, surgen complicaciones relacionadas con la hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, etc.

La NOS2 es la isoforma inducible expresada mayoritariamente en macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios. De esta forma, el NO actúa como agente bactericida en la defensa frente a infecciones, participando en la respuesta inmune. Esta isoforma no depende de calcio para ser activa y produce NO lentamente pero en grandes cantidades. La sobreproducción de NO por NOS2 provoca el shock séptico causado por hiperestimulación de los macrófagos en respuesta a una infección bacteriana sanguínea y puede ser mortal. Además, el exceso de NO provoca una caída brusca de la presión arterial, alterando la función de varios órganos, y está implicado en patologías como el asma, artritis reumatoide o enfermedad de Crohn, entre otras.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Materiales:

1.1. Reactivos:

El reactivo de Ficoll fue obtenido de Comercial Rafer (Madrid, Spain). Las placas de cultivo, el sistema de detección SuperSignal, las películas de revelado MXB y el anticuerpo secundario *horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG* se adquirieron en Cultek (Pierce, Rockford, USA). La acrilamida-bisacrilamida fue de Hispanlab-Pronadisa (Madrid, Spain). Los marcadores de proteína, el kit para cuantificar proteínas, las cubetas y equipo de electroforesis se obtuvieron en Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Las pastillas conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas fueron de Roche Diagnostics (Madrid, Spain). El anticuerpo CD14-PE y CD16-FITC se adquirieron en Miltenyi Biotec (Madrid, Spain). El anticuerpo monoclonal anti-eNOS fue de BD Biosciences (Madrid, Spain). El resto de los reactivos como drogas, medios de cultivo y reactivos generales, a menos que se indique otro origen, fueron obtenidos en Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

1.2. Membranas de diálisis:

Las membranas de diálisis se clasifican según su estructura como derivadas de la celulosa o sintéticas. En los diferentes estudios que integran este trabajo se comparó el efecto pro-inflamatorio de diferentes membranas de diálisis que se utilizan de forma habitual en la práctica clínica.

Para evaluar el efecto de las membranas de diálisis sobre la funcionalidad endotelial (Objetivo 1), se utilizaron dos membranas sintéticas, una polisulfona estándar y una polisulfona modificada, denominada polietersulfona. En química, la palabra polisulfona define un grupo de polímeros que contienen grupos sulfona y grupos alquilo o arilo. Por convención, los polímeros de dicha naturaleza que contienen además grupos isopropilideno se denominan también polisulfonas. Las polisulfonas que no contienen grupos isopropilideno reciben el nombre de polietersulfonas. En los periodos de lavado entre la utilización de estas 2 membranas en estudio, los pacientes recibieron tratamiento con una polisulfona de baja permeabilidad. En la tabla 6 se especifican las características de las membranas de diálisis utilizadas en la primera parte del estudio.

Tabla 6. Características de las membranas (Objetivo 1).

Dializador	Membrana	Polímero de la membrana	Superficie (m ²)	CUF (ml/h-mmHg)	Casa comercial
Pureflux 190H	Purema	Polietersulfona	1,90	75	Nipro
HF80	Polisulfona	Polisulfona	1,89	55	Fresenius
F8	Polisulfona	Polisulfona	1,80	11	Fresenius
CUF: Coeficiente de ultrafiltración.					

En la segunda parte de este trabajo se evaluó el efecto de diferentes membranas de diálisis sobre la activación monocitaria (Objetivo 2). Inicialmente se realizó un estudio piloto (Objetivo 2.1). en el que se comparó el efecto de una membrana de celulosa modificada (triacetato de celulosa) con el efecto de una nueva membrana sintética de alta permeabilidad (polinefrona). El triacetato de celulosa presenta una estructura superficial uniforme y de gran porosidad, siendo la única membrana celulósica que se puede utilizar en la diálisis de alto flujo. La polinefrona es una membrana de polietersulfona modificada con una estructura ondulada de sus fibras que facilita un flujo más homogéneo del líquido de diálisis. Está compuesta por una mezcla equilibrada de fibra hidrofóbica e hidrofílica, lo que reduce la formación de residuos, con un tamaño en los poros que permite un alto aclaramiento de moléculas de mediano tamaño, evitando al mismo tiempo la pérdida de albúmina. También es una membrana libre en su composición de bisfenol A, una molécula que sí forma parte de la estructura de la polisulfona, y que, según estudios recientes, podría provocar determinadas alteraciones metabólicas (Lang et al. 2008, Vom Saal, Myers 2008). Las características de los dializadores utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de membranas (Objetivo2.1).

Dializador	Membrana	Polímero de la membrana	Superficie (m ²)	CUF (ml/h-mmHg)	Casa comercial
Fb210U	Triacetato de celulosa	Triacetato de celulosa	2,10	41,7	Nipro
ELISIO 210H	Polinefrona	Polietersulfona	2,10	82	Nipro
CUF: Coeficiente de ultrafiltración.					

El último estudio (Objetivo 2.2) comparó el efecto sobre la activación monocitaria de diferentes membranas sintéticas de alta permeabilidad. En este estudio se evaluó el efecto de 2 membranas de referencia en la actualidad, como son la helixona y la poliamida, con la polinefrona. El polímero que constituye la helixona es el mismo que el de la polisulfona

estándar, pero el espesor de la membrana y el diámetro interno de la fibra son menores, con un aumento en el tamaño de los poros, que se distribuyen de un modo más uniforme. La membrana de polyamix está compuesta por una mezcla de poliamida con poliariletersulfona y polivinilpirrolidona. La mezcla entre una copoliamida aromática–alifática e hidrofóbica y una polivinilpirrolidona hidrofílica genera una estructura de microdominios con regiones alternas de carga positiva y negativa sobre la superficie, lo que le confiere una mayor biocompatibilidad. El tamaño de los poros en esta membrana aumenta considerablemente desde el lado en contacto con la sangre hasta el lado del dializado. Las características de estas membranas se reflejan en la Tabla 8.

Tabla 8. Características de membranas (Objetivo 2.2).					
Dializador	Membrana	Polímero de la membrana	Superficie (m²)	CUF (ml/h-mmHg)	Casa comercial
FX100	Helixona	Polisulfona	2,20	73	Fresenius
Poliflux 210H	Polyamix	Poliamida ¹	2,10	83	Gambro
ELISIO 210H	Polinefrona	Polietersulfona	2,10	82	Nipro

¹Poliamida mezclada con poliariletersulfona y polivinilpirrolidona. CUF: Coeficiente de ultrafiltración.

2. Diseño del estudio:

2.1. Criterios de inclusión:

Todos los pacientes incluidos en los estudios debían cumplir las siguientes condiciones:

- Padecer ERC con necesidad de tratamiento con hemodiálisis.
- Recibir tratamiento con hemodiálisis durante al menos 4 meses, con una duración de la sesión de hemodiálisis de 240±20 minutos.
- Ser mayor de edad.
- Ausencia de enfermedad grave intercurrente con esperanza de vida menor de un año.
- En las mujeres, ausencia de embarazo.
- Haber cumplimentado el consentimiento informado.

2.2. Diseño por estudios:

- **Comparación del efecto de dos membranas sintéticas de alta permeabilidad, polietersulfona y polisulfona sobre la funcionalidad endotelial.**

Para comparar el efecto de polietersulfona (PES) con polisulfona (PS), (ver Tabla 6), se realizó un estudio piloto de intervención con diseño antes-después en el que se incluyeron 10 pacientes. Cada paciente fue control de sí mismo y fue dializado durante 2 semanas con cada una de las dos membranas en estudio, realizándose un periodo de lavado de otras 2 semanas con una membrana de polisulfona de bajo flujo (PS bajo flujo), según la descripción del esquema inferior (Figura 8). Para evaluar el efecto agudo de una única sesión de hemodiálisis con las membranas en estudio se realizó extracción de analítica en sangre al inicio (pre-HD) y al final (post-HD) de la sesión de hemodiálisis con cada membrana en estudio. Para evaluar el efecto de 15 días de tratamiento se realizó extracción de sangre pre-HD el primer día en que se utilizó el dializador en estudio y tras 15 días de tratamiento.

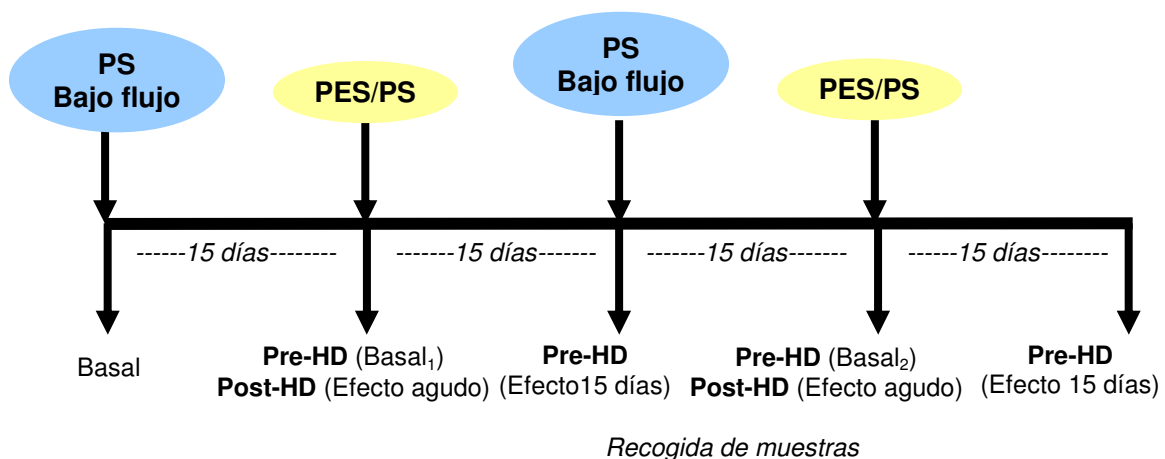


Figura 8. Estudio piloto con diseño antes-después (n=10), (Objetivo 1.1).

Para comparar el efecto de polietersulfona con polisulfona, (ver Tabla 6), sobre la funcionalidad endotelial, se realizó posteriormente un estudio prospectivo multicéntrico cuasi-experimental en el que fueron incluidos 30 pacientes. Se trata de un estudio de intervención cuasi-experimental, porque se formaron dos grupos de tratamiento, en cada uno de los cuales se estudió el efecto de una de las dos membranas en estudio, pero no fue posible realizar un proceso de randomización. Los dializadores fueron asignados a los pacientes según la disponibilidad del centro de tratamiento. De este modo, se constituyeron dos grupos, el grupo en el que se evaluó el efecto de polietersulfona, con 19 pacientes, y el grupo en el que se evaluó el efecto de polisulfona, con 11 pacientes. Para evaluar el efecto agudo de una única sesión de hemodiálisis con las membranas en estudio, se realizó una extracción de sangre al inicio (pre-

HD) y al final (post-HD) de la sesión de hemodiálisis el primer día en que se utilizó cada membrana en estudio. Para evaluar el efecto crónico de 3 meses, se realizó extracción de sangre pre-HD el primer día de utilización de la membrana en estudio, y tras 3 meses de tratamiento, según el esquema de la Figura 9.



Figura 9. Estudio prospectivo multicéntrico (n=30), (Objetivo 1.2).

• **Comparación del efecto de la polinefrona con respecto a otros dializadores sobre la activación monocitaria.**

Se realizó un estudio piloto con 9 pacientes para comparar el efecto de la polinefrona (PN) respecto al triacetato de celulosa (TC), (ver Tabla 7). El diseño del estudio fue de intervención antes-después, siendo cada paciente control de sí mismo. Los pacientes incluidos en el estudio recibían tratamiento con TC desde hacía al menos 4 meses. Este dializador fue sustituido por PN durante otros 4 meses. Para evaluar el efecto agudo de una sesión de hemodiálisis con cada uno de los dos dializadores sobre la activación monocitaria se realizó una extracción sanguínea pre y post-HD. Para evaluar el efecto crónico de 4 meses de tratamiento con cada dializador en estudio se realizaron dos analíticas pre-HD con una diferencia de una semana tras 4 meses de tratamiento con cada dializador. Se hizo una media de los dos resultados obtenidos pre-HD sobre los parámetros de activación monocitaria para asegurar la reproducibilidad de los resultados. El diseño del estudio se detalla en el esquema de la Figura 10.

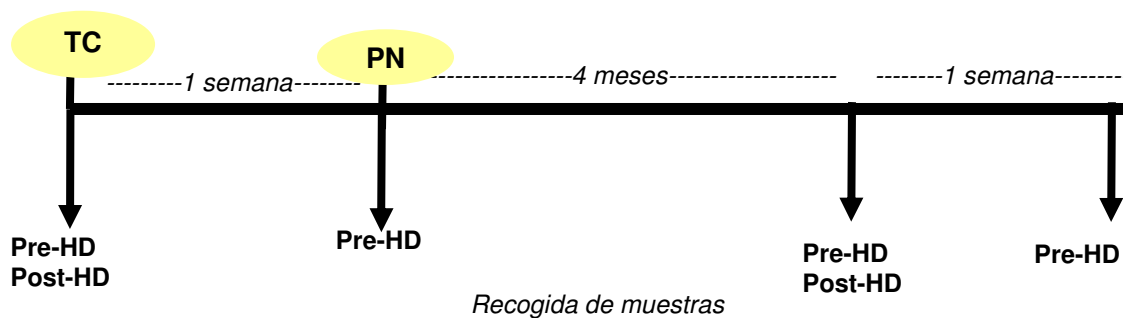


Figura 10. Estudio piloto con diseño antes-después (n=9), (Objetivo 2.1).

Para comparar el efecto de polinefrona (PN) respecto a dos membranas de referencia en la actualidad: helixona (HL) y poliamida (PL) (Tabla 8), se realizó un estudio experimental tipo ensayo clínico con grupo control. En el estudio se incluyeron 47 pacientes, 9 de los cuales formaron el grupo control con un ratio para la aleatorización control-intervención de 1:4. Todos los pacientes recibían al menos desde hacía 4 meses tratamiento con helixona ó poliamida. Nueve pacientes (grupo control), mantuvieron el tratamiento con el mismo dializador. En los restantes 38 pacientes se sustituyó el dializador por polinefrona durante otros 4 meses.

Para evaluar el efecto agudo de una sesión de hemodiálisis con los distintos dializadores sobre la activación monocitaria se realizó una extracción sanguínea pre-HD y post-HD. Para evaluar el efecto crónico de 4 meses de tratamiento se realizaron dos analíticas pre-HD con una diferencia de una semana tras 4 meses de tratamiento con cada dializador. Se hizo una media de los dos resultados obtenidos pre-HD sobre los parámetros de activación monocitaria para asegurar la reproducibilidad de los resultados. El diseño de este último estudio se detalla en el esquema de la Figura 11.

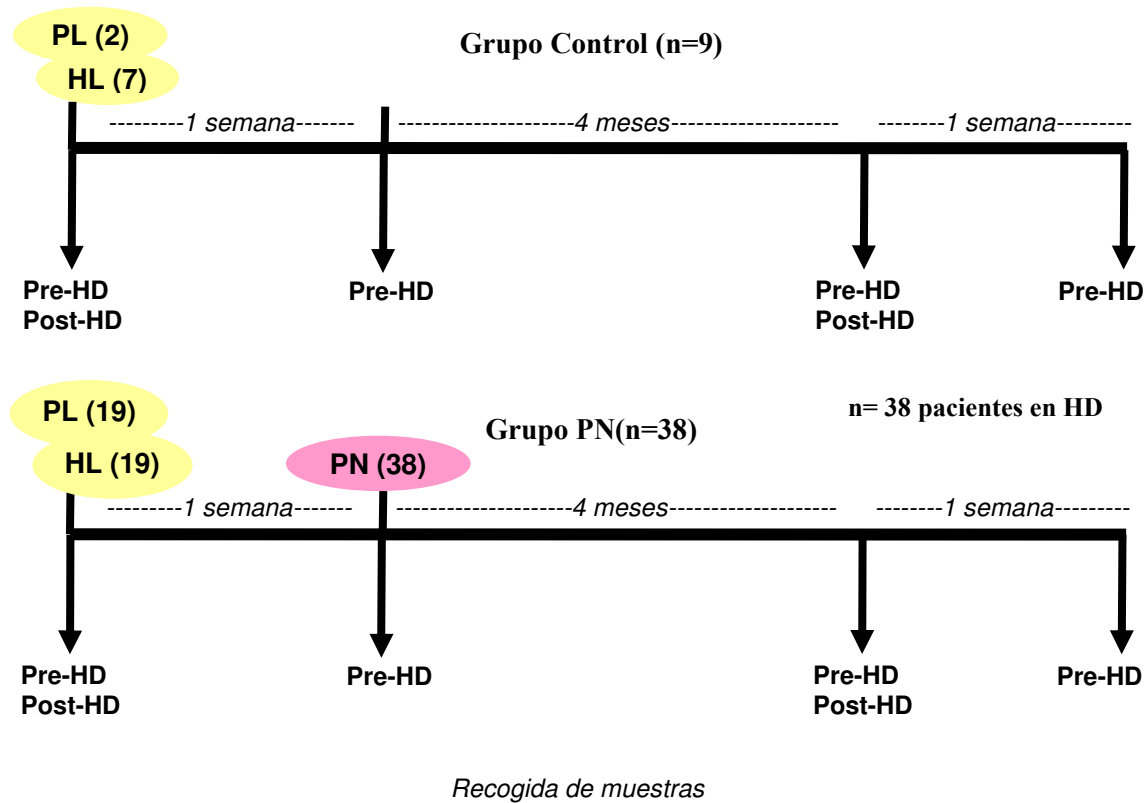


Figura 11. Estudio multicéntrico controlado y aleatorizado (n=47), (Objetivo 2.2).

2.3. Recogida de muestras:

Las muestras de sangre extraídas antes y después de hemodiálisis se utilizaron para determinar diferentes parámetros bioquímicos y hematológicos, y para aislar los monocitos. El análisis bioquímico fue necesario para poder calcular la tasa de reducción de pequeñas y medianas moléculas (urea, creatinina y β_2 -microglobulina), con cada uno de los dializadores en estudio.

En los estudios correspondientes al Objetivo 1, los monocitos se extrajeron de la sangre total por separación en gradiente utilizando Ficoll y se realizó un cocultivo de 1 millón de monocitos con las células endoteliales en cultivo durante 24h. Transcurrido ese tiempo, se recogió el sobrenadante celular para cuantificar la toxicidad celular, y las células para evaluar: por un lado, la adhesión de monocitos al endotelio por citometría de flujo, y por otro, la expresión de proteínas (ECE-1 y eNOS) en dichas células endoteliales, por técnicas de Western blot.

En los estudios correspondientes al Objetivo 2, una porción de sangre se utilizó directamente para cuantificar monocitos activados (subpoblación $CD14^+CD16^+$) por citometría de flujo, y el resto de la sangre total se utilizó para extraer los monocitos por separación en gradiente utilizando Ficoll. En estos monocitos se cuantificó la producción de radicales mediante una sonda dihidro-dicloro-fluoresceína por citometría de flujo, y la expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp90 mediante la técnica de Western blot.

Durante todo el seguimiento también se extrajeron muestras para analizar el líquido de diálisis, confirmándose los niveles de endotoxinas ($<0,025$ unidades), aconsejados por las guías para la realización de diálisis de alto flujo.

3. Métodos:

3.1. Cultivo de células:

Las células endoteliales humanas procedieron de una línea de endotelio humano, EA.hy926, obtenida en American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Las células crecieron en el medio Dulbecco's Modified Eagle Media, suplementado con 4.5 g/L de glucosa, 10% de suero de ternera fetal, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina, a 37°C, en una atmósfera con CO_2 al 5%. Los experimentos se realizaron rutinariamente en células confluentes en monocapa.

3.2. Aislamiento de monocitos y cocultivo con células endoteliales:

Los monocitos fueron obtenidos por aislamiento de la sangre total mediante centrifugación diferencial en gradiente utilizando el reactivo Ficoll (Fuss et al. 2009). Para ello, la sangre fue diluida 1:2 con buffer salino fosfato (PBS) (139 mM NaCl, 8.66 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM

NaH_2PO_4 , pH 7) y después fue añadida lentamente sobre el reactivo Ficoll en un tubo cónico. Las muestras se centrifugaron primero a 600 g durante 45 minutos, sin freno. La capa blanquecina y algodonosa que contenía los monocitos fue recogida cuidadosamente en otro tubo al que se añadió PBS para lavar del exceso de Ficoll (Figura 12). Las muestras se centrifugaron una segunda vez a 800 g durante 15 minutos, para obtener un precipitado de células, que se recogieron en una cantidad conocida de PBS para ser cuantificadas en una cámara de Neubauer.

Tras cuantificar el número de monocitos de cada muestra se procedió a coincubar un millón de monocitos con células endoteliales confluentes crecidas en pocillos, por duplicado, durante 24h. Al finalizar la incubación, se recogieron los sobrenadantes de las células para ensayar la toxicidad celular. Las células se lavaron 2 veces con PBS para extraer proteínas de un pocillo y ensayar la adhesión de monocitos al endotelio por citometría de flujo del otro pocillo duplicado.

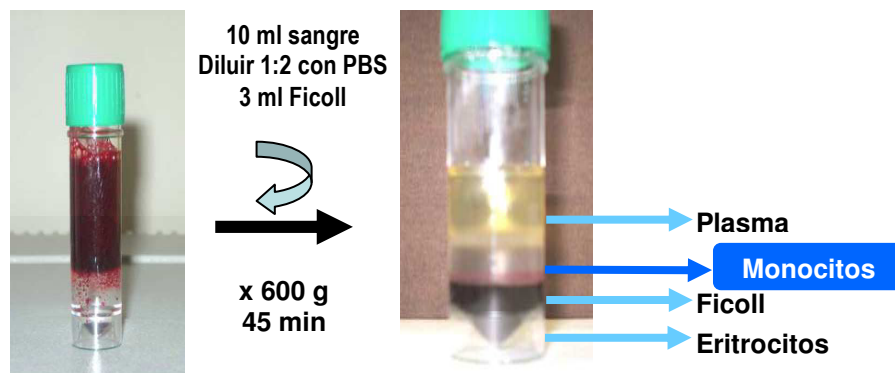


Figura 12. Aislamiento de monocitos de sangre total.

3.3. Adhesión de monocitos a células endoteliales:

Las células endoteliales confluentes fueron incubadas con 1 millón de monocitos de cada paciente. Tras 24 h de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se recogieron para ensayar la adhesión de monocitos al endotelio por citometría de flujo. Estas células se incubaron por duplicado con un anticuerpo específico anti-CD14 conjugado con ficoeritrina (CD14-PE), que reconoce específicamente monocitos, durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. El control negativo se hizo con células incubadas en las mismas condiciones con el mismo isotipo de CD14-PE, un anticuerpo IgG2a-PE. Transcurrido este tiempo, las células endoteliales fueron centrifugadas a 1500 rpm para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, y se resuspendieron en 500 μl PBS para ser adquiridas en el citómetro de flujo (FC 500, Beckman Coulter, CA, USA). La cantidad de monocitos adheridos a dichas células endoteliales fue determinada como CD14-PE^+ .

3.4. Toxicidad celular:

La toxicidad celular fue evaluada en todas las condiciones experimentales mediante el método de exclusión del azul trypan y por la cuantificación de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo, tras recoger el sobrenadante procedente del cocultivo de las células endoteliales con el millón de monocitos de cada paciente.

3.5. Expresión de proteínas por Western blot:

Las proteínas totales fueron aisladas o bien de células endoteliales que habían sido incubadas previamente 24 h con 1 millón de monocitos, o bien de una parte de los monocitos que habían sido aislados con el Ficoll. En ambos casos, se utilizó un Buffer de lisis que contenía: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1 % deoxicolato sódico, 1 % Triton X-100, 10 mM pirofosfato sódico, conteniendo un cocktail con inhibidores de proteasas. La concentración proteica se determinó con un ensayo de BioRad. Las proteínas (30 µg) fueron separadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 6% SDS-PAGE en condiciones reductoras, y después transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente con 5 % de leche en polvo desnatada diluida en Tris buffer con Tween 20 (TBST) (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9 % NaCl, 0.05 % Tween 20). Tras la incubación las membranas se lavaron 3 veces con TBST durante 5 minutos, después se incubaron con los anticuerpos primarios según la proteína a estudiar: anti-ECE-1 (mAb AEC32-236, 10 µg/mL, 90 min, anticuerpo proporcionado por el Dr. Kohei Shimada, Biological Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd. Tokyo, Japan), anti-eNOS (dilución 1:3000, 1h), en el caso de las proteínas extraídas de las células endoteliales; ó anti-Hsp70/90 (dilución 1:750, 5%BSA, toda la noche a 4°C) para las proteínas que habían sido extraídas de los monocitos directamente. Las membranas volvieron a ser lavadas 3 veces con TBST, y finalmente se incubaron con un anticuerpo secundario *anti-mouse IgG* (dilución 1:50.000, 1h) para ECE-1 y eNOS (Martinez-Miguel et al. 2013), o anticuerpo *anti-rabbit* (dilución 1:10000, 1h) para Hsp70/90. Las bandas de proteínas se visualizaron con el sistema de detección SuperSignal tras 30-60 segundos de exposición a una película MXB. Todas las membranas fueron rehibridadas con otro anticuerpo anti-Actina para normalizar la carga de proteína y corregir los niveles de ECE-1, eNOS, Hsp70 y Hsp90.

3.6. Producción de ROS:

Una porción de los monocitos aislados de sangre total se incubó 30 minutos a 37°C con la sonda dihidro-dicloro-fluoresceína en su forma reducida. Durante este tiempo de incubación, los radicales libres oxidaron la sonda, dando otro producto fluoresceína oxidado que emite una fluorescencia detectable por citometría de flujo, siendo su cantidad directamente proporcional a la cantidad de ROS presentes en los monocitos.

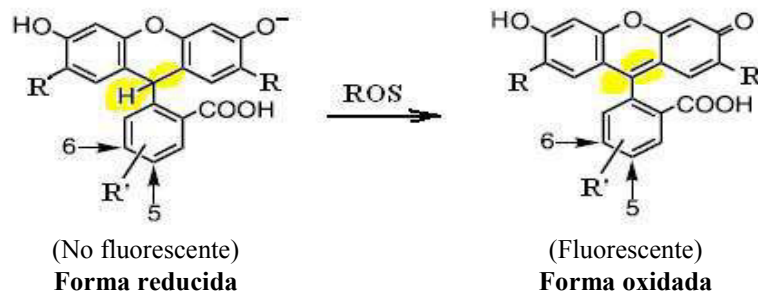


Figura 13. Oxidación de la sonda dihidro-dicloro-fluoresceína por las ROS.

3.7. Cuantificación del porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺:

Para evaluar la expresión de CD14 y CD16 en monocitos, se marcaron 100 μl de sangre total con 4 μl del anticuerpo CD14 marcado en rojo con ficoeritrina (PE), y con 4 μl de CD16 marcado en verde con fluoresceína isocianato (FITC). La reacción fue incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación. Cada muestra fue procesada por triplicado, añadiendo además, un control negativo que se realizó con sangre y los isotipos del CD14-PE y CD16-FITC, que eran IgG2a-PE y IgM-FITC. Tras la incubación, se procedió a romper los glóbulos rojos añadiendo un buffer de lisis (1x BD FACS Lysing solution de Becton Dickinson, CA, USA) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células marcadas se lavaron 3 veces con PBS, centrifugando 5 minutos a 1500 rpm cada vez, para eliminar restos de anticuerpos no unidos a las células. Por último, las células se recogieron en 500 μl de PBS conteniendo un 3% de formaldehído. De este modo, se fijaron para poder ser adquiridas en el citómetro FACScan (FC 500, Beckman Coulter, CA, USA). La cantidad de monocitos activados en sangre total de cada paciente fue determinada como CD14⁺CD16⁺, después de restarle el fondo de fluorescencia de sus negativos.

4. Análisis estadístico:

Para analizar los resultados fue necesario emplear técnicas de estadística descriptiva con el fin de determinar las características de los pacientes incluidos en los distintos estudios. Para describir las variables categóricas se utilizó la frecuencia absoluta y el porcentaje (%). Para describir las variables cuantitativas se utilizó la media como medida de tendencia central en los casos de distribución normal y la mediana si se trataba de una distribución no normal. Las medidas de dispersión utilizadas fueron la desviación estándar en los casos de distribución normal y el rango intercuartílico en los casos de distribución no normal. Independientemente de si la variable presentaba una distribución normal o no, los resultados en los gráficos de barras se mostraron siempre con la media y el error estándar de la media. Para evaluar la condición de normalidad se utilizaron pruebas de normalidad o de bondad de ajuste (prueba de Kolmogorov-

Smirnov para muestras de mayor tamaño ($n > 30$) y la prueba de Shapiro-Wilk para muestras pequeñas ($n < 30$).

Para relacionar las variables fue necesario emplear diferentes test estadísticos. En el análisis univariante de 2 variables cualitativas se utilizaron tablas de contingencia. Para muestras pequeñas o que no cumplieran la condición de normalidad se utilizaron test estadísticos no paramétricos y para muestras con $n > 30$ que cumplieran la condición de normalidad test de estadística paramétrica. De este modo, los test no paramétricos utilizados fueron el test de Wilcoxon para comparar 2 muestras relacionadas y el test de Friedman para comparar más de 2 muestras relacionadas. Los test de estadística paramétrica empleados fueron la T de Student para muestras relacionadas y el análisis de la varianza. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si la $p < 0,05$. El programa informático con el que se hicieron los cálculos fue el SPSS versión 1.8.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis:

Durante el tratamiento con hemodiálisis, la membrana de diálisis tiene un contacto directo con la sangre de los pacientes, lo que puede provocar una respuesta inflamatoria como consecuencia de la interacción de la sangre y sus elementos celulares con la membrana de diálisis, que a su vez podría tener consecuencias sobre la aceleración de la aterosclerosis y la patología cardiovascular de estos pacientes. La utilización de diferentes membranas de diálisis podría provocar una respuesta diferente en los pacientes, pudiendo tener alguna de estas membranas un mejor perfil desde el punto de vista de la activación monocitaria, y las consecuencias de esta activación sobre la funcionalidad endotelial.

2. Objetivos general:

Analizar diferentes aspectos de la interacción células circulantes-endotelio, en pacientes en programa de hemodiálisis crónica, en función de las características de las membranas de diálisis utilizadas.

3. Objetivos específicos:

3.1. Comparar el efecto de dos membranas sintéticas de alta permeabilidad, la polietersulfona y la polisulfona estándar, sobre la funcionalidad endotelial, evaluando:

3.1.1. La adhesión de monocitos de pacientes en hemodiálisis sobre células endoteliales en cultivo.

3.1.2. La toxicidad celular inducida por los monocitos de pacientes en hemodiálisis sobre células endoteliales en cultivo.

3.1.3. La expresión de factores vasoactivos endoteliales, óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y enzima conversora de endotelina (ECE-1), en células endoteliales expuestas a monocitos de pacientes en hemodiálisis.

3.2. Comparar el efecto de una membrana de alta permeabilidad sintética, la polinefrona, respecto a otras membranas, como el triacetato de celulosa, la polisulfona y la poliamida, sobre la activación monocitaria, evaluando:

3.2.1. El porcentaje de monocitos activados (CD14⁺CD16⁺) de pacientes en hemodiálisis.

3.2.2. La producción de radicales libres (ROS) por los monocitos de pacientes en hemodiálisis.

3.2.3. La expresión de proteínas de shock térmico (Hsp70 y Hsp90) en los monocitos aislados de pacientes en hemodiálisis.

RESULTADOS

RESULTADOS

Objetivo 1.- Comparación de los efectos de la polietersulfona y de la polisulfona sobre la funcionalidad endotelial.

1.1. Estudio piloto cuasi experimental (antes-después):

Para evaluar el efecto de los dos dializadores sobre la funcionalidad endotelial se realizó un estudio piloto en 10 pacientes, cuyas características demográficas se describen en la Tabla 9. La etiología de la insuficiencia renal de los pacientes incluidos se muestra en la Figura 14, la comorbilidad asociada en la Figura 15, y los dializadores con los que se estaban tratando los pacientes antes de iniciar el estudio en la Figura 16.

Tabla 9. Características demográficas de los pacientes.

N° de pacientes		10
Sexo	Masculino n (%)	5 (50 %)
	Femenino n (%)	5 (50 %)
Edad (años)	Mediana (r.i.)	64,5 (25,7)
T en diálisis (meses)	Mediana (r.i.)	18,5 (13)

T en diálisis: tiempo de tratamiento en diálisis. Los datos se expresan como número absoluto (n), porcentaje (%), mediana y rango intercuartílico (r.i.).

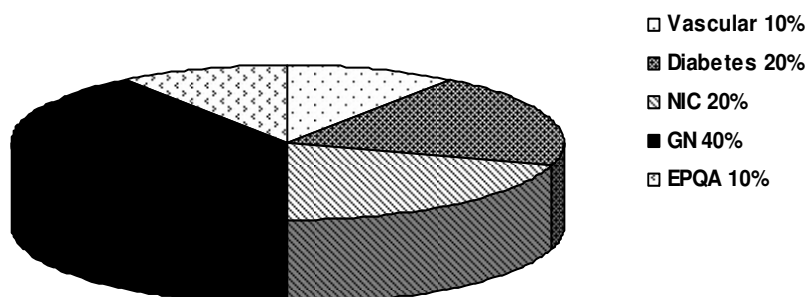


Figura 14. Etiología de la insuficiencia renal. NIC: nefropatía intersticial crónica; GN: glomerulonefritis; EPQA: enfermedad poliquística del adulto. La etiología de la insuficiencia renal se expresa en porcentaje (%).

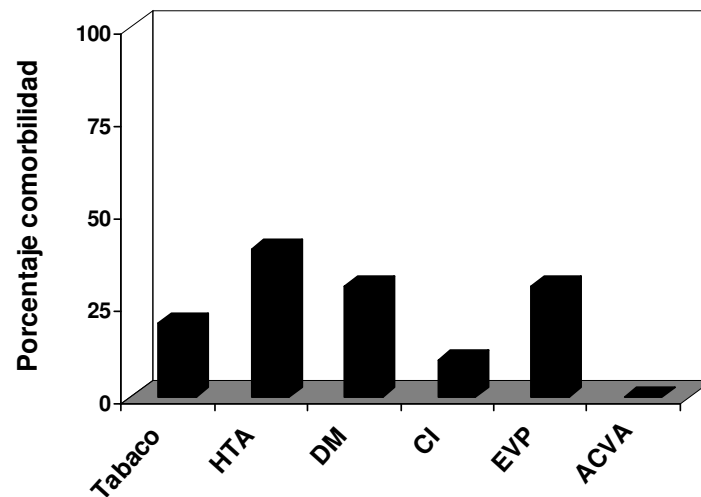


Figura 15. Comorbilidad asociada. HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; CI: cardiopatía isquémica; EVP: enfermedad vascular periférica; ACVA: accidente cerebrovascular. La comorbilidad se expresa en porcentaje (%).

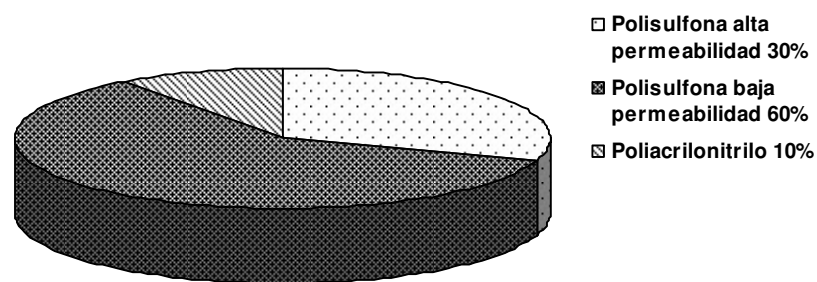


Figura 16. Dializadores de los pacientes antes del inicio del estudio. Los diferentes dializadores con los que estaban siendo tratados los pacientes antes de iniciar el estudio se expresan en porcentaje (%).

La etiología más frecuente de insuficiencia renal en este grupo de pacientes fue la glomerulonefritis, siendo la hipertensión (HTA) la comorbilidad más habitualmente asociada. El dializador previo antes del inicio del estudio utilizado con más frecuencia fue la polisulfona de baja permeabilidad.

1.1.1. Evaluación del efecto agudo de una sesión de hemodiálisis:

El efecto de una única sesión de hemodiálisis con las diferentes membranas en estudio se recoge en la Tabla 10. No hubo diferencias significativas en la adhesión de los monocitos de los pacientes a células endoteliales en cocultivo antes y después de la sesión de hemodiálisis con polietersulfona y con polisulfona. Tampoco hubo diferencias en la toxicidad producida por estos monocitos sobre las células endoteliales, ni en la expresión de factores vasoactivos, eNOS y ECE-1, en las células endoteliales cultivadas con los monocitos de los pacientes dializados con las dos membranas estudiadas.

Tabla 10. Efecto agudo de una sesión de hemodiálisis con polietersulfona y con polisulfona sobre la funcionalidad endotelial.

	Polietersulfona		p
	Pre-HD	Post-HD	
Adhesión MC a CE (%)	4,4 (4,03)	3,06 (2,3)	ns
Toxicidad, LDH (u.i./L)	384 (362)	495 (331)	ns
Expresión eNOS (U.D.)	0,55 (0,54)	0,6 (0,51)	ns
Expresión ECE-1 (U.D.)	0,64 (0,63)	0,51 (0,47)	ns

	Polisulfona		p
	Pre-HD	Post-HD	
Adhesión MC a CE (%)	1,6 (1,23)	1,2 (0,83)	ns
Toxicidad, LDH (u.i./L)	121 (41)	125 (66)	ns
Expresión eNOS (U.D.)	0,78 (0,68)	0,63 (0,46)	ns
Expresión ECE-1 (U.D.)	0,44 (0,44)	0,43 (0,53)	ns

MC: monocitos; CE: células endoteliales; pre-HD: pre-hemodiálisis; post-HD: post-hemodiálisis; LDH: lactato deshidrogenasa; u.i.: unidades internacionales; eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial; ECE-1: enzima convertora de endotelina-1; U.D.: unidades densitométricas. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico.

1.1.2. Evaluación del efecto de 15 días de hemodiálisis:

Tras 15 días de tratamiento con polietersulfona, se observó una disminución en la adhesión de los monocitos a las células endoteliales en cultivo (Figura 17A), así como una disminución en la toxicidad de las células endoteliales en cocultivo (Figura 17B), producida por los monocitos de los pacientes en hemodiálisis, respecto a las condiciones basales, y al tratamiento de 15 días con polisulfona. No se observaron diferencias en la expresión de eNOS en células endoteliales en cocultivo con monocitos de pacientes en tratamiento con el dializador basal, con polietersulfona o con polisulfona (Figura 17C). Sin embargo, si se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de ECE-1 en células endoteliales en cocultivo con monocitos de pacientes tratados 15 días con polietersulfona, respecto a los tratados con su dializador habitual o con polisulfona (Figura 17D).

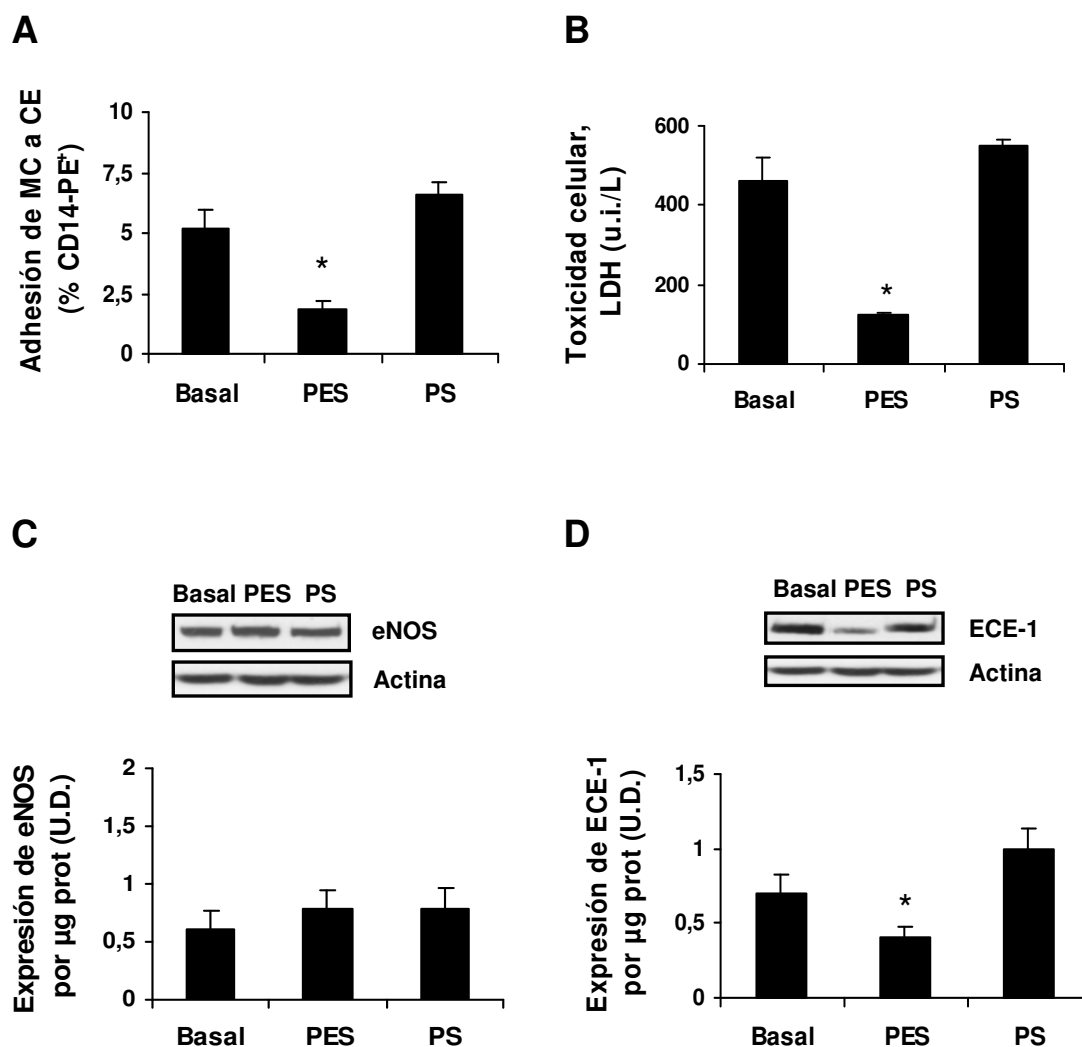


Figura 17. Efecto de 15 días de diálisis con polietersulfona (PES) y con polisulfona (PS) respecto a la situación basal. Los monocitos (MC) fueron aislados de sangre total de cada paciente antes y después de la sesión de hemodiálisis. Entonces, 1 millón de MC se incubaron durante 24 h con células endoteliales humanas (CE) en cultivo. **A)** Adhesión de MC a CE midiendo porcentaje de CE-CD14⁺ por citometría de flujo. **B)** Toxicidad celular expresada como LDH liberada al medio de cultivo. **C, D)** Tras el cocultivo de MC con CE, se extrajeron las proteínas de CE para analizar la expresión proteica de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) (**C**) y de la enzima convertora de endotelina-1 (ECE-1) (**D**) por técnicas de Western blot. En la parte superior de cada panel se muestra un Western blot representativo y en la parte inferior aparece un gráfico con el análisis densitométrico de todos los datos. Los resultados se expresan como media y error estándar de la media. * $p < 0,05$ vs dializador basal y PS, analizado por el test de Friedman.

También se evaluó la tensión arterial media y la ultrafiltración en ml/h durante la sesión de hemodiálisis en la que se aislaron los monocitos con cada una de las membranas en estudio, sin observarse diferencias estadísticamente significativas (Tabla 11).

Tabla 11. Tensión arterial media y ultrafiltración tras 15 días de diálisis con polietersulfona y con polisulfona.

	Basal	Polietersulfona	Polisulfona	p (Friedman)
TAM	118 (25)	108 (29)	111 (22)	ns
UF (ml/h)	835 (232)	775 (268)	790 (496)	ns

TAM: tensión arterial media; UF: ultrafiltración; ml/h: mililitros/hora; ns: no significativo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico.

1.2. Estudio prospectivo multicéntrico:

En el estudio multicéntrico realizado para comparar el efecto de la polietersulfona con la polisulfona se incluyeron 30 pacientes, divididos en 2 grupos de tratamiento según el dializador en estudio. Las características basales de los pacientes por grupo de tratamiento se muestran en la Tabla 12, la etiología de la insuficiencia renal en la Figura 18, la comorbilidad asociada en la Figura 19, y el dializador con el que se estaban tratando los pacientes antes de iniciarse el estudio en la Figura 20.

Tabla 12. Características basales de los pacientes.

Grupos		Polietersulfona	Polisulfona	p
Nº de pacientes		19	11	
Sexo	Masculino n (%)	12 (63 %)	4 (36 %)	ns
	Femenino n (%)	3 (37 %)	7 (67 %)	ns
Edad (años)	Mediana (r.i.)	73(17)	72(25)	ns
T diálisis (meses)	Mediana (r.i)	27 (25)	26(25)	ns

T en diálisis: tiempo de tratamiento en diálisis. Los datos se expresan como frecuencia absoluta (n), porcentaje (%), mediana y rango intercuartílico (r.i).

Los dos grupos eran comparables respecto al sexo, edad y tiempo en diálisis. La etiología más frecuente de la insuficiencia renal en el grupo tratado con polietersulfona fue la diabetes, siendo en el grupo tratado con polisulfona la glomerulonefritis (Figura 18).

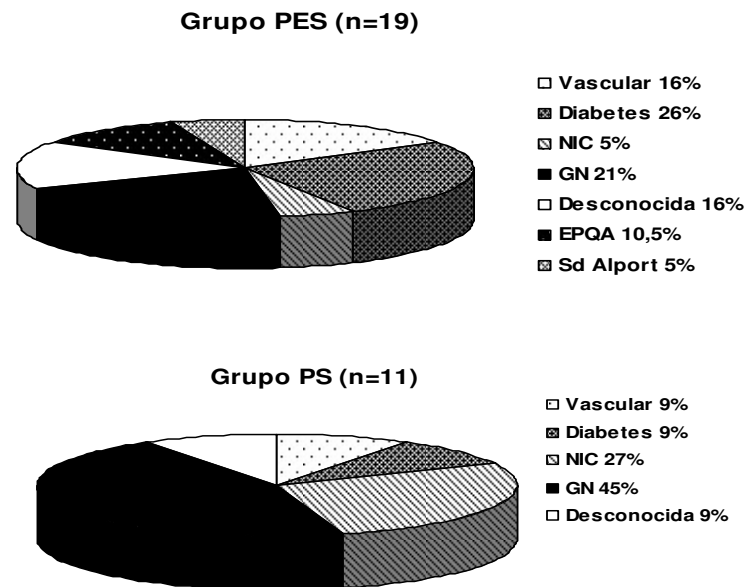


Figura 18. Etiología de la insuficiencia renal de los pacientes del grupo tratado con polioetersulfona (PES) y del grupo tratado con polisulfona (PS). NIC: nefropatía intersticial crónica; GN: glomerulonefritis; EPQA: enfermedad poliquística del adulto. La etiología de la insuficiencia renal se expresa en porcentaje (%).

La HTA fue el agente comórbido más frecuente en ambos grupos, no apreciándose diferencias significativas entre los dos grupos respecto a la comorbilidad (Figura 19).

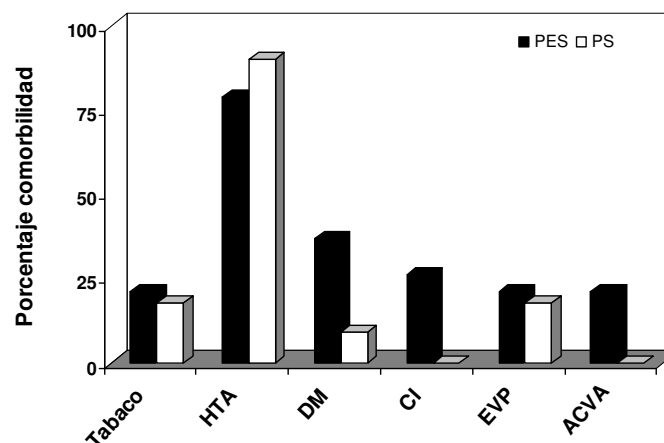


Figura 19. Comorbilidad asociada. HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; CI: cardiopatía isquémica; EVP: enfermedad vascular periférica; ACVA: accidente cerebrovascular. La comorbilidad se expresa en porcentaje (%). PES: Polietersulfona; PS: Polisulfona.

En el grupo tratado con polietersulfona hubo un mayor porcentaje de pacientes dializados previamente con polisulfona de alta permeabilidad que en el grupo tratado con polisulfona (Figura 20), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

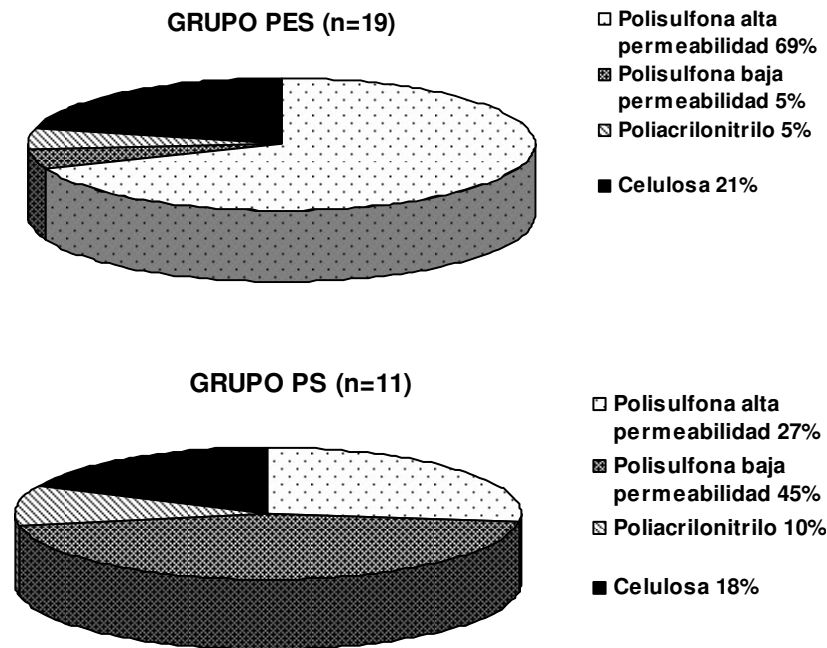


Figura 20. Dializadores de los pacientes antes del inicio del estudio. Grupo PES: pacientes en los que el dializador es sustituido por polietersulfona. Grupo PS: pacientes en los que el dializador es sustituido por polisulfona. Los dializadores utilizados se expresan en porcentaje (%).

1.2.1. Evaluación del efecto de una sesión de hemodiálisis:

El efecto agudo de una única sesión de hemodiálisis con polietersulfona y con polisulfona se muestra en la Tabla 13. Dicha tabla recoge los datos en porcentaje de la adhesión de monocitos a las células endoteliales en cocultivo, la toxicidad celular de las células endoteliales incubadas con los monocitos de los pacientes expresada como LDH liberada al medio de cultivo, y la expresión o contenido proteico de los factores vasoactivos endoteliales, ECE-1 y eNOS, en las células endoteliales coincubadas con los monocitos. Observamos que con las dos membranas en estudio hubo una disminución significativa al finalizar la sesión de hemodiálisis sobre la adhesión de los monocitos a las células endoteliales en cultivo. Sin embargo, no hubo cambios significativos en la toxicidad celular ni en la expresión de factores vasoactivos (eNOS y ECE-1) con ninguna de las 2 membranas en estudio.

Tabla 13. Efecto de una sesión de HD sobre la funcionalidad endotelial.

	Polietersulfona		p
	Pre-HD	Post-HD	
Adhesión MC a CE (%)	3,2 (3,3)	2,2 (1,4)	0,005
Toxicidad, LDH (u.i./L)	129,2 (176)	158,2 (175)	ns
Expresión eNOS (U.D.)	0,51 (0,58)	0,56 (0,31)	ns
Expresión ECE-1 (U.D.)	0,73 (0,55)	0,73 (0,53)	ns

	Polisulfona		p
	Pre-HD	Post-HD	
Adhesión MC a CE (%)	3,1 (4,2)	1,8 (1,5)	0,037
Toxicidad, LDH (u.i./L)	221 (159)	171 (205)	ns
Expresión eNOS (U.D.)	0,57 (0,53)	0,48 (0,51)	ns
Expresión ECE-1 (U.D.)	0,72 (0,89)	0,48 (0,74)	ns

MC: monocitos; CE: células endoteliales; pre-HD: pre-hemodiálisis; post-HD: post-hemodiálisis; LDH: lactato deshidrogenasa; u.i.: unidades internacionales; eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial; ECE-1: enzima convertora de endotelina-1; U.D.: unidades densitométricas. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. Se considera una diferencia estadísticamente significativa si $p < 0,05$.

1.2.2. Evaluación del efecto crónico de 3 meses de hemodiálisis:

En la segunda parte de este estudio multicéntrico se evaluó el efecto crónico de 3 meses de tratamiento con las dos membranas en estudio, en dos grupos diferentes: pacientes dializados con polietersulfona y pacientes dializados con polisulfona, respecto a los parámetros de funcionalidad endotelial analizados. El comportamiento de ambos dializadores fue similar en los dos grupos, observándose un aumento en la adhesión de monocitos a las células endoteliales en cocultivo tanto con polietersulfona como con polisulfona, respecto al dializador basal (Figura 21A). En contraste, se observó una disminución en la toxicidad de las células endoteliales coincubadas con los monocitos de los pacientes, con ambas membranas en estudio, respecto al dializador basal (Figura 21B).

Sin embargo, no se objetivaron cambios significativos en la expresión de factores endoteliales vasoactivos (eNOS y ECE-1) en las células endoteliales coincubadas con los

monocitos de los pacientes en diálisis con ninguna de las membranas en estudio, respecto al dializador basal (Figuras 21C y 21D).

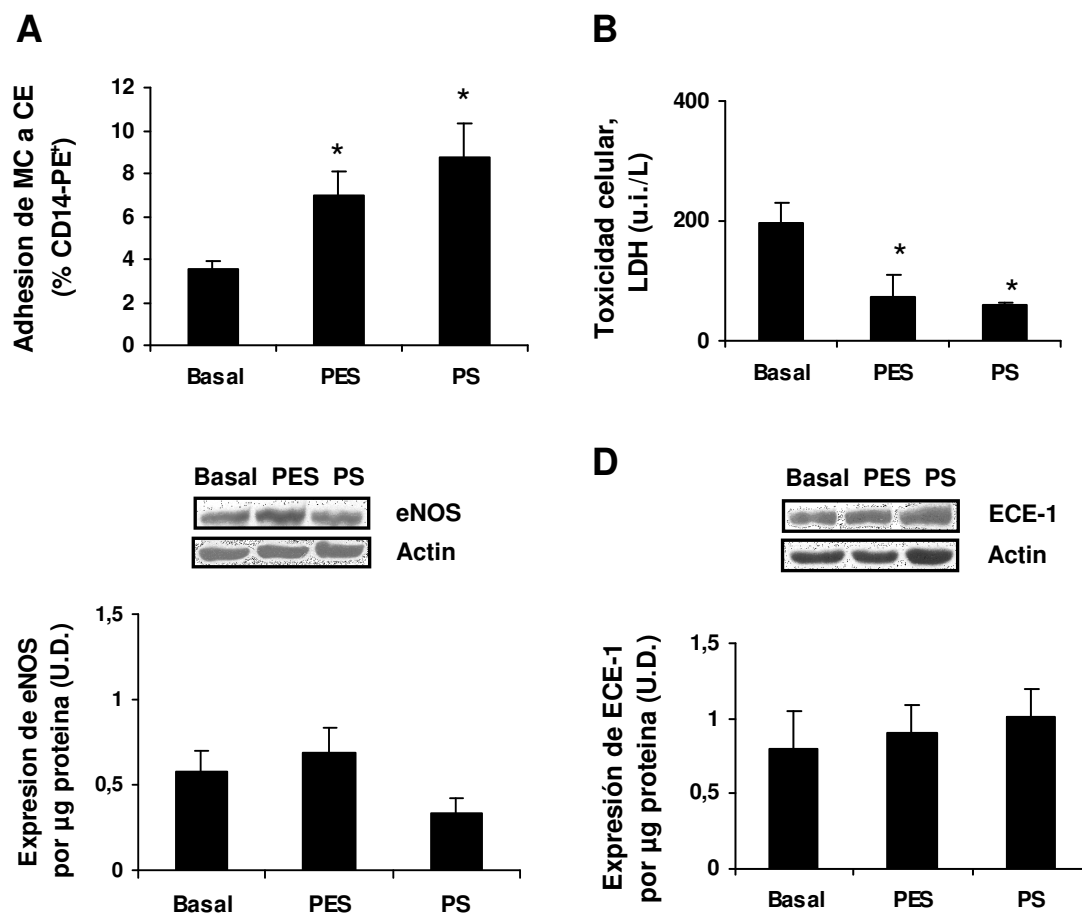


Figura 21. Efecto de 3 meses de diálisis con polietersulfona (PES) y con polisulfona (PS) respecto al dializador basal. Los monocitos (MC) fueron aislados de sangre total de cada paciente antes y después de la sesión de hemodiálisis. Entonces, 1 millón de MC se incubaron durante 24 h con células endoteliales humanas (CE) en cultivo. **A)** Adhesión de MC a CE midiendo porcentaje de CE-CD14⁺. **B)** Toxicidad celular expresada como lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo. **C, D)** Tras el cocultivo de MC con CE, se extrajeron las proteínas de CE para analizar la expresión proteica de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) (**C**) y de la enzima convertora de endotelina-1 (ECE-1) (**D**) por técnicas de Western blot. En la parte superior de cada panel se muestra un Western blot representativo y en la parte inferior aparece un gráfico con el análisis densitométrico de todos los datos. Los resultados se expresan como media y error estándar de la media. *p<0,05 vs dializador basal.

En las diálisis evaluadas, la tasa de reducción de pequeñas y medianas moléculas fue similar con las 2 membranas en estudio (Figura 22). No se observaron diferencias significativas ni en la tensión arterial media, ni en el recuento leucocitario a los 30 minutos del inicio de la

sesión en los 2 grupos de tratamiento (Tabla 14), así como tampoco en la tasa de ultrafiltración basal y a los 3 meses del grupo tratado con polietersulfona. Sin embargo, en el grupo tratado con polisulfona se objetivó una discreta disminución de la tasa de ultrafiltración, estadísticamente significativa, en la diálisis a los 3 meses.

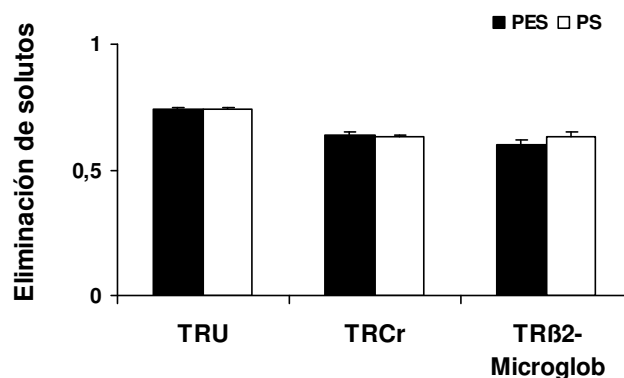


Figura 22. Eliminación de solutos. TRU: tasa de reducción de urea; TRCr: tasa de reducción de creatinina; TRβ₂-Microglob: tasa de reducción de β₂-microglobulina. Membranas en estudio: polietersulfona (PES) y polisulfona (PS).

Tabla 14. Tensión arterial media, ultrafiltración y leucopenia en los 2 grupos de tratamiento.

	Polietersulfona			Polisulfona		
	Basal	3 meses	p	Basal	3 meses	p
TAM	104 (8)	102 (21)	ns	111 (22)	109 (21)	ns
UF (ml/h)	586 (409)	587 (371)	ns	714 (238)	550 (333)	0,04
Leucopenia (%)	18	11	ns	11.2	8	ns

TAM: tensión arterial media; UF: ultrafiltración; ml/h: mililitros /hora; Leucopenia (%): porcentaje de disminución de los leucocitos a los 30 minutos de hemodiálisis respecto al inicio de la sesión de hemodiálisis; ns: no significativo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. Se considera una diferencia estadísticamente significativa si *p<0,05.

Objetivo 2.- Comparación de los efectos de la polinefrona respecto a otros dializadores sobre la activación monocitaria.

2.1. Estudio piloto cuasi-experimental comparando polinefrona y triacetato de celulosa :

Se realizó un estudio piloto en 9 pacientes para comparar el efecto de la diálisis con una membrana de celulosa modificada (triacetato de celulosa) respecto a una nueva membrana sintética (polinefrona) sobre la activación monocitaria, siendo los pacientes controles de si mismos. Las características basales de los pacientes se indican en la Tabla 15, la etiología de la insuficiencia renal en la Figura 23 y la comorbilidad asociada en la Figura 24. La etiología más frecuente de insuficiencia renal en este grupo fue la glomerulonefritis, siendo la comorbilidad asociada con más frecuencia la hipertensión.

Tabla 15. Características basales de los pacientes.

Nº de pacientes		9
Sexo	Masculino n (%)	6 (67)
	Femenino n (%)	3 (33)
Edad (años)	Mediana (r.i.)	61(21)
T en diálisis (meses)	Mediana (r.i.)	32(35)

T en diálisis: tiempo de tratamiento en diálisis. Los datos se expresan como frecuencia absoluta (n), porcentaje (%), mediana y rango intercuartílico (r.i.).

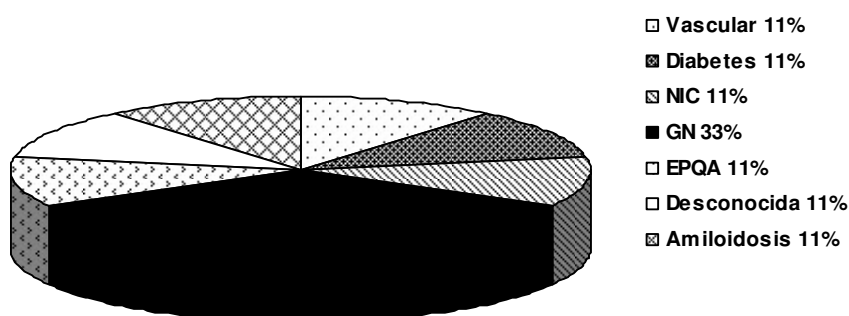


Figura 23. Etiología de la insuficiencia renal. NIC: nefropatía intersticial crónica; GN: glomerulonefritis; EPQA: enfermedad poliquística del adulto. La etiología de la insuficiencia renal se expresa en porcentaje (%).

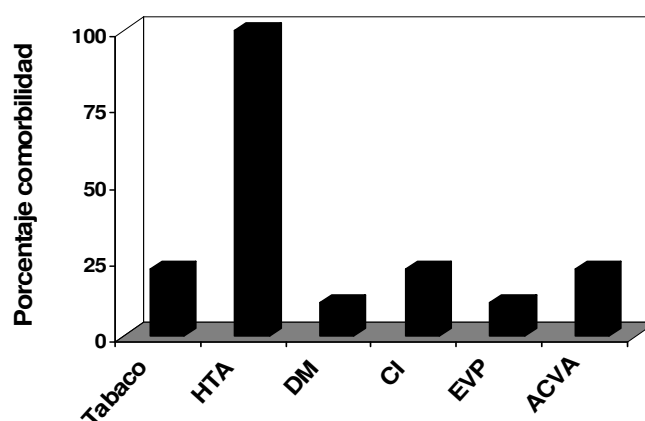


Figura 24.-Comorbilidad asociada. HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; CI: cardiopatía isquémica; EVP: enfermedad vascular periférica; ACVA: accidente cerebrovascular. La comorbilidad se expresa en porcentaje (%).

2.1.1. Evaluación de efecto agudo de una sesión de hemodiálisis:

El efecto agudo de una única sesión de hemodiálisis con polinefrona y con triacetato de celulosa sobre los parámetros de activación monocitaria evaluados se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Efecto de una sesión de hemodiálisis sobre la activación monocitaria.

	Triacetato de celulosa		p
	Pre-HD	Post-HD	
n° MC ROS⁺/10.000 células	1051 (1375)	1508 (1293)	ns
n° MC CD14⁺CD16⁺/10.000 células	1562 (1139)	706 (1475)	ns
Expresión Hsp70 (U.D.)	2,3 (4,1)	1,3 (3,1)	ns
Expresión Hsp90 (U.D.)	1,4 (1,5)	1,6 (3,2)	ns

	Polinefrona		p
	Pre-HD	Post-HD	
n° MC ROS⁺/10.000 células	401 (467)	364 (365)	ns
n° MC CD14⁺CD16⁺/10.000 células	1120 (920)	162 (760)	ns
Expresión Hsp70 (U.D.)	0,25 (2,2)	1,7 (2,2)	0,028
Expresión Hsp90 (U.D.)	8,4 (16,2)	1,3 (10,19)	0,028

pre-HD: pre-hemodiálisis; post-HD: post-hemodiálisis; MC ROS⁺: Monocitos productores de especies reactivas de oxígeno cuantificados en citómetro de flujo; MC CD14⁺CD16⁺: Monocitos activados cuantificados en citómetro de flujo. Hsp: Proteína de shock térmico; U.D.: unidades densitométricas. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. Se considera una diferencia estadísticamente significativa si $p < 0,05$.

No hubo diferencias significativas antes y después de la sesión de hemodiálisis con ninguna de las 2 membranas estudiadas sobre la producción de ROS y el porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺. Respecto a las proteínas de shock térmico Hsp70 y Hsp90, no se obtuvieron cambios significativos con triacetato de celulosa tras una sesión de hemodiálisis, pero sí se obtuvo un aumento significativo en la expresión proteica de Hsp70 en los monocitos de los pacientes al finalizar la sesión con polinefrona, además de una disminución estadísticamente significativa en la expresión de Hsp90 al finalizar la sesión con la misma membrana.

2.1.2. Evaluación del efecto crónico de 4 meses de hemodiálisis:

El efecto crónico de 4 meses de tratamiento con triacetato de celulosa y con polinefrona sobre los parámetros de activación monocitaria evaluados se muestra en la Figura 25.

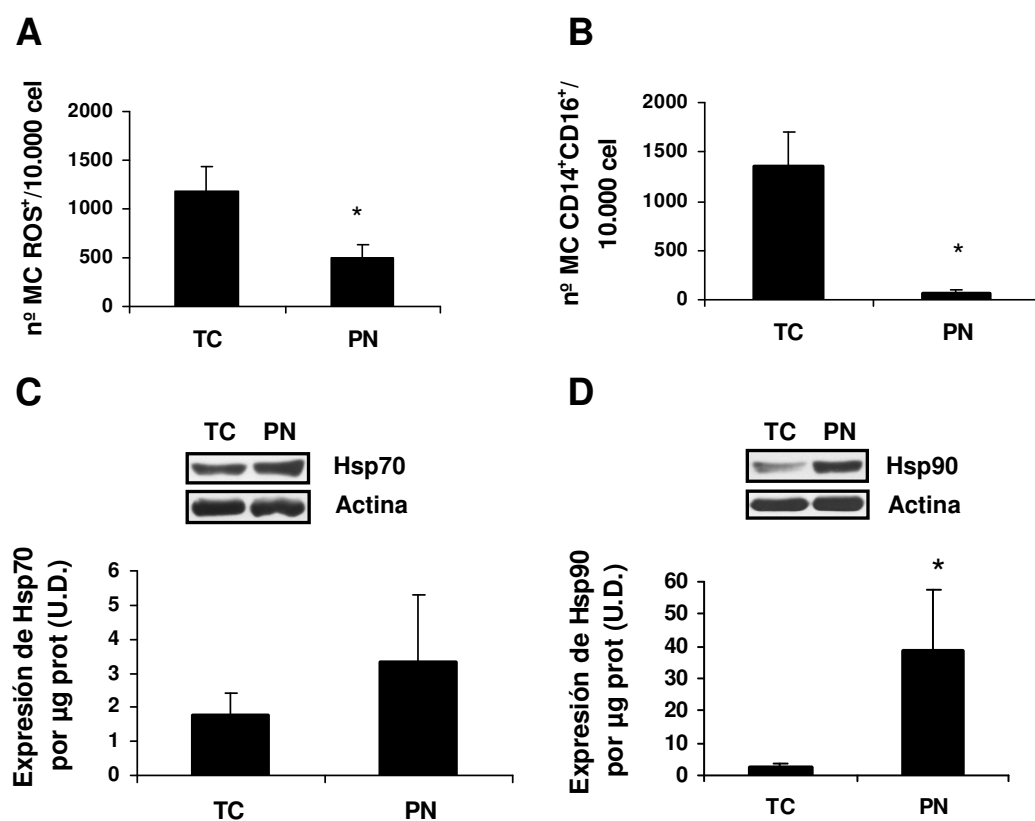


Figura 25. Efecto crónico de 4 meses de tratamiento con triacetato de celulosa (TC) y con polinefrona (PN) sobre la activación monocitaria. Los monocitos (MC) fueron aislados de sangre total de cada paciente antes y después de la sesión de hemodiálisis. **A)** Los MC fueron incubados con una sonda DHDCF durante 30 min a 37°C, que tras oxidarse por la presencia de radicales libres (ROS) fue cuantificada la señal fluorescente por citómetro indicando el número de MC productores de ROS (MC ROS⁺). **B)** 100 µl de sangre total fue incubada con anticuerpos CD14 y CD16 durante 20 min a temperatura ambiente, para detectar lo monocitos activados que eran positivos para ambos marcadores (MC CD14⁺CD16⁺) mediante un citómetro de flujo. **C, D)**

Se extrajeron las proteínas de MC aislados de sangre total, para cuantificar los niveles proteicos de las proteínas de shock térmico Hsp70 (C) y Hsp90 (D) por técnicas de Western blot. En la parte superior de cada panel se muestra un Western blot representativo y en la parte inferior aparece un gráfico con el análisis densitométrico de todos los datos. Los resultados se expresan como media y error estándar de la media. * $p < 0,05$ vs dializador basal TC.

La diálisis con polinefrona provocó una disminución en la producción de ROS por parte de los monocitos respecto al tratamiento con triacetato de celulosa en el mismo grupo de pacientes (Figura 25A). También tras 4 meses de tratamiento con polinefrona, los pacientes mostraron una disminución en el porcentaje de monocitos activados $CD14^+CD16^+$, respecto al tratamiento de 4 meses con triacetato de celulosa (Figura 25B).

La expresión de la proteína Hsp70 en monocitos no experimentó cambios significativos tras el tratamiento con las 2 membranas en estudio (Figura 25C), aunque sí se pudo observar un aumento significativo en la expresión de la Hsp90 en monocitos de los pacientes dializados con polinefrona, respecto a los dializados con triacetato de celulosa (Figura 25D).

Se evaluó la eliminación de pequeñas y medianas moléculas con los dos dializadores en estudio, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas en la tasa de reducción de urea, creatinina y β_2 -microglobulina entre los dos dializadores. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, parecía haber una mayor tasa de reducción de β_2 -microglobulina con polinefrona que con triacetato de celulosa (Figura 26).

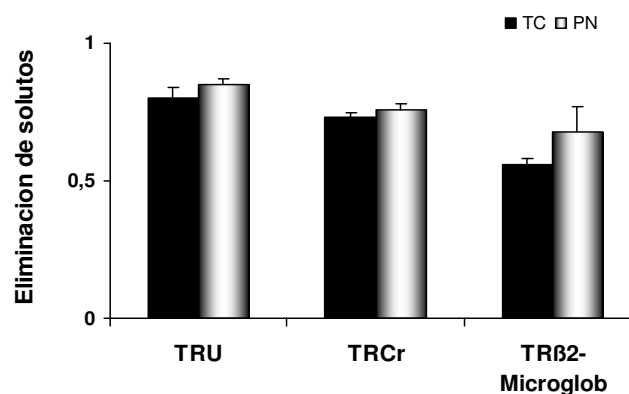


Figura 26. Eliminación de solutos con triacetato de celulosa (TC) y con polinefrona (PN) a los 4 meses de tratamiento. TRU: tasa de reducción de urea; TRCr: tasa de reducción de creatinina; TR β_2 -microglob: tasa de reducción de β_2 -microglobulina.

No se observaron diferencias significativas sobre la tensión arterial media y la ultrafiltración durante la sesión de diálisis con los dializadores estudiados (Tabla 17).

Tabla 17. Tensión arterial media y ultrafiltración durante la sesión de hemodiálisis con triacetato de celulosa y con polinefrona.

	Triacetato de celulosa	Polinefrona	p
TAM	100 (34)	104 (37)	ns
UF (ml/h)	780 (437)	800 (318)	ns

TAM: tensión arterial media; UF: ultrafiltración; ml/h: mililitros /hora; ns: no significativo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico.

Tampoco hubo diferencias en los parámetros bioquímicos y hematológicos de los pacientes tras 4 meses de tratamiento con triacetato de celulosa o con polinefrona (Tabla 18). Entre los parámetros bioquímicos analizados se estudiaron marcadores de inflamación (PCR, ferritina) y parámetros relacionados con el metabolismo óseo (calcio-fósforo). Entre los parámetros hematológicos se evaluó la leucopenia a los 30 minutos, que es una forma clásica de evaluar clínicamente la biocompatibilidad de las membranas de diálisis.

Tabla 18. Parámetros bioquímicos y hematológicos de los pacientes en hemodiálisis tras 4 meses de tratamiento con los 2 dializadores en estudio, (Triacetato de celulosa y Polinefrona).

	Triacetato celulosa	Polinefrona	p
Hb (g/dl)	11,2 (2,7)	11,3 (3,2)	ns
Ferritina (ng/ml)	585 (274)	631 (500)	ns
Leucopenia (%)	17,8 (10,3)	19,5 (18)	ns
PCR (mg/l)	5,4 (25)	9 (45,2)	ns
Ca (mg/dl)	8,4 (1,9)	8,6 (1,7)	ns
P (mg/dl)	6,1 (3,5)	5,1 (1,45)	ns
Ac. úrico (mg/dl)	6,3 (1,03)	6,3 (0,78)	ns
β₂m (mg/l)	28,6 (13,3)	26,1(17)	ns

Hb: Hemoglobina; Leucopenia (%): porcentaje de disminución de los leucocitos a los 30 minutos de hemodiálisis respecto al inicio de la sesión de hemodiálisis; PCR: proteína C reactiva; Ca: calcio; P: fósforo; Ac. Úrico: ácido úrico; β₂m: β₂ microglobulina; ns: no significativo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico.

2.2. Estudio multicéntrico controlado y aleatorizado comparando polinefrona con helixona y poliamida:

Para evaluar el efecto de la polinefrona, comparado con el de dos membranas de referencia en la actualidad, helixona y poliamida, sobre la activación monocitaria, se realizó un estudio con 47 pacientes. De estos, 9 pacientes fueron aleatorizados para formar el grupo control, manteniendo su dializador habitual de helixona o poliamida, y 38 pacientes formaron el grupo de tratamiento (polinefrona), cambiando helixona o poliamida por polinefrona. Ambos grupos permanecieron 4 meses con dichos dializadores de estudio. Las características basales de ambos grupos se expresan en la Tabla 19.

Tabla 19. Características basales de los pacientes.

Grupos		Control	Polinefrona	p
Nº de pacientes		9	38	
Sexo	Masculino n (%)	6 (67)	27 (71)	ns
	Femenino n (%)	3 (33)	11 (29)	ns
Edad (años)	Mediana (r.i.)	65 (30)	65 (28)	ns
T diálisis (meses)	Mediana (r.i.)	25(46)	32(55)	ns
Tipo de HD	Online n (%)	4 (44)	14 (37)	ns
	Alto flujo n (%)	5 (56)	24 (63)	ns

Control: grupo control; Polinefrona: grupo dializado con polinefrona; T diálisis: tiempo de tratamiento en hemodiálisis; HD: hemodiálisis; ns: no significativo. Los valores se expresan con frecuencia absoluta (n) y porcentaje (%), o como mediana y rango intercuartílico (r.i.).

La etiología de la insuficiencia renal de los pacientes se muestra en la Figura 27, y la comorbilidad asociada se muestra en la Figura 28.

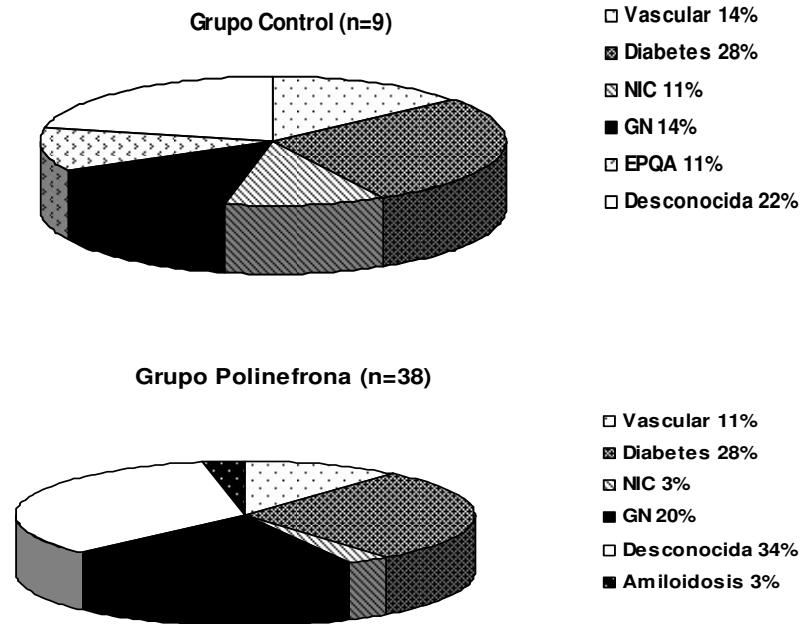


Figura 27.- Etiología de la insuficiencia renal en el grupo control y en el grupo dializado con polinefrona. NIC: nefropatía intersticial crónica; GN: glomerulonefritis; EPQA: enfermedad poliquística del adulto. La etiología de la insuficiencia renal se expresa en porcentaje (%).

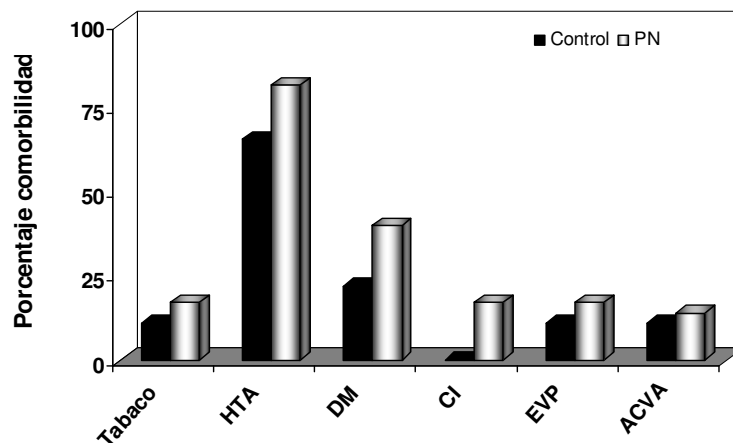


Figura 28.- Comorbilidad asociada en los grupos de estudio. Control: grupo control; PN: grupo dializado con polinefrona; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; CI: cardiopatía isquémica; EVP: enfermedad vascular periférica; ACVA: accidente cerebrovascular. La comorbilidad se expresa en porcentaje (%).

2.2.1. Evaluación del efecto agudo de una sesión de hemodiálisis:

El efecto agudo de una única diálisis con cada uno de los dializadores incluidos en el estudio se muestra en la Tabla 20. Una única sesión de hemodiálisis no modificó ninguno de los

parámetros analizados respecto a la activación monocitaria con ninguno de los dializadores incluidos en el estudio.

Tabla 20. Efecto agudo de una sesión de hemodiálisis sobre la activación monocitaria.

	Poliamida		p
	Pre-HD	Post-HD	
N° MC ROS⁺/10.000 células	1081 (1170)	903 (1314)	ns
N° MC CD14⁺CD16⁺/10.000 células	405 (1426)	530 (1094)	ns
Expresión Hsp70 (U.D.)	1,07 (1,55)	1,04 (1,43)	ns
Expresión Hsp90 (U.D.)	1,35 (2,26)	1,23 (2,25)	ns

	Helixona		p
	Pre-HD	Post-HD	
N° MC ROS⁺/10.000 células	1143 (1200)	1041 (658)	ns
N° MC CD14⁺CD16⁺/10.000 células	562 (1272)	624 (985)	ns
Expresión Hsp70 (U.D.)	1,32 (1,39)	0,8 (0,85)	ns
Expresión Hsp90 (U.D.)	1,16 (2,46)	0,75 (2,55)	ns

	Polinefrona		p
	Pre-HD	Post-HD	
N° MC ROS⁺/10.000 células	805 (1577)	878 (1501)	ns
n° MC CD14⁺CD16⁺/10.000 células	585 (672)	475 (804)	ns
Expresión Hsp70 (U.D.)	0,59 (1,11)	0,65 (1,77)	ns
Expresión Hsp90 (U.D.)	1,69 (3,7)	1,16 (2,17)	ns

pre-HD: pre-hemodiálisis; post-HD: post-hemodiálisis. MC ROS⁺: Monocitos productores de especies reactivas de oxígeno cuantificados en citómetro de flujo; MC CD14⁺CD16⁺: Monocitos activados cuantificados en citómetro de flujo. Hsp: Proteína de shock térmico; U.D.: unidades densitométricas. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. Se considera una diferencia estadísticamente significativa si p<0,05.

2.2.2. Evaluación del efecto crónico de 4 meses de hemodiálisis:

En la Figura 29 se muestra el efecto de los dializadores sobre la producción de ROS en monocitos. No se observaron cambios en este parámetro ni en el grupo control, es decir, en aquellos pacientes que continuaban con el mismo dializador (Figura 29A), ni en el grupo en el que se cambió el dializador a polinefrona. Esto fue evidente tanto si se consideraban independientemente los dializadores de helixona (Figura 29C) o poliamida (Figura 29D), como si se consideraban estas dos membranas conjuntamente (Figura 29B).

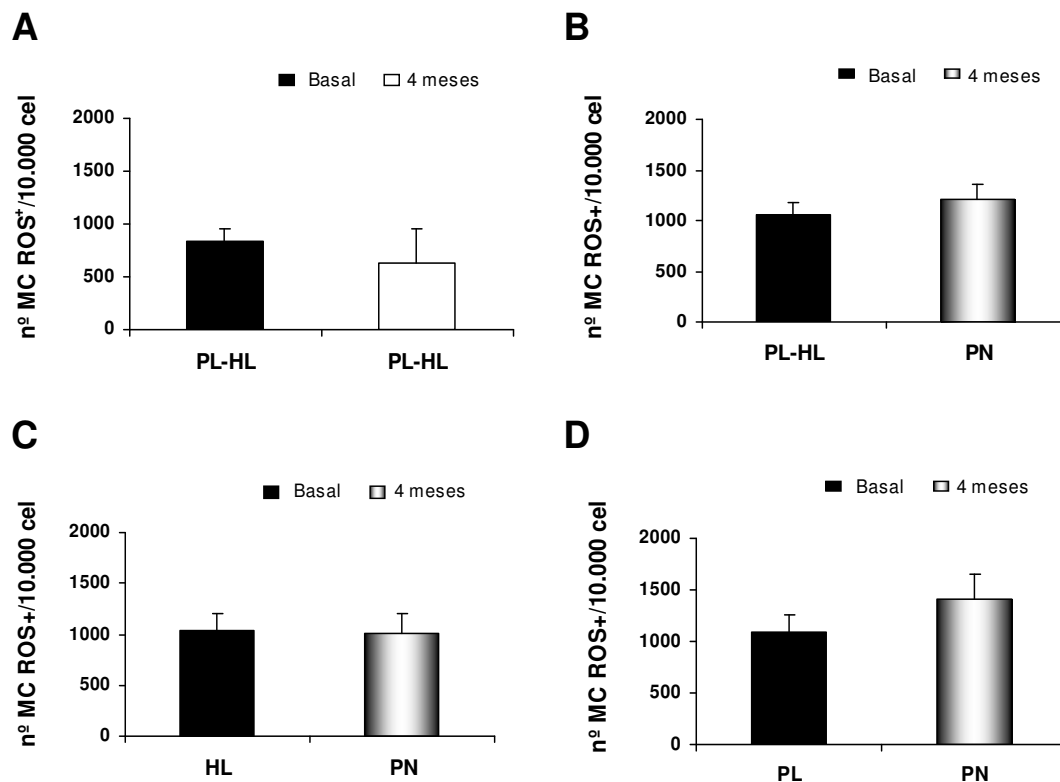


Figura 29.- Efecto crónico de 4 meses de hemodiálisis con polinefrona (PN) respecto a los dializadores basales poliamida (PL) y helixona (HL) sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en monocitos. Los monocitos (MC) fueron aislados de sangre total de cada paciente antes y después de la sesión de hemodiálisis. Los MC fueron incubados con una sonda DHDCF durante 30 min a 37°C, que tras oxidarse por la presencia de ROS fue cuantificada la señal fluorescente por citómetro indicando el número de MC productores de ROS (MC ROS⁺) por cada 10.000 células analizadas. **A)** Producción de ROS en el grupo control, tras 4 meses de tratamiento con el mismo dializador, PL: poliamida o HL: helixona. **B)** Producción de ROS tras 4 meses de tratamiento con polinefrona (PN) respecto a dializadores basales PL y HL. **C)** Producción de ROS tras 4 meses de tratamiento con PN respecto a HL. **D)** Producción de ROS tras 4 meses de tratamiento con PN respecto a PL. Los datos se expresan como media y error estándar de la media.

La Figura 30 muestra el efecto crónico de 4 meses de tratamiento con los distintos dializadores sobre la cantidad de los monocitos activados ($CD14^+CD16^+$). En la Figura 30A se muestra el efecto de 4 meses de tratamiento en el grupo control, en el que se mantuvo el dializador habitual, no observándose cambios en el porcentaje de monocitos activados ($CD14^+CD16^+$).

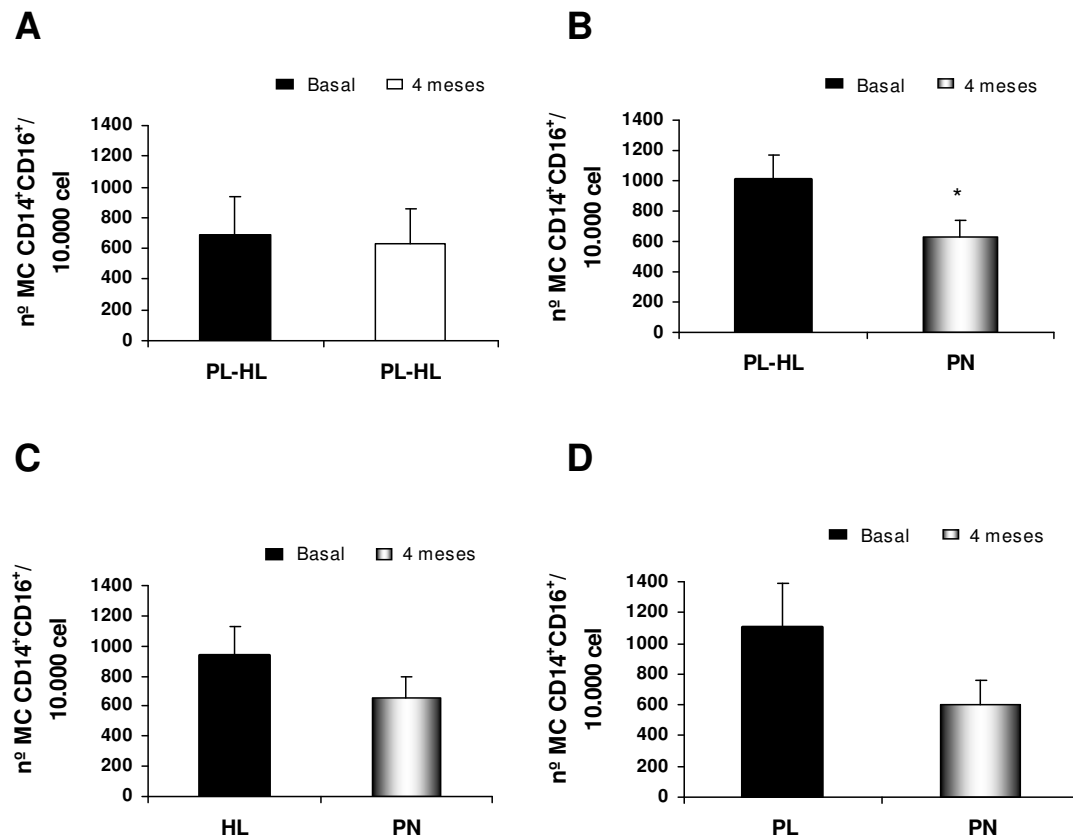


Figura 30.- Efecto crónico de 4 meses de tratamiento en hemodiálisis con polinefrona (PN) respecto a los dializadores basales poliamida (PL) y helixona (HL) sobre el porcentaje de monocitos activados ($CD14^+CD16^+$). 100 μ l de sangre total fueron incubados con anticuerpos CD14 y CD16 durante 20 minutos a temperatura ambiente, para detectar lo monocitos activados que eran positivos para ambos marcadores (MC $CD14^+CD16^+$) por cada 10.000 células analizadas mediante un citómetro de flujo. **A)** Porcentaje de monocitos activados en el grupo control tras 4 meses de tratamiento con el mismo dializador basal, PL: poliamida o HL: helixona. **B)** Porcentaje de monocitos activados tras 4 meses de tratamiento con polinefrona (PN) respecto a poliamida (PL) y helixona (HL). **C)** Porcentaje de monocitos activados tras 4 meses de tratamiento con PN respecto a la HL. **D)** Porcentaje de monocitos activados tras 4 meses de tratamiento con PN respecto a la PL. Los datos se expresan como media y error estándar de la media. * $p < 0,05$ vs dializador basal.

En la Figura 30B se muestra el efecto tras 4 meses de tratamiento con polinefrona respecto al dializador habitual helixona o poliamida, observándose una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de monocitos activados ($CD14^+CD16^+$) con polinefrona. Al analizar por separado el efecto de polinefrona, respecto a la helixona (Figura 30C), o respecto a la poliamida (Figura 30D), se observó una disminución en la cantidad de monocitos activados ($CD14^+CD16^+$) con polinefrona respecto a ambos dializadores basales, aunque no fue estadísticamente significativa.

La Figura 31 muestra el efecto crónico tras 4 meses de tratamiento con los distintos dializadores sobre la expresión proteica de Hsp70 en monocitos. En el grupo control se mantuvo el dializador habitual, no observándose cambios en la expresión de Hsp70 (Figura 31A). Cuando se comparó el efecto de la diálisis con polinefrona respecto a los 2 dializadores basales, poliamida y helixona, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 31B). Al comparar el efecto de la polinefrona respecto a los dializadores basales por separado, tampoco se observaron diferencias en el contenido de Hsp70 en monocitos con polinefrona respecto a helixona (Figura 31C), o poliamida (Figura 31 D).

La Figura 32 muestra el efecto crónico de 4 meses de tratamiento con los distintos dializadores sobre la expresión proteica de Hsp90 en monocitos de pacientes en hemodiálisis. En el grupo control, en el que los pacientes mantuvieron su dializador habitual durante todo el estudio, no se modificó la expresión de Hsp90 (Figura 32A). Tampoco se observaron cambios significativos en la expresión de Hsp90 cuando se comparó el efecto de 4 meses de tratamiento con polinefrona respecto a ambos dializadores basales, poliamida y helixona (Figura 32B). Al analizar el efecto de 4 meses de tratamiento con polinefrona respecto a cada uno de los dializadores basales por separado, tampoco se obtuvieron cambios significativos ni respecto a helixona (Figura 32C), ni respecto a poliamida (Figura 32D).

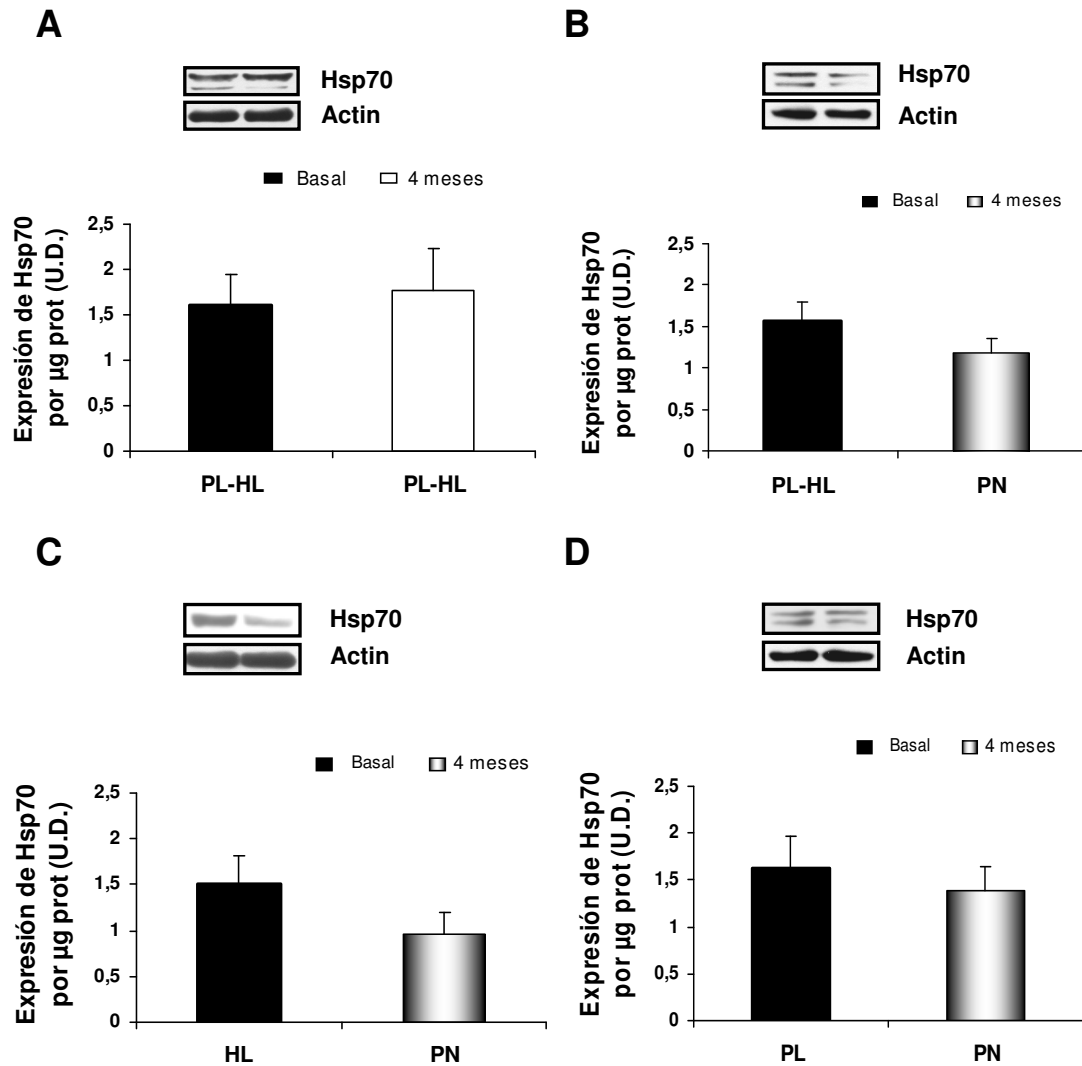


Figura 31.- Efecto crónico de 4 meses de tratamiento en hemodiálisis con polinefrona (PN) respecto a los dializadores basales poliamida (PL) y helixona (HL) sobre la expresión proteica de Hsp70 en monocitos. Los monocitos fueron aislados de sangre total de cada paciente antes y después de la sesión de hemodiálisis. Se extrajeron las proteínas de dichos monocitos para cuantificar los niveles proteicos de Hsp70 por técnicas de Western blot. En la parte superior de cada panel se muestra un Western blot representativo y en la parte inferior aparece un gráfico con el análisis densitométrico de todos los datos. **A)** Expresión de Hsp70 en los monocitos del grupo control, tras 4 meses de tratamiento con el mismo dializador. PL: poliamida o HL: helixona. **B)** Expresión de Hsp70 en los monocitos del grupo polinefrona, tras 4 meses de tratamiento con polinefrona (PN) respecto a PL y HL. **C, D)** Expresión de Hsp70 en los monocitos del grupo polinefrona, tras 4 meses de tratamiento con PN respecto al dializador basal HL (**C**), o PL (**D**). Los resultados se expresan como media y error estándar de la media.

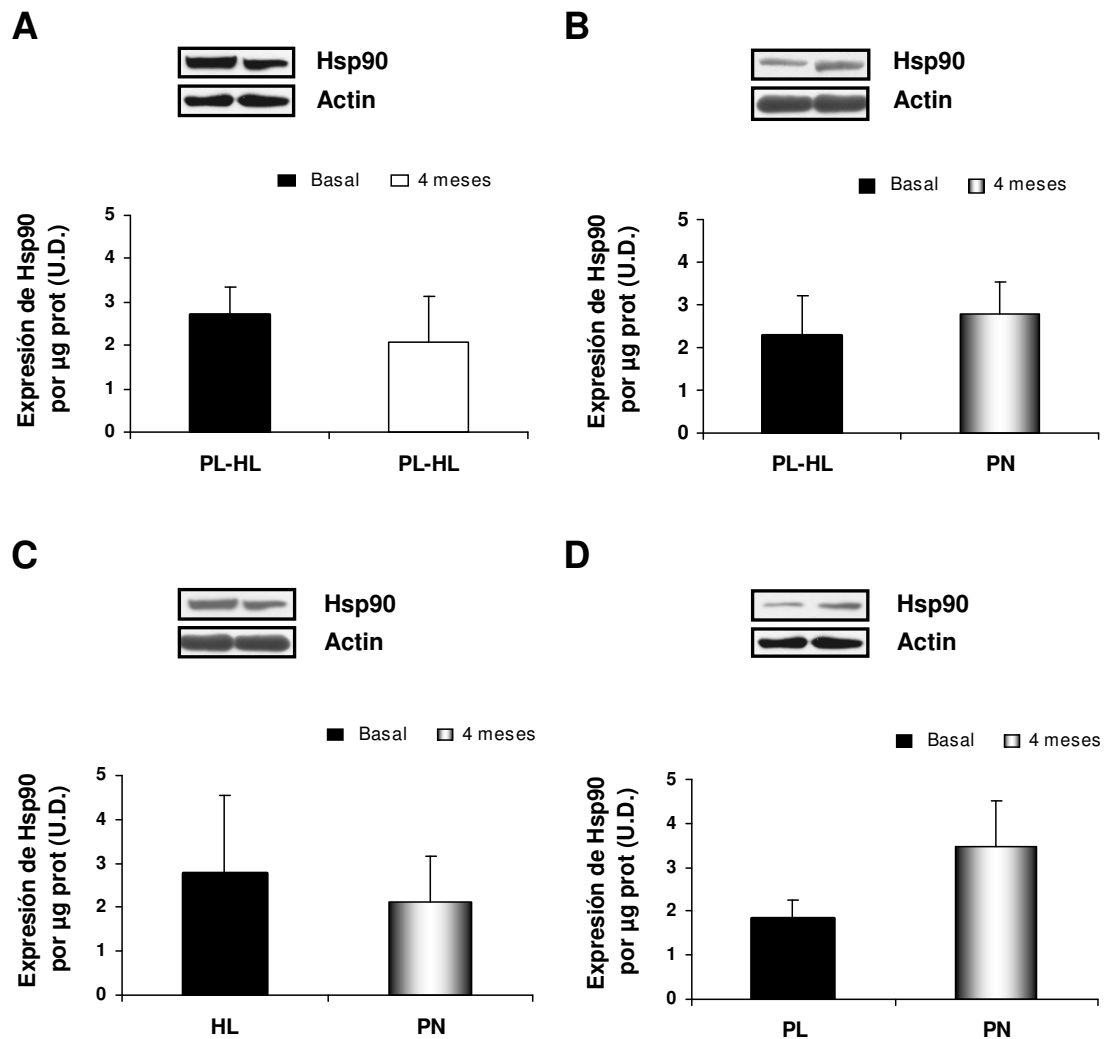


Figura 32.- Efecto crónico de 4 meses de tratamiento en hemodiálisis con polinefrona (PN) respecto a los dializadores basales poliamida (PL) y helixona (HL) sobre la expresión proteica de Hsp90 en monocitos. Los monocitos fueron aislados de sangre total de cada paciente antes y después de la sesión de hemodiálisis. Se extrajeron las proteínas de dichos monocitos para cuantificar los niveles proteicos de Hsp90 por técnicas de Western blot. En la parte superior de cada panel se muestra un Western blot representativo y en la parte inferior aparece un gráfico con el análisis densitométrico de todos los datos. **A)** Expresión de Hsp90 en los monocitos del grupo control, tras 4 meses de tratamiento con el mismo dializador. PL: poliamida o HL: helixona. **B)** Expresión de Hsp90 en los monocitos del grupo polinefrona, tras 4 meses de tratamiento con polinefrona (PN) respecto a PL y HL. **C, D)** Expresión de Hsp90 en los monocitos del grupo polinefrona, tras 4 meses de tratamiento PN respecto al dializador basal HL (**C**), o respecto al dializador basal PL (**D**). Los resultados se expresan como media y error estándar de la media.

Se comparó la tasa de reducción de pequeñas y medianas moléculas con los diferentes dializadores (Figura 33). En el grupo control, en el que se mantuvo el mismo dializador durante todo el estudio, no hubo modificaciones en la tasa de reducción de urea, creatinina, ni β_2 -microglobulina (Figura 33A).

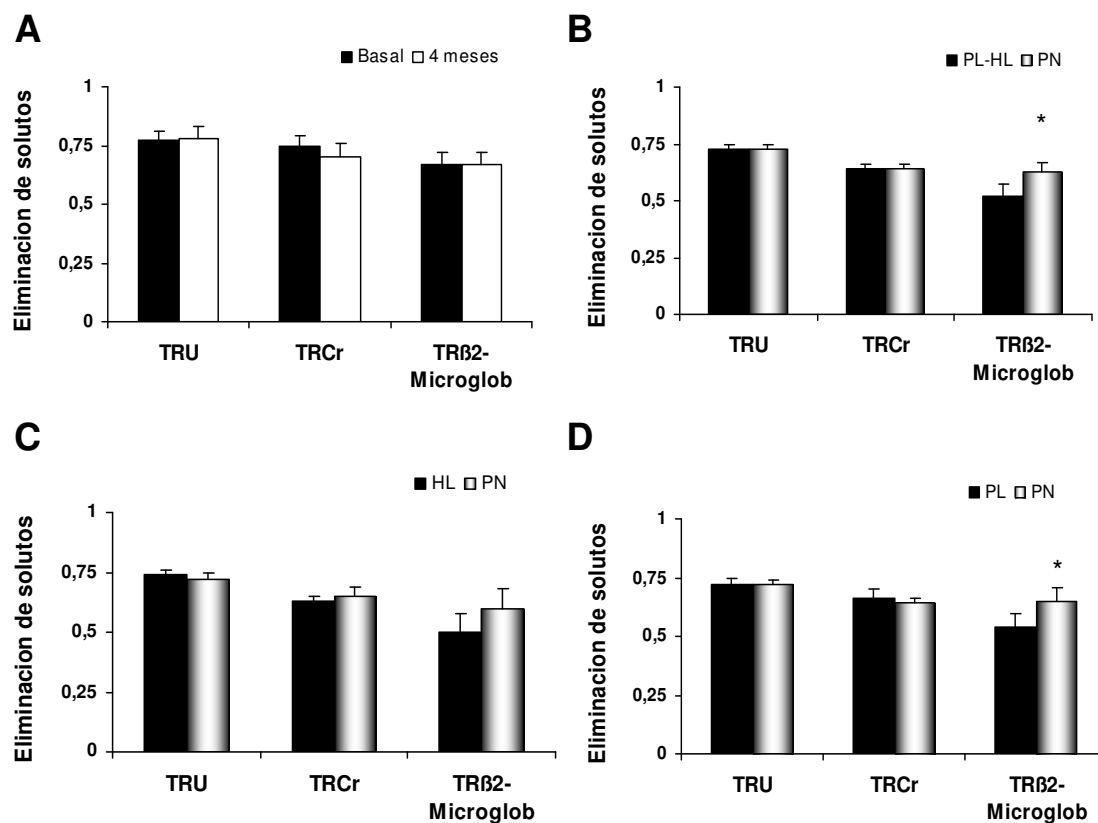


Figura 33.- Eliminación de solutos con los distintos dializadores en estudio. A) Eliminación de solutos en el grupo control, en el que los pacientes mantuvieron el tratamiento con su dializador habitual, poliamida (PL) o helixona (HL). B) Comparación de la eliminación de solutos con polinefrona (PN) respecto a los dos dializadores basales, PL y HL. C) Comparación de la eliminación de solutos con PN respecto a HL. D) Comparación de la eliminación de solutos con PN respecto a PL. TRU: tasa de reducción de urea; TRCr: tasa de reducción de creatinina; TR β_2 -microglob: tasa de reducción de β_2 -microglobulina. Los datos se expresan como media y error estándar de la media. *p<0,05 vs dializador basal.

Al comparar el efecto de polinefrona con ambos dializadores basales, poliamida y helixona, no se observaron diferencias en la tasa de reducción de urea y creatinina. En cambio si se observó una mayor tasa de reducción de β_2 -microglobulina, molécula de tamaño mediano, con polinefrona que con los dos dializadores basales (Figura 33B) considerados conjuntamente. Cuando se realizó el análisis de los dializadores por separado, las diferencias observadas en la tasa de reducción de β_2 -microglobulina sólo fueron significativas entre poliamida y polinefrona (Figura 33D).

Se evaluaron parámetros hemodinámicos durante la sesión de hemodiálisis con los diferentes dializadores en estudio, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas al comparar la tensión arterial media y la ultrafiltración durante la sesión con los 2 dializadores basales, poliamida o helixona, y la polinefrona (Tabla 21). También se analizaron parámetros hematológicos y bioquímicos de los pacientes tras 4 meses de tratamiento con las distintas membranas estudiadas, no hallándose diferencias significativas (Tabla 22).

Tabla 21. Tensión arterial media y ultrafiltración durante la sesión de hemodiálisis con los dializadores en estudio.

Grupos	Control	Polinefrona	p
TAM	91 (32)	95 (25)	ns
UF (ml/h)	675 (331)	700 (375)	ns

TAM: tensión arterial media; UF: ultrafiltración; ml/h: mililitros /hora. ns: no significativo. Grupo control: se utilizaron como dializadores basales, poliamida y helixona. Grupo polinefrona: se utilizó polinefrona como dializador de estudio. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico.

Tabla 22. Parámetros bioquímicos y hematológicos de los pacientes en hemodiálisis tras 4 meses de tratamiento con los distintos dializadores.

Grupos	Control	Polinefrona	p
Hemoglobina (gr/dl)	11,9 (1,8)	11,7 (1,5)	ns
Ferritina (ng/ml)	363 (698)	407 (666)	ns
Leucopenia (%)	10,2 (10,3)	4 (15,7)	ns
PCR (mg/l)	4,1 (14,2)	4,35 (10,7)	ns
Ca (mg/dl)	9 (0,9)	9,1 (0,9)	ns
P (mg/dl)	4,5 (2,2)	4,5 (1,3)	ns
Ac. úrico (mg/dl)	6,9 (2,4)	6,3 (1,8)	ns
β_2 -microglobulina (mg/l)	28,2 (16,9)	22,7 (17)	ns

Grupo control: se utilizaron como dializadores basales, poliamida y helixona. Grupo polinefrona: se utilizó polinefrona como dializador de estudio. Los parámetros analizados tras 4 meses fueron la hemoglobina, la ferritina, la leucopenia medida como porcentaje de disminución de los leucocitos a los 30 minutos de hemodiálisis respecto al inicio de la sesión de hemodiálisis, la PCR (proteína C reactiva), el calcio (Ca), el fósforo (P) y el ácido úrico. ns: no significativo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico.

RESUMEN DE RESULTADOS

RESUMEN DE RESULTADOS

A.- EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS MEMBRANAS SINTÉTICAS DE ALTA PERMEABILIDAD, LA POLISULFONA ESTÁNDAR Y LA POLIETERSULFONA, CONSIDERANDO PARÁMETROS DE FUNCIONALIDAD ENDOTELIAL.

1. Tras una única sesión de hemodiálisis con polisulfona y polietersulfona, se produce una disminución en la adhesión de los monocitos a las células endoteliales en cocultivo, sin cambios respecto a la toxicidad y funcionalidad endotelial.

2. Tras 15 días de tratamiento, con la polietersulfona se observa una disminución en la adhesión y toxicidad endotelial, así como una menor síntesis de ECE-1 en células endoteliales, frente al tratamiento con polisulfona.

3. Tras 3 meses de tratamiento se produce una disminución en la toxicidad endotelial tanto con polisulfona como con polietersulfona.

B.- EVALUACIÓN DE POSIBLES NUEVOS MARCADORES DE BIOCOMPATIBILIDAD, COMPARANDO TRIACETATO DE CELULOSA Y POLINEFRONA.

4. Tras una única sesión de hemodiálisis comparando el efecto de triacetato de celulosa y polinefrona, se observa una expresión más elevada de la Hsp70 monocitaria con polinefrona.

5. Tras 4 meses de tratamiento comparando el efecto de polinefrona y triacetato de celulosa, se observa una disminución en el porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺, una disminución en la producción de ROS monocitaria y un aumento en la expresión de Hsp90 monocitaria con polinefrona frente a triacetato de celulosa.

C.- EVALUACIÓN DE POSIBLES NUEVOS MARCADORES DE BIOCOMPATIBILIDAD, COMPARANDO LA POLINEFRONA CON DOS MEMBRANAS DE REFERENCIA DE ALTA PERMEABILIDAD.

6. Tras una única sesión de hemodiálisis no se observan cambios significativos en el porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺, en la producción de ROS monocitaria, ni en la expresión de Hsp70 y Hsp90 monocitaria con helixona, poliamida y polinefrona.

7. La diálisis durante 4 meses con polinefrona provoca una disminución en el porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺, respecto a helixona y poliamida.

8. Con polinefrona se observa una mayor tasa de reducción de β_2 -microglobulina que con helixona y poliamida, aunque no se aprecian diferencias significativas en los niveles plasmáticos de la β_2 -microglobulina comparando polinefrona con helixona y poliamida.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los pacientes en hemodiálisis presentan un estado de inflamación crónica que contribuye a aumentar la morbimortalidad de origen cardiovascular que estos pacientes padecen. La relación entre inflamación y daño cardiovascular cada vez es más evidente, y se acepta que la inflamación provoca daño endotelial, lo que constituye un evento sustancial en la patogénesis del daño vascular (Paramo, Belouqui & Diez 2001, Zoccali, Mallamaci & Tripepi 2003, Vallance, Collier & Bhagat 1997). Múltiples estudios refieren que la situación de inflamación crónica que padecen los pacientes con ERC se asocia con disfunción endotelial y, como consecuencia, con la aterosclerosis que precede a la enfermedad cardiovascular (Methe, Weis 2007). No obstante, los mecanismos biológicos mediante los cuales la inflamación en la ERC provoca daño endotelial no se conocen con claridad, y probablemente se deba en parte, a la escasez de estudios experimentales que han intentado evaluar la relación entre la actividad inflamatoria inducida por las células inmunocompetentes y las células endoteliales.

Entre los elementos que contribuyen a perpetuar el estado de inflamación crónica de los pacientes en hemodiálisis se encuentra el contacto periódico de la sangre del paciente con el material que constituye la membrana de diálisis, lo que desencadena una respuesta inflamatoria. En este contexto, se define la biocompatibilidad como la capacidad de un material de actuar en una aplicación específica sin provocar una respuesta clínicamente significativa por parte del organismo (Klinkmann, Baurmeister & Davison 1994). La composición química y las características intrínsecas de las membranas de diálisis son los factores que desempeñan el papel más importante en la evaluación de la biocompatibilidad (Rodríguez Bent, Hernández Herrera & Aljama García 2006, European Best Practice Guidelines Expert Group on Hemodialysis 2002).

En este trabajo hemos intentado analizar diferentes aspectos relacionados con esta respuesta inflamatoria, así como sus consecuencias sobre la funcionalidad endotelial, en pacientes tratados con diferentes membranas de diálisis.

En la actualidad se utilizan dos tipos de material para la fabricación de las membranas de diálisis: los derivados de la celulosa, que es un material utilizado desde los inicios de la técnica de hemodiálisis, y los productos sintéticos. Estos dos tipos de materiales presentan diferencias estructurales definidas, a pesar de la gran diversidad de polímeros existentes. Las membranas de celulosa presentan menor espesor que las sintéticas (entre 6,5 y 15 mm), y una composición uniforme y simétrica de la pared capilar, consiguiendo mejorar el transporte de solutos por difusión. Sin embargo, este tipo de membrana no posee la resistencia necesaria para soportar una ultrafiltración elevada, lo que es necesario en las técnicas de alto transporte convectivo, con la única excepción del triacetato de celulosa. Sin embargo, las membranas sintéticas poseen un

espesor igual o superior a 20 mm, que les confiere una mayor resistencia y las hace aptas para la técnica de alto transporte convectivo.

En los primeros tratamientos con hemodiálisis la trombogenicidad y la hemólisis eran los dos aspectos clínicos más relevantes relacionados con el contacto de la sangre con el dializador (Salzman 1971). Por ello, se intentaron desarrollar superficies menos trombogénicas. Posteriormente adquirió relevancia la activación del complemento, que fue relacionada con la leucopenia transitoria y con el secuestro de neutrófilos en el pulmón que tiene lugar durante el transcurso de la diálisis con las membranas de celulosa (Craddock et al. 1977a, Craddock et al. 1977b). Posteriormente se observó que los grupos hidroxilo del polímero de celulosa podían actuar como grupos nucleófilos por poseer la reactividad típica de los alcoholes, pudiendo interactuar, por ejemplo, con las proteínas del complemento. Para evitar este problema, se modificaron los polímeros de celulosa con el fin de reemplazar los grupos hidroxilo, generándose las membranas de celulosa modificada (Vienken et al. 1995).

También se han estudiado otros aspectos de la respuesta inflamatoria del paciente al contacto con el dializador, como la activación celular, la inducción de estrés oxidativo, o la producción de citoquinas. En todos estos casos, las membranas sintéticas y las membranas de celulosa modificada han mostrado superioridad respecto a las membranas de celulosa no modificada (Martin-Malo et al. 2000, Himmelfarb et al. 1993, Bonomini et al. 1999, Qian et al. 1995, Siroli et al. 1999).

Otra de las circunstancias relacionadas con la estructura de la membrana de diálisis, que se ha invocado que podría influir sobre la respuesta inflamatoria del paciente, en concreto sobre la eliminación de citoquinas, es el tamaño de los poros de la membrana de diálisis, clasificándose las membranas en relación con esta característica como membranas de alta y baja permeabilidad. Las membranas de alta permeabilidad o alto flujo, con poros más grandes, permitirían una mayor eliminación de citoquinas, moléculas con un peso molecular comprendido entre 15.000 y 30.000 Daltons. Por otro lado, las citoquinas pueden unirse a proteínas transportadoras como la β_2 -microglobulina, una proteína considerada de mediano tamaño, que también sería mejor eliminada con membranas de alto flujo (Schindler, Senf & Frei 2002).

Por último, la capacidad de adsorción de las distintas membranas de diálisis parece también tener importancia respecto a la eliminación de citoquinas por este mecanismo. En un estudio realizado comparando una membrana sintética, poliacrilonitrilo, con una membrana de celulosa modificada se observó una mayor capacidad de adsorción de IL-1 *in vitro* con poliacrilonitrilo que con la membrana de celulosa modificada (Lonnemann et al. 1988).

Hasta la actualidad, muchos estudios refieren la superioridad de las membranas sintéticas respecto a las membranas de celulosa no modificada en el campo de la biocompatibilidad. Sin embargo, no es muy habitual que los trabajos comparen membranas que se consideren altamente biocompatibles entre sí. En una primera parte del presente estudio quisimos evaluar el efecto de distintas membranas de diálisis sintéticas y de alta permeabilidad, sobre aspectos relacionados con la inflamación, y sus consecuencias sobre la funcionalidad endotelial.

Hay muy pocos estudios en los que se haya intentado evaluar cómo la situación de inflamación provoca disfunción endotelial. Existe un estudio realizado en 30 pacientes con ERC estadio 4 y 5 (Merino et al. 2008a), en el que se realizaron cocultivos con las distintas subpoblaciones monocitarias procedentes de dichos pacientes y células endoteliales humanas en cultivo derivadas de cordón umbilical (HuVEC). Tras estimular la liberación de citoquinas por parte de las células monocitarias con la adición de lipopolisacárido bacteriano durante 24 horas, evaluaron mediante citometría de flujo la producción de ROS y la apoptosis de HuVEC en dichos cocultivos. Ambos parámetros, que sugieren daño endotelial, aumentaron significativamente en el cocultivo de HuVEC con los monocitos activados CD14⁺CD16⁺ (48 % ROS y 37 % apoptosis), respecto a los monocitos no activados CD14⁺⁺CD16⁻ (12 % ROS y 11 % apoptosis) ó respecto a los monocitos totales (13 % ROS y 9 % apoptosis). Estos resultados apoyarían la idea de que el estrés oxidativo inducido por las células monocitarias activadas en situación de inflamación puede provocar daño endotelial. Además, en este estudio también observaron que los monocitos activados CD14⁺CD16⁺ liberaban una mayor cantidad de citoquinas al sobrenadante del cultivo, concretamente IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ (Merino et al. 2008a).

En este sentido, se han realizado otros estudios con la finalidad de explicar cómo las citoquinas producidas por una proporción relativamente pequeña de células activadas, concretamente los monocitos CD14⁺CD16⁺, que proporcionalmente son menos del 25% de los monocitos en los pacientes más afectados, son capaces de lesionar el endotelio. Algunos autores creen que las células activadas no liberan las citoquinas al torrente sanguíneo, sino que estas células poseen mecanismos para liberar las citoquinas tras haberse adherido a la monocapa de células endoteliales. Esta hipótesis se sustenta en que, además, las células activadas CD14⁺CD16⁺ muestran también una alta expresión de moléculas que favorecen la migración hacia la pared vascular, como son las moléculas de adhesión, favoreciendo la capacidad de estas células de lesionar el endotelio (Ramirez et al. 2011). Varios estudios han subrayado la importancia de la función de las quimioquinas en el reclutamiento de los monocitos en las zonas de endotelio lesionadas (Hansson 2009, Okumoto et al. 2009). Hay estudios en ratones con deleciones de los genes que codifican la expresión de quimioquinas que apoyan el papel relevante de las mismas en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Saederup et al. 2008).

Los monocitos CD14⁺CD16⁺ de pacientes con ERC presentan una expresión diferente de las quimioquinas CCR2, CCR5 y CX3CR1 que el resto de los subtipos monocitarios (Merino et al. 2011). La interacción de las quimioquinas CCR5 y CX3CR1 con sus ligandos es necesaria para reclutar a los monocitos en el tejido endotelial dañado. La expresión de estas quimioquinas en los monocitos activados CD14⁺CD16⁺ es hasta tres veces más elevada que en el subtipo monocitario normal CD14⁺⁺CD16⁻. Además, la quimioquina CCR2, que inhibe la migración monocitaria al lugar de la lesión, se encuentra más elevada en los monocitos CD14⁺⁺CD16⁻ que en los monocitos activados CD14⁺CD16⁺ (Ramirez et al. 2011). También los monocitos activados CD14⁺CD16⁺ presentan una expresión más elevada de los receptores de las moléculas adhesión, como por ejemplo el receptor de la molécula CD31 (molécula de adhesión plaquetaria), el receptor de la molécula CD54 (molécula de adhesión intercelular-1 o ICAM-1) y el receptor de la molécula CD106 (molécula de adhesión a las células vasculares o VCAM). En la misma línea de lo explicado en los párrafos anteriores, este estudio mostró que el número de monocitos activados CD14⁺CD16⁺ adheridos a las células endoteliales fue 4 veces mayor que el de los monocitos CD14⁺⁺CD16⁻ (Ramirez et al. 2011).

Hay otros estudios que han intentado explicar los mecanismos por los que los monocitos se adhieren al endotelio dañado. Algunos hacen referencia a que los cambios en la matriz extracelular pueden influir en la interacción entre monocitos y endotelio. Así, en circunstancias patológicas, como en una situación de aterosclerosis, se produce un remodelado vascular con aparición de colágeno I en el espacio subendotelial, que en condiciones normales no tiene contacto con el endotelio. Estudios *in vitro* han demostrado que células endoteliales en contacto con colágeno tipo I producen cantidades más elevadas de MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos, provocando el reclutamiento de monocitos (Boring et al. 1998). El incremento de la molécula MCP-1, podría ser suficiente para aumentar la adhesión de los monocitos al endotelio (Rollins 1997). En este sentido, otro estudio confirma que, en efecto, existe mayor adhesión de monocitos a las células endoteliales en cocultivos en presencia de colágeno I que en presencia de colágeno IV (Ruiz-Torres et al. 2006).

En una primera parte del presente estudio, como se refiere anteriormente, quisimos evaluar el efecto de distintas membranas de diálisis sintéticas, sobre aspectos relacionados con la inflamación, y sus consecuencias sobre la funcionalidad endotelial. Para ello, comparamos el efecto de dos membranas sintéticas de alto flujo y derivadas de la polisulfona, una polisulfona estándar, y una polisulfona modificada, la polietersulfona. Se decidió comparar estas dos membranas porque ambas son consideradas biocompatibles y su utilización es muy frecuente en la actualidad. Su estructura química es muy parecida, y únicamente se diferencian en que la polietersulfona no contiene grupos de isopropilideno.

Inicialmente, no sólo quisimos analizar cuantitativamente los mediadores de inflamación o la cantidad de células activadas en sangre periférica, sino que quisimos dar un paso más allá, e intentar evaluar la capacidad de las células potencialmente activadas para inducir cambios en células endoteliales en cocultivo. Para ello, se aislaron células mononucleares circulantes en sangre periférica de pacientes en tratamiento con hemodiálisis con las dos membranas en estudio. Fueron evaluados 3 aspectos respecto a la interacción de las células monocitarias con el endotelio: la adhesión de las células monocitarias a las células endoteliales, la inducción de toxicidad endotelial, y la capacidad de modificar la síntesis de factores vasoactivos endoteliales.

El efecto de ambas membranas tras una única sesión de hemodiálisis se evaluó en 2 ocasiones, tanto en el estudio piloto, con 10 pacientes, como en el estudio multicéntrico, con 30 pacientes. En ambos casos observamos un comportamiento similar, encontrando una disminución de la adhesión de monocitos a las células endoteliales al finalizar la sesión de hemodiálisis, respecto al inicio de la misma, aunque estos cambios sólo fueron estadísticamente significativos en el caso del estudio multicéntrico, en el que la muestra de pacientes era mayor. Sin embargo, esta disminución en la adhesión no se tradujo en ningún cambio respecto al resto de parámetros analizados, sin diferencias al inicio y al final de la hemodiálisis en la toxicidad inducida sobre las células endoteliales, ni en la expresión de las enzimas analizadas para evaluar la funcionalidad endotelial (ECE-1 y eNOS).

Al evaluar el efecto de ambas membranas tras la diálisis durante un plazo corto de 15 días, pudimos observar que la polietersulfona provocó una reducción del daño endotelial inducido por las células monocitarias, con una disminución en la adhesión y toxicidad endotelial, observándose además, una disminución en la síntesis de una de las proteínas implicadas en la síntesis de endotelina, la ECE-1. Este efecto podría considerarse beneficioso, ya que la endotelina es un factor vasoactivo endotelial que induce vasoconstricción. El hecho de encontrar cambios significativos tras 15 días y no con una sesión de hemodiálisis, sugiere un efecto acumulativo y diferencial, puesto que la utilización de la polietersulfona mostró mejoría en los parámetros analizados respecto al uso de la polisulfona. Es conveniente resaltar, que aunque el número de pacientes en este estudio fue muy limitado, cada paciente fue control de sí mismo.

Aunque, según este primer estudio, la diálisis con polietersulfona consigue disminuir el daño endotelial provocado por las células monocitarias activadas, sabemos que el propio tratamiento de la hemodiálisis determina una continua agresión al endotelio. Por esta razón, quisimos evaluar el efecto de ambas membranas a largo plazo, bajo las condiciones clínicas habituales. Para ello se evaluó el efecto de ambas membranas tras 3 meses de tratamiento. En esta situación observamos que ambas membranas provocaron un aumento de la adhesión de monocitos a las células endoteliales respecto a la situación basal. Sin embargo, la toxicidad endotelial disminuyó significativamente tanto con polisulfona como con polietersulfona. En

cuanto a los parámetros analizados para evaluar la funcionalidad endotelial tras 3 meses de tratamiento, no se observaron diferencias significativas ni en la expresión de ECE-1 ni en la eNOS en CE, con lo que podemos afirmar que la funcionalidad endotelial evaluada de este modo no se modificaría por estas membranas en la diálisis a largo plazo.

Estos últimos resultados, junto con los obtenidos tras una única sesión de hemodiálisis, plantean una contradicción respecto a lo anteriormente explicado, ya que la literatura refiere que la adhesión monocitaria parecería ser el paso necesario previo a la generación del daño endotelial. En nuestro estudio realizado tras una única sesión de hemodiálisis, con ambas membranas se produce una disminución en la adhesión monocitaria, que, sin embargo, no se traduce en una disminución en la toxicidad endotelial. En el estudio realizado a largo plazo, tras 3 meses de tratamiento con las 2 membranas estudiadas, se produjo un aumento en la adhesión monocitaria respecto a la situación basal con ambas membranas, con una llamativa reducción en la toxicidad endotelial. Según nuestros resultados, los cambios en la adhesión monocitaria, no se traducen directamente sobre la toxicidad endotelial. Una adhesión más elevada, no implica siempre una mayor toxicidad, pudiendo haber circunstancias en las que esto no sea así.

Por otro lado, en nuestros estudios se evaluó el comportamiento de la población monocitaria total, sin diferenciar entre subtipos monocitarios, por lo que no podemos afirmar que fuesen los monocitos con fenotipo CD14⁺CD16⁺, mayores productores de citoquinas, los que preferentemente se hubiesen adherido al endotelio.

Hay que reseñar que las diferencias obtenidas en los resultados entre las dos membranas del estudio no tuvieron relación con la tasa de reducción de medianas y pequeñas moléculas que se consiguió con cada una de ellas, ya que no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros. Tampoco se observaron diferencias clínicas en las cifras de tensión arterial de los pacientes incluidos en el estudio, ni en la tasa de ultrafiltración media obtenida durante la sesión de hemodiálisis, lo que indicaría que estos parámetros hemodinámicos, en principio, no influirían en los resultados, concretamente en lo referente a la funcionalidad endotelial.

La leucopenia observada durante la sesión de hemodiálisis, que es uno de los modos clásicos de evaluar la biocompatibilidad, tampoco fue diferente de forma significativa entre las dos membranas de estudio.

No obstante, el diseño del estudio realizado a largo plazo durante 3 meses presentó algunas limitaciones. La primera limitación fue que no todos los pacientes basalmente partían de la misma membrana de diálisis por sus condiciones clínicas habituales, ya que este estudio fue multicéntrico. Sin embargo, en el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre los 2 grupos (polisulfona y polietersulfona) respecto al tipo de membrana

utilizada antes del inicio del estudio. La segunda limitación surgió al no poderse hacer un proceso de randomización para asignar la membrana en estudio, ya que no todos los centros disponían de las dos membranas. Los dializadores fueron asignados a los pacientes según la disponibilidad del centro de tratamiento. Tampoco en este caso, se detectaron diferencias significativas entre los 2 grupos de tratamiento respecto a las características basales de los pacientes.

En conclusión, es difícil explicar en conjunto las diferencias observadas entre el efecto agudo de una única sesión de hemodiálisis, el efecto a corto plazo de 15 días o el efecto a largo plazo de 3 meses. Obviamente, estos resultados podrían deberse al efecto acumulativo de la utilización continuada de estos dos dializadores de alta calidad. Quizás, el efecto beneficioso podría producirse en un plazo más corto de tiempo con la polietersulfona, pero ambas membranas parecen provocar una protección del tejido endotelial a largo plazo.

El segundo objetivo de esta tesis fue evaluar parámetros relacionados con la activación monocitaria comparando distintas membranas de hemodiálisis. Se analizó la capacidad de las membranas para modificar el fenotipo de las células mononucleares circulantes, pudiendo influir así, indirectamente, sobre el proceso de generación de daño vascular. Se evaluaron parámetros novedosos, aunque ya estudiados en publicaciones recientes, como el porcentaje de monocitos activados $CD14^+CD16^+$, o la producción de radicales libres por los monocitos, pero también otros parámetros en los que apenas hay estudios en el campo de la biocompatibilidad, como son la expresión de proteínas de shock térmico en monocitos.

En la primera parte de este estudio se comparó una nueva membrana sintética de diálisis, introducida de un modo relativamente reciente en el mercado, la polinefrona, con el triacetato de celulosa. Se eligió triacetato de celulosa por tratarse de una membrana de celulosa modificada con unas características especiales. Aparte de presentar un mejor perfil respecto a las membranas de celulosa no modificada en términos de biocompatibilidad, es la única membrana de diálisis derivada de la celulosa con gran porosidad, que es capaz de soportar los tratamientos en los que se aplica un mayor transporte convectivo, siendo la única membrana de celulosa que se puede utilizar en la técnica de diálisis de alto flujo (Vienken 2006). La polinefrona es una membrana sintética compuesta por polietersulfona con un tamaño en sus poros que permite un alto aclaramiento de moléculas de mediano tamaño, evitando la pérdida de albúmina. Esta primera parte del estudio tuvo las características de un estudio piloto, en el que únicamente fueron incluidos 9 pacientes.

Tras analizar el efecto agudo de una única sesión de hemodiálisis con las 2 membranas en estudio sobre la activación monocitaria, no observamos cambios significativos en el porcentaje de monocitos activados $CD14^+CD16^+$ al finalizar la sesión de hemodiálisis con ninguna de ellas. En la literatura, se ha descrito una disminución transitoria de los monocitos $CD14^+CD16^+$

durante la sesión de hemodiálisis (Sester et al. 2001). A primera vista, esta disminución podría tener que ver con la leucopenia que habitualmente se produce durante el tratamiento con hemodiálisis, con una disminución general del recuento de leucocitos. En este sentido, habría que observar que la leucopenia observada con las dos membranas tampoco difirió significativamente.

Existen estudios que han evaluado con más profundidad este fenómeno, aunque son muy escasos los trabajos que comparan el comportamiento de diferentes membranas. Kaplow y Goffinet describieron por primera vez en 1968 la leucopenia transitoria que se produce en los primeros minutos de la hemodiálisis (Kaplow, Goffinet 1968). Esta leucopenia es más marcada con membranas derivadas de celulosa que con membranas sintéticas (Craddock et al. 1977b), y está relacionada con la activación de la vía alternativa del complemento y con la adhesión leucocitaria de forma transitoria en los capilares pulmonares (Toren, Goffinet & Kaplow 1970). Sin embargo, hay estudios que revelan que las membranas sintéticas no producen una activación tan marcada del complemento (Tabor et al. 1998, Combe et al. 1994, Kawabata et al. 1996), y por el contrario, sí producen una depleción transitoria importante del subtipo monocitario $CD14^+CD16^+$ intradiálisis, fenómeno que se especula que podría producirse por otros mecanismos. Los escasos estudios que se han hecho comparando diferentes membranas de hemodiálisis, muestran que no existen diferencias en la depleción transitoria de leucocitos $CD14^+CD16^+$ con membranas celulósicas (hemofan) y con membranas sintéticas (poliamida) (Sester et al. 2001). El estudio de Nockher y cols. confirmó que la población monocitaria que más marcadamente disminuía de forma transitoria durante la sesión de hemodiálisis era el subtipo de monocitos activados $CD14^+CD16^+$, frente al subtipo monocitario $CD14^{++}CD16^-$, que apenas descendía, y que es el más abundante en los sujetos sanos. Esta depleción de monocitos activados no se relacionaba con la activación del complemento, ya que este subtipo de monocitos es menos sensible a la activación del complemento que el subtipo de monocitos no activados $CD14^{++}CD16^-$, puesto que tienen una menor expresión de receptores del complemento CR3 (CD11b/CD18) y CR1 (CD35) (Nockher, Wiemer & Scherberich 2001). De hecho, se sabe que los monocitos activados $CD14^+CD16^+$ presentan un espectro de moléculas de adhesión claramente diferentes al de la población monocitaria normal $CD14^{++}CD16^-$. Según este estudio, la diferente expresión de moléculas de adhesión por cada subtipo monocitario influiría en la diferente depleción encontrada entre ambos subtipos monocitarios. Sester y cols. refieren que en este fenómeno podrían estar implicados no sólo los monocitos, sino también el tejido endotelial, expresando moléculas de adhesión y quimioquinas como ICAM-1 e IL-8. En un proceso inflamatorio local, se activan los monocitos y el endotelio conjuntamente. Sin embargo, durante la sesión de hemodiálisis, la activación monocitaria se produce de un modo no fisiológico, y podrían no estar activadas sinérgicamente las células endoteliales, lo que explicaría que la adhesión inicial de dichos monocitos al endotelio no produzca transmigración de los mismos, y

la depleción sea transitoria, volviendo paulatinamente los monocitos activados al torrente sanguíneo. Según esta teoría, se podría especular que la diferente velocidad de resolución de la monocitopenia transitoria producida durante la hemodiálisis tendría que ver con los diferentes grados de activación del tejido endotelial en cada individuo.

Se han vertido otras hipótesis intentando explicar los mecanismos y repercusión de la depleción transitoria de los monocitos CD14⁺CD16⁺ intradiálisis. Arnaout y cols. (Arnaout et al. 1985) refieren que durante la diálisis se producen cambios hormonales, tales como alteraciones en los niveles de glucocorticoides y catecolaminas, que podrían alterar la adhesión de los granulocitos *in vivo*. No se ha demostrado que sobre los monocitos pueda ocurrir lo mismo, pero sí se ha observado una supresión selectiva y reversible de los monocitos CD14⁺CD16⁺ tras la administración de glucocorticoides (Scherberich, Nockher 1999, Fingerle-Rowson et al. 1998). Según Kyrill y cols., estos monocitos podrían adherirse de forma transitoria a las placas de ateroma del sistema vascular, y contribuir de este modo a la progresión de la placa a través de la producción local de citoquinas, propiciando de este modo un incremento del riesgo cardiovascular (Rogacev et al. 2009).

Nuestros resultados no muestran diferencias significativas al finalizar la sesión de hemodiálisis respecto al porcentaje de monocitos activados CD14⁺ CD16⁺ con ninguna de las 2 membranas en estudio, lo que confirma que la posible reducción de este subtipo monocitario es transitoria y se recupera al finalizar la sesión con las 2 membranas.

La producción de ROS por parte de los monocitos no sufrió cambios significativos con el uso de ambos dializadores al finalizar la sesión de hemodiálisis respecto al inicio de la misma. Tampoco observamos modificaciones en la expresión de Hsp70 y Hsp90 en los monocitos con el triacetato de celulosa, pero sí con la polinefrona, apreciándose un aumento de Hsp70 y una disminución de Hsp90 al finalizar la sesión. Sabemos que las proteínas Hsp pueden encontrarse en el interior de las células, pero también se han detectado libres en suero. Los estudios realizados hasta ahora, conceden a estas proteínas una función diferente según su localización. De este modo, su función intracelular consiste en estabilizar y proteger al resto de proteínas intracelulares en situaciones de agresión celular (Welch 1993). Sin embargo, en el espacio extracelular, se consideran mediadores de la respuesta inflamatoria, relacionándose también con la generación de aterosclerosis (Xu 2002). Los estudios sobre las proteínas Hsp en pacientes en hemodiálisis son muy escasos. Sólo hemos encontrado dos trabajos en los que se haya evaluado el impacto de una única sesión de hemodiálisis sobre el contenido de estas proteínas. En ambos casos se utilizaron membranas de polisulfona. En uno de estos estudios se cuantificó el contenido sérico de las proteínas Hsp60 y Hsp90 (Musial et al. 2009), y en el otro, el contenido linfocitario de Hsp70 (Raj et al. 2007). En todos los casos las proteínas Hsp aumentaron al finalizar la sesión de hemodiálisis. En el primer estudio se interpretó el aumento en la

concentración de las proteínas Hsp extracelulares como una situación de estrés provocada por la sesión de hemodiálisis, a pesar de la utilización de una membrana biocompatible. En este estudio justificaban que el aumento en la concentración plasmática de las proteínas Hsp podría deberse a la interacción de las células sanguíneas con el dializador, lo que provocaría la pérdida de la integridad celular y la liberación de estas proteínas. También citan como posible factor de confusión la habitual disminución del volumen plasmático al finalizar la sesión de hemodiálisis, que contribuiría al aumento en la concentración de los elementos contenidos en dicho volumen. La implicación clínica de ese aumento en la concentración sérica de Hsp60 post-hemodiálisis podría ser un mayor efecto pro-inflamatorio. Según estos autores, el sistema de proteínas Hsp sería disfuncional en los pacientes en hemodiálisis y las proteínas Hsp podrían ser consideradas como nuevos marcadores de aterosclerosis (Musial et al. 2009). En el segundo estudio realizado con la polisulfona F70 de Fresenius, se observó un incremento al finalizar la sesión de hemodiálisis en la Hsp70 linfocitaria. En este caso, los autores interpretaron que este aumento en la Hsp70 linfocitaria contribuiría a atenuar el estrés celular y la apoptosis (Raj et al. 2007). El primer estudio refiere un aumento de Hsp en suero al finalizar la sesión de hemodiálisis. Sin embargo, nuestro estudio no cuantifica los niveles de Hsp circulantes, que son las Hsp que en diferentes trabajos se han relacionado con la respuesta inflamatoria y la generación de aterosclerosis en pacientes con enfermedad renal (Pockley et al. 2000, Xu et al. 2000, Wright et al. 2000). Nosotros evaluamos el contenido proteico de Hsp en células monocitarias, siendo los resultados concordantes con los del estudio en el que aumenta la Hsp70 linfocitaria al final de la diálisis con polisulfona (Raj et al. 2007). De este modo, el aumento proteico de Hsp70 que encontramos en monocitos podría indicar una mejor capacidad de protección frente al estrés en los monocitos de pacientes dializados con la polinefrona respecto a los dializados con el triacetato de celulosa. La disminución de la Hsp90 monocitaria al finalizar la sesión de hemodiálisis con polinefrona es difícil de interpretar, ya que es una proteína con diferentes efectos biológicos. Aparte de su actividad como estabilizadora de proteínas, se sabe que interviene en la producción de NO, y que también puede interferir en procesos infecciosos y cancerígenos (Eckl, Richter 2013). Se trata de un resultado que hemos obtenido en una muestra pequeña, de sólo 9 pacientes, no habiendo en la literatura resultados comparables, por lo que no podemos evaluar si la disminución de la Hsp90 al finalizar la sesión de hemodiálisis con polinefrona podría ser o no beneficioso.

Al evaluar el efecto crónico de 4 meses de tratamiento con cada uno de los 2 dializadores en estudio, las diferencias fueron muy llamativas a favor de la polinefrona respecto al triacetato de celulosa. La producción de ROS monocitaria y el porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺ disminuyeron significativamente, y de forma muy llamativa, con polinefrona. Existen estudios en la literatura que demuestran que la activación del complemento por membranas no biocompatibles induce la generación de ROS (Himmelfarb, Lazarus & Hakim

1991). No obstante, los escasos estudios que comparan el efecto de distintas membranas de diálisis sobre la producción de ROS, se han realizado evaluando sólo el efecto de una única sesión de hemodiálisis, sin obtener diferencias entre las membranas analizadas. Por ejemplo, Ward y cols. compararon el efecto del triacetato de celulosa (CT190G, Baxter) con el de la polisulfona (F80, Fresenius), obteniendo con ambas membranas una disminución en la producción de ROS linfocitaria al finalizar la sesión de hemodiálisis (Ward, Ouseph & McLeish 2003). En nuestro caso, una única sesión de hemodiálisis no modifica la producción de ROS monocitaria con ninguna de las 2 membranas evaluadas. Sin embargo, la utilización por un tiempo más prolongado de una membrana altamente biocompatible como la polinefrona, sí que podría disminuir la producción de ROS por parte de los monocitos frente al triacetato de celulosa.

También el porcentaje de monocitos activados $CD14^+CD16^+$ disminuyó de forma muy significativa tras 4 meses de tratamiento con polinefrona respecto a los 4 meses de tratamiento con triacetato de celulosa, corroborando el mejor perfil inflamatorio de los pacientes tras 4 meses de tratamiento con polinefrona, respecto al tratamiento con triacetato de celulosa.

En cuanto a la expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp90 en los monocitos, ambas proteínas aumentaron tras un tratamiento prolongado con polinefrona respecto al tratamiento con triacetato de celulosa, aunque sólo fue considerado estadísticamente significativo el aumento de la Hsp90. Como se ha indicado anteriormente, la mayor expresión de estas proteínas parece indicar una mayor capacidad de las células monocitarias para defenderse frente a situaciones de estrés, lo que indicaría también unos mejores resultados en este sentido del tratamiento con polinefrona respecto a triacetato de celulosa a largo plazo.

Tanto el triacetato de celulosa como la polinefrona se consideran dializadores de alta permeabilidad. No obstante, también se evaluó su capacidad para eliminar moléculas de pequeño y mediano tamaño. Respecto a las moléculas de pequeño tamaño, como la urea y la creatinina, ambos dializadores presentaron una capacidad similar de reducción de las mismas. Sin embargo, respecto a la tasa de reducción de β_2 -microglobulina, aunque no se obtuvieron diferencias significativas, sí se observó una tendencia a una mayor eliminación de β_2 -microglobulina con polinefrona. Como se explica a continuación con más detalle, la mayor eliminación de medianas moléculas podría tener relación con una disminución en la activación monocitaria.

La β_2 -microglobulina se considera una molécula de tamaño mediano, 11.800 Daltons, y es utilizada como parámetro para comparar la eliminación de este tipo de moléculas entre los distintos dializadores. Se encuentra en la superficie de todas las células nucleadas, y frecuentemente se asocia a la cadena polipeptídica de los antígenos HLA de histocompatibilidad clase I (Grey et al. 1973, Plesner, Bjerrum 1980). La β_2 -microglobulina es vertida al plasma

como consecuencia del recambio celular que se produce constantemente, y en los sujetos sanos, es eliminada por el riñón en una cantidad de 150 a 200 mg al día, siendo la concentración plasmática fisiológica de esta proteína de 1-2 mg/L (Stone, Hakim 1989, Karlsson et al. 1980, Schardijn, Stadius van Eps 1987). En pacientes sin función renal residual, la concentración plasmática de β_2 -microglobulina puede alcanzar hasta los 50 mg/L (Schardijn, Stadius van Eps 1987, Stein et al. 1991, Gejyo et al. 1986). También se ha relacionado el depósito de esta proteína con el desarrollo de amiloidosis en pacientes que han recibido tratamiento con hemodiálisis durante periodos prolongados. Varios estudios muestran una incidencia muy diferente de amiloidosis en los pacientes dependiendo del tipo de membrana de diálisis utilizado. De este modo, los pacientes tratados durante largo tiempo con membranas derivadas de la celulosa desarrollaron con más frecuencia esta enfermedad (Floege, Koch 1994, Van Ypersele de Strihou et al. 1991, Chanard et al. 1989, Miura et al. 1992, Hakim 1993). La relevancia de la concentración en suero de la β_2 -microglobulina es tal, que se ha sugerido como variable predictora de mortalidad de los pacientes en hemodiálisis (Cheung et al. 2006). Por ejemplo, en el estudio HEMO, la concentración media de β_2 -microglobulina pre-diálisis se asoció con la mortalidad de cualquier causa y se sugirió que podría ser utilizada como marcador en pacientes en tratamiento crónico con hemodiálisis.

Se ha demostrado ampliamente que el transporte convectivo conseguido con las membranas de alto flujo tiene un papel fundamental en la mayor eliminación de esta molécula (Floege et al. 1989). Sin embargo, parece que este no es el único factor que influye en la concentración de la β_2 -microglobulina plasmática. También tiene relevancia la diferente adsorción de la β_2 -microglobulina por los distintos dializadores. Otro factor importante es la función renal residual de los pacientes, que, por otro lado, también parece preservarse mejor con las membranas más biocompatibles. Varios estudios refieren que la biocompatibilidad de la membrana podría tener relevancia en otro fenómeno más complejo, que tendría que ver con un aumento en la liberación a la circulación de esta proteína por las células circulantes provocado por membranas no biocompatibles. Se ha demostrado en estudios *in vitro* una mayor liberación de β_2 -microglobulina por el contacto directo de monocitos con membranas derivadas de la celulosa, con un incremento en la activación del complemento (Schoels et al. 1993, Jahn et al. 1991). También se ha demostrado en cultivos de monocitos de pacientes tratados con diferentes membranas de diálisis, que en aquellos pacientes dializados con membranas que producían una mayor activación del complemento, se provocaba una mayor liberación de β_2 -microglobulina por los monocitos (Zaoui, Stone & Hakim 1990). Hay más estudios que corroboran este fenómeno, como el realizado por Traut y cols., que mostró un incremento en el contenido de β_2 -microglobulina en células sanguíneas de pacientes tratados con membranas de alto flujo (poliamida) respecto a membranas de bajo flujo (cuprofan), con una mayor concentración en plasma de β_2 -microglobulina con las membranas de bajo flujo. En este estudio, el incremento de

β_2 -microglobulina en plasma con las membranas de bajo flujo no fue debido a una mayor síntesis de la proteína, ya que no se objetivó un aumento en el ARN mensajero, por lo que se cree que podría deberse a una mayor liberación por parte de las células sanguíneas en los pacientes tratados con membranas de bajo flujo (Traut et al. 2007).

En nuestro estudio, la concentración plasmática de β_2 -microglobulina prediálisis no difirió significativamente tras 4 meses de tratamiento con triacetato de celulosa respecto al tratamiento 4 meses con polinefrona. Sin embargo, si se observó una tendencia a una mejor eliminación de β_2 -microglobulina con polinefrona, probablemente no significativa por el pequeño tamaño muestral. El resto de factores que influyen en la concentración plasmática de β_2 -microglobulina, no fueron analizados, por lo que no podemos inferir ninguna conclusión al respecto, salvo que no deben tener gran relevancia, ya que no hemos observado una modificación significativa en la concentración plasmática de β_2 -microglobulina comparando los 2 dializadores.

En este estudio también se evaluaron parámetros relacionados con la sesión de hemodiálisis, como la tensión arterial media de los pacientes y la ultrafiltración obtenida, sin observarse diferencias significativas. Se analizaron parámetros bioquímicos y hematológicos, entre ellos, parámetros que se relacionan con la inflamación como la ferritina y la PCR, así como métodos clásicos de evaluar la biocompatibilidad, como la leucopenia, evaluada comparando el recuento de leucocitos a los 30 minutos después de empezar la sesión de hemodiálisis respecto al inicio de la misma. No se observaron diferencias en ninguno de estos valores tras 4 meses de tratamiento con cada uno de los dos dializadores en estudio.

La segunda parte del segundo objetivo de esta tesis fue evaluar parámetros relacionados con la activación monocitaria comparando las membranas de diálisis con mejores características de las que disponemos en la actualidad. Para ello, se realizó un estudio experimental tipo ensayo clínico con grupo control, en el que se comparó el efecto sobre la activación monocitaria de dos membranas sintéticas de alta permeabilidad y de referencia en la actualidad, la helixona y la poliamida, con una membrana sintética relativamente nueva, la polinefrona. El polímero que constituye la helixona es el mismo que el de la polisulfona estándar, pero el espesor de la membrana y el diámetro interno de la fibra son menores, con un aumento en el tamaño de los poros, que se distribuyen de un modo más uniforme. La membrana de poliamida presenta regiones alternas de carga positiva y negativa sobre su superficie, lo que le confiere una mayor biocompatibilidad. El tamaño de los poros en esta membrana aumenta considerablemente desde el lado en contacto con la sangre hasta el lado del dializado.

El grupo control y el grupo en el que se cambió el dializador a polinefrona, fueron comparables en cuanto a características basales, etiología de la ERC y comorbilidad asociada.

El efecto agudo de una única sesión de hemodiálisis sobre los diferentes parámetros de activación monocitaria se evaluó por separado con cada uno de los 3 dializadores incluidos en el estudio, no obteniéndose diferencias al finalizar la sesión de diálisis respecto al inicio con ninguno de los 3 dializadores.

La producción de ROS fue similar con los 3 dializadores respecto al inicio de la sesión de hemodiálisis, teniendo todos ellos un comportamiento similar en este aspecto. Como se refiere anteriormente, los estudios que hemos encontrado en la literatura observan una mejoría del estrés oxidativo al finalizar la sesión de hemodiálisis, independientemente de la membrana utilizada. Ward y cols. compararon el efecto de 2 membranas de diálisis, triacetato de celulosa y polisulfona, obteniendo con ambas una disminución en la producción de ROS linfocitaria al finalizar la sesión, sin diferencias significativas entre una y otra (Ward, Ouseph & McLeish 2003). En este estudio se refiere que con la sesión de hemodiálisis se normalizaba la producción de ROS con ambas membranas, acompañándose este fenómeno con una disminución en la oxidación de algunas proteínas. Estos mismos autores refieren que con membranas de bajo flujo derivadas de la celulosa también disminuye la producción de ROS en neutrófilos al finalizar la sesión de hemodiálisis respecto al inicio (Jacobs et al. 1989). Himmerfarb y cols. observaron un aumento en las proteínas libres de grupos sulfidrilos postdiálisis en pacientes tratados con membranas de alto y bajo flujo. (Himmelfarb, McMonagle & McMenamin 2000). Según estos autores, el estrés oxidativo podría estar provocado por la retención de toxinas urémicas de bajo peso molecular, que se eliminarían durante la sesión de hemodiálisis, observándose una mejoría transitoria, ya que de nuevo la producción de ROS aumenta prediálisis. Los resultados de estos estudios no concuerdan con los resultados que nosotros obtuvimos, ya que no observamos una menor producción de ROS tras una única sesión de hemodiálisis con ninguno de los dializadores evaluados. Posiblemente se trate de un fenómeno complejo de analizar, y sería necesario hacer estudios más exhaustivos para dilucidar estos resultados, como por ejemplo análisis de la oxidación de lípidos o proteínas.

El porcentaje de monocitos activados $CD14^+CD16^+$ no cambió de forma significativa al finalizar la sesión de hemodiálisis respecto al inicio con ninguno de los tres dializadores en estudio. Sabemos que con las membranas derivadas de la celulosa se produce una leucopenia transitoria, con una disminución marcada de los monocitos $CD14^{++}CD16^-$, relacionada con la activación del complemento. Sin embargo, con la utilización de las membranas sintéticas altamente biocompatibles, este efecto se minimiza, pero se sigue produciendo un descenso muy llamativo de los monocitos activados $CD14^+CD16^+$ durante la sesión de hemodiálisis. Sester y cols. refieren una disminución de los monocitos activados $CD14^+CD16^+$ de un $83 \pm 9\%$ a los 30 minutos del inicio de la sesión en su trabajo (Sester et al. 2001). Sin embargo, en este mismo estudio refieren que el porcentaje de este subtipo monocitario alcanzaría los valores iniciales al

finalizar la sesión de hemodiálisis. Otros trabajos describen una recuperación más lenta de los monocitos CD14⁺CD16⁺, alcanzando los valores iniciales tras 6 horas de haber finalizado la sesión de hemodiálisis. Lo que ocurre con estos monocitos durante la sesión de hemodiálisis no se conoce. Se especula que podrían tener un destino similar al de los leucocitos que transitoriamente quedan secuestrados en el sistema venoso pulmonar con las membranas que activan el complemento, ya que este es el primer sistema vascular de bajo flujo al que llegarían tras la circulación extracorpórea (Sester et al. 2001). Otros autores proponen que, puesto que este subtipo de monocitos produce más citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α (Belge et al. 2002), o receptores como el CX3CR1 (Ancuta et al. 2003), relacionado con la aterogénesis, estos monocitos podrían adherirse temporalmente al endotelio disfuncional provocando una progresión de la aterosclerosis (Rogacev et al. 2009). Sester y cols. sugieren, como referimos anteriormente, que la velocidad de retorno de estos monocitos a la circulación dependería en cada individuo del grado de activación de su endotelio, siendo en los casos con mayor disfunción endotelial más lento el retorno (Sester et al. 2001). En nuestro caso, es muy probable que la depleción de esta población monocitaria se produzca con las 3 membranas estudiadas durante la sesión de hemodiálisis, tal y como se refiere en la literatura, pero al finalizar la misma, se restablecen los valores iniciales, y por esta razón, es posible que no observemos cambios.

También se evaluó la expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp90 monocitarias al finalizar la sesión de hemodiálisis respecto al inicio con las 3 membranas incluidas en el estudio. En esta ocasión, no se obtuvieron diferencias significativas con ninguna de las membranas, lo que difiere con los resultados que obtuvimos en el anterior estudio respecto a la expresión de Hsp70 monocitaria con polinefrona, ya que entonces sí se producía un aumento en la expresión de esta proteína al finalizar la sesión de hemodiálisis. Para explicar estas diferencias, habría que referir ciertas limitaciones de los estudios. En el primer caso, al tratarse de un estudio piloto, se trata de una muestra pequeña (n=9), con lo que los resultados obtenidos deben interpretarse con mayor cautela. Por otro lado, la evaluación de la expresión de esta proteína en los monocitos de pacientes se realiza mediante una técnica no estandarizada, lo que dificulta la reproducibilidad de los resultados. Para evitar en lo posible este efecto, se realizó el experimento por duplicado en cada ocasión, y se corrigió con la expresión de un pool de proteínas aisladas de un pool de monocitos, realizándose una media entre los resultados obtenidos por duplicado. A pesar de ello obtuvimos datos con cierta variabilidad. Con estos resultados podríamos concluir, que en nuestro caso no podemos confirmar que la sesión de hemodiálisis modifique el contenido monocitario de las proteínas Hsp, como otros estudios han sugerido.

En la última parte de este estudio se evaluó el efecto crónico de 4 meses de tratamiento con polinefrona, frente a 4 meses de tratamiento con las otras 2 membranas en estudio, helixona y poliamida, sobre los distintos parámetros de activación monocitaria.

Durante todo el estudio se realizaron las mismas determinaciones en un grupo control, en el que los pacientes mantuvieron tratamiento con su dializador basal, helixona o poliamida. Como era de esperar, en el grupo control no se apreciaron diferencias en ninguno de los parámetros analizados respecto a la activación monocitaria: producción de ROS, porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺ y expresión de Hsp70 y Hsp90 monocitaria.

Al comparar el efecto de la polinefrona con la helixona y poliamida tras 4 meses de tratamiento, no se obtuvieron diferencias significativas respecto a la producción de ROS, lo que indicaría que no se observan diferencias relevantes a largo plazo en este aspecto. Como se ha mencionado, no hemos encontrado en la literatura estudios que analicen este problema comparando el efecto de diferentes membranas a largo plazo. Nuestra única referencia es nuestro estudio anterior, comparando polinefrona con triacetato de celulosa, en el que sí observamos menor producción de ROS con polinefrona que con el triacetato de celulosa. Aunque se trata de un estudio piloto, con pocos pacientes, indicaría una superioridad de la membrana sintética polinefrona en este aspecto frente a triacetato de celulosa, pero no frente a otras membranas sintéticas, como helixona o poliamida.

Tampoco se obtuvieron diferencias significativas al comparar polinefrona frente a helixona y poliamida sobre la expresión monocitaria de Hsp70 y Hsp90 tras 4 meses tratamiento. Podríamos decir que en este sentido, no habría diferencias entre utilizar las diferentes membranas sintéticas. Sin embargo, si evaluamos globalmente los resultados comparándolos con el anterior estudio, en el que se comparó triacetato de celulosa con polinefrona, en este caso sí se obtuvo un aumento en la expresión monocitaria de Hsp70 y Hsp90 con polinefrona, aunque fue solamente significativo el incremento de Hsp90. En este caso, se podría considerar comparativamente mejor la polinefrona que el triacetato de celulosa, ya que la mayor expresión de estas proteínas indicaría una capacidad mejor preservada de la defensa de las células monocitarias frente al estrés con esta membrana. Generalizando estos resultados, podrían indicar un mejor comportamiento en este sentido de las membranas sintéticas frente a las membranas derivadas de la celulosa.

Finalmente, se cuantificó el porcentaje de monocitos activados CD14⁺CD16⁺ tras 4 meses de tratamiento con polinefrona frente a 4 meses de tratamiento con helixona y poliamida. En esta ocasión, sí observamos un menor porcentaje de monocitos activados con polinefrona frente a helixona o poliamida. También en este sentido se obtuvieron mejores resultados con polinefrona que con triacetato de celulosa.

No hay estudios en la literatura que comparen el porcentaje de monocitos activados en pacientes tratados durante un tiempo relativamente prolongado con diferentes membranas de diálisis. Únicamente hemos encontrado un estudio en el que se compara el porcentaje de estos monocitos en pacientes tratados con diferentes técnicas de hemodiálisis, como son la hemodiálisis de alto flujo convencional y la hemodiafiltración en línea, con alto transporte convectivo. En este caso, los pacientes tratados con hemodiafiltración en línea durante 4 meses presentaron una disminución significativa en el porcentaje de los monocitos CD14⁺CD16⁺, frente a los pacientes tratados con hemodiálisis de alto flujo. En este estudio todos los pacientes recibían tratamiento con la misma membrana de diálisis, la polisulfona HF80 de Fresenius, y se utilizaba líquido ultrapuro, según la recomendación de las guías, siendo los pacientes controles de si mismos. Se sugirió que la mejoría en el perfil inflamatorio de los pacientes podría deberse al mayor transporte convectivo conseguido con la hemodiafiltración (Carracedo et al. 2006). Más recientemente, se ha demostrado que, además de mejorar el perfil inflamatorio, la hemodiafiltración en línea con volúmenes elevados de recambio reduce la mortalidad de cualquier causa de los pacientes en hemodiálisis frente a la hemodiálisis de alto flujo convencional (Maduell et al. 2013, Ok et al. 2013, Grooteman et al. 2012). Esta mejoría en la supervivencia se especula que podría deberse a la mayor eliminación de toxinas urémicas de mediano tamaño conseguida con el alto transporte convectivo.

Como se ha mencionado anteriormente, la β_2 -microglobulina es una molécula de tamaño mediano que se elimina con más eficacia conforme aumenta el transporte convectivo. Las membranas de diálisis de alto flujo, con un poro más grande, característicamente permiten aumentar el transporte convectivo, frente a las membranas de bajo flujo, en las que tiene un papel preponderante la difusión. El beneficio sobre la supervivencia por la utilización de membranas de alto flujo frente a membranas de bajo flujo no pudo confirmarse en el estudio HEMO, salvo en el análisis secundario, en pacientes en hemodiálisis durante más de 3,7 años (Eknoyan et al. 2002). El estudio MPO, realizado posteriormente, mostró un beneficio en la supervivencia en los pacientes hipoalbuminémicos tratados con membranas de alto flujo, así como en un análisis post hoc, en los pacientes diabéticos (Locatelli et al. 2009).

Las membranas evaluadas en nuestros estudios fueron todas de alto flujo, incluido el triacetato de celulosa, pero, comparativamente, se obtuvo una mayor eliminación de β_2 -microglobulina con polinefrona respecto al resto. Sin embargo, los niveles plasmáticos de β_2 -microglobulina prediálisis no variaron con las diferentes membranas estudiadas.

Como se refiere con anterioridad, en la concentración plasmática de β_2 -microglobulina no influye únicamente el aclaramiento conseguido con las diferentes membranas, sino que hay que tener en cuenta otros factores, como la función renal residual, la diferente capacidad de adsorción de las membranas de diálisis, o la posible liberación por las células nucleadas de β_2 -

microglobulina. Sin embargo, la tasa de reducción de β_2 -microglobulina nos puede informar de un modo indirecto sobre la capacidad de eliminación de moléculas de mediano tamaño conseguida con los diferentes dializadores. La mayor capacidad de eliminación de β_2 -microglobulina indica una mayor capacidad de eliminación de medianas moléculas, lo que podría repercutir en disminuir el estado de inflamación crónica de los pacientes, concretamente, el porcentaje de monocitos activados $CD14^+CD16^+$, como se aprecia en nuestro estudio. Paralelamente, Maduell y cols. observan en su trabajo un incremento en el aclaramiento de medianas moléculas con la hemodiafiltración en línea, sin obtener una disminución en los niveles plasmáticos de la β_2 -microglobulina. Ellos sugieren que el beneficio en la supervivencia de los pacientes conseguido con la hemodiafiltración en línea dependería del aclaramiento de otras moléculas diferentes a la β_2 -microglobulina. Consideran que, con el alto transporte convectivo conseguido con la hemodiafiltración en línea, se eliminarían de un modo más eficaz moléculas de mediano tamaño y toxinas urémicas unidas a proteínas, lo que contribuiría a mejorar la funcionalidad endotelial, el estado de inflamación y las calcificaciones vasculares, consiguiéndose un efecto cardioprotector y una mejoría en la actividad del sistema inmunológico. En definitiva, esto explicaría la supervivencia más elevada obtenida con la hemodiafiltración en línea frente a la diálisis de alto flujo convencional (Maduell et al. 2013).

También en nuestro estudio se evaluaron parámetros relacionados con la hemodiálisis, como son la tensión arterial media y la ultrafiltración, así como parámetros hematológicos y bioquímicos en sangre. No se obtuvieron diferencias en ninguno de ellos, entre los que hay que destacar la β_2 -microglobulina plasmática prediálisis, y parámetros relacionados con el estado de inflamación, como la hemoglobina, la ferritina ó la PCR, entre el grupo control y el grupo de tratamiento.

Con respecto a este último bloque de resultados podríamos concluir que el efecto agudo de una única sesión de hemodiálisis con las 3 membranas estudiadas no modificó significativamente ninguno de los parámetros de activación monocitaria. Sin embargo, la diálisis durante 4 meses con polinefrona mejoró el perfil inflamatorio de los pacientes, con una disminución en el porcentaje de monocitos activados $CD14^+CD16^+$. Esta mejoría podría deberse a una mayor capacidad de esta membrana para eliminar moléculas de mediano tamaño.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La utilización de membranas altamente biocompatibles, como la polisulfona y la polietersulfona, parece condicionar una protección del tejido endotelial a largo plazo, pudiendo tratarse de un efecto acumulativo de la utilización continuada de estos dos dializadores de alta calidad. Quizás, el efecto beneficioso podría producirse en un plazo más corto de tiempo con la polietersufona.

Tras un plazo prolongado de tiempo se obtuvo una mejoría respecto a diferentes parámetros de activación monocitaria con polinefrona frente a triacetato de celulosa. Podría considerarse globalmente que las membranas sintéticas presentan un mejor comportamiento respecto a la activación monocitaria que las membranas de celulosa regenerada.

La diálisis durante un tiempo prolongado con polinefrona, mejoró el perfil inflamatorio de los pacientes, con una disminución en el porcentaje de monocitos activados $CD14^+CD16^+$, respecto a helixona y poliamida. Esta mejoría podría deberse a una mayor capacidad de esta membrana para eliminar moléculas de mediano tamaño, o bien, a una mayor biocompatibilidad de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Akiyama, M., Hideshima, T., Hayashi, T., Tai, Y.T., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Chauhan, D., Richardson, P., Munshi, N.C. & Anderson, K.C. 2003, "Nuclear factor-kappaB p65 mediates tumor necrosis factor alpha-induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein", *Cancer Research*, vol. 63, no. 1, pp. 18-21.
- Amiri, F., Viridis, A., Neves, M.F., Iglarz, M., Seidah, N.G., Touyz, R.M., Reudelhuber, T.L. & Schiffrin, E.L. 2004, "Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction", *Circulation*, vol. 110, no. 15, pp. 2233-2240.
- Amore, A., Cirina, P., Mitola, S., Peruzzi, L., Bonaudo, R., Gianoglio, B. & Coppo, R. 1997, "Acetate intolerance is mediated by enhanced synthesis of nitric oxide by endothelial cells", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 8, no. 9, pp. 1431-1436.
- Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S.K., Luscinskas, F.W. & Gabuzda, D. 2003, "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes", *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 12, pp. 1701-1707.
- Ancuta, P., Weiss, L. & Haeffner-Cavaillon, N. 2000, "CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics", *European Journal of Immunology*, vol. 30, no. 7, pp. 1872-1883.
- Andrew, P.J. & Mayer, B. 1999, "Enzymatic function of nitric oxide synthases", *Cardiovascular Research*, vol. 43, no. 3, pp. 521-531.
- Anker, S.D. & Coats, A.J. 1999, "Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation", *Chest*, vol. 115, no. 3, pp. 836-847.
- Arnaut, M.A., Hakim, R.M., Todd, R.F., 3rd, Dana, N. & Colten, H.R. 1985, "Increased expression of an adhesion-promoting surface glycoprotein in the granulocytopenia of hemodialysis", *The New England Journal of Medicine*, vol. 312, no. 8, pp. 457-462.
- Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C. & Calderwood, S.K. 2000, "HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine", *Nature Medicine*, vol. 6, no. 4, pp. 435-442.
- Atanasiu, V., Manolescu, B. & Stoian, I. 2007, "Hepcidin--central regulator of iron metabolism", *European Journal of Haematology*, vol. 78, no. 1, pp. 1-10.
- Avesani, C.M., Draibe, S.A., Kamimura, M.A., Colugnati, F.A. & Cuppari, L. 2004, "Resting energy expenditure of chronic kidney disease patients: influence of renal function and subclinical inflammation", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 44, no. 6, pp. 1008-1016.
- Axelsson, J., Rashid Qureshi, A., Suliman, M.E., Honda, H., Pecoits-Filho, R., Heimbürger, O., Lindholm, B., Cederholm, T. & Stenvinkel, P. 2004, "Truncal fat mass as a contributor to inflammation in end-stage renal disease", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 80, no. 5, pp. 1222-1229.

- Baraldi, P.G., Di Virgilio, F. & Romagnoli, R. 2004, "Agonists and antagonists acting at P2X7 receptor", *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 4, no. 16, pp. 1707-1717.
- Barreto, D.V., Barreto, F.C., Liabeuf, S., Temmar, M., Lemke, H.D., Tribouilloy, C., Choukroun, G., Vanholder, R., Massy, Z.A. & European Uremic Toxin Work Group (EUTox) 2010, "Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease", *Kidney International*, vol. 77, no. 6, pp. 550-556.
- Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T. & Ziegler-Heitbrock, L. 2002, "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF", *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 168, no. 7, pp. 3536-3542.
- Bemelmans, M.H., Gouma, D.J. & Buurman, W.A. 1993, "Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in a murine model", *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 150, no. 5, pp. 2007-2017.
- Bingel, M., Lonnemann, G., Koch, K.M., Dinarello, C.A. & Shaldon, S. 1988, "Plasma interleukin-1 activity during hemodialysis: the influence of dialysis membranes", *Nephron*, vol. 50, no. 4, pp. 273-276.
- Bingel, M., Lonnemann, G., Koch, K.M., Dinarello, C.A. & Shaldon, S. 1987, "Enhancement of in-vitro human interleukin-1 production by sodium acetate", *Lancet*, vol. 1, no. 8523, pp. 14-16.
- Bologa, R.M., Levine, D.M., Parker, T.S., Cheigh, J.S., Serur, D., Stenzel, K.H. & Rubin, A.L. 1998, "Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 32, no. 1, pp. 107-114.
- Bonomini, M., Sirolli, V., Settefrati, N., Stuard, S., Tropea, F., Di Liberato, L., Tetta, C. & Albertazzi, A. 1999, "Surface antigen expression and platelet neutrophil interactions in haemodialysis", *Blood Purification*, vol. 17, no. 2-3, pp. 107-117.
- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. & Charo, I.F. 1998, "Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis", *Nature*, vol. 394, no. 6696, pp. 894-897.
- Buhlin, K., Barany, P., Heimburger, O., Stenvinkel, P. & Gustafsson, A. 2007, "Oral health and pro-inflammatory status in end-stage renal disease patients", *Oral Health & Preventive Dentistry*, vol. 5, no. 3, pp. 235-244.
- Businaro, R., Profumo, E., Tagliani, A., Buttari, B., Leone, S., D'Amati, G., Ippoliti, F., Leopizzi, M., D'Arcangelo, D., Capoano, R., Fumagalli, L., Salvati, B. & Rigano, R. 2009, "Heat-shock protein 90: a novel autoantigen in human carotid atherosclerosis", *Atherosclerosis*, vol. 207, no. 1, pp. 74-83.
- Cai, W., Zhu, L., Chen, X., Uribarri, J. & Peppas, M. 2006, "Association of advanced glycoxidation end products and inflammation markers with thrombosis of arteriovenous grafts in hemodialysis patients", *American Journal of Nephrology*, vol. 26, no. 2, pp. 181-185.

- Carbo, C., Arderiu, G., Escolar, G., Fuste, B., Cases, A., Carrascal, M., Abian, J. & Diaz-Ricart, M. 2008, "Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 51, no. 4, pp. 603-612.
- Carracedo, J., Merino, A., Nogueras, S., Carretero, D., Berdud, I., Ramirez, R., Tetta, C., Rodriguez, M., Martin-Malo, A. & Aljama, P. 2006, "On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: A prospective, crossover study", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 17, no. 8, pp. 2315-2321.
- Carracedo, J., Ramirez, R., Martin-Malo, A., Rodriguez, M. & Aljama, P. 2002, "The effect of LPS, uraemia, and haemodialysis membrane exposure on CD14 expression in mononuclear cells and its relation to apoptosis", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 17, no. 3, pp. 428-434.
- Carracedo, J., Ramirez, R., Martin-Malo, A., Rodriguez, M. & Aljama, P. 1998, "Nonbiocompatible hemodialysis membranes induce apoptosis in mononuclear cells: the role of G-proteins", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 9, no. 1, pp. 46-53.
- Carracedo, J., Ramirez, R., Pintado, O., Gomez-Villamandos, J.C., Martin-Malo, A., Rodriguez, M. & Aljama, P. 1995, "Cell aggregation and apoptosis induced by hemodialysis membranes", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 6, no. 6, pp. 1586-1591.
- Carracedo, J., Ramirez, R., Soriano, S., Alvarez de Lara, M.A., Rodriguez, M., Martin-Malo, A. & Aljama, P. 2005, "Monocytes from dialysis patients exhibit characteristics of senescent cells: does it really mean inflammation? ", *Contributions to Nephrology*, vol. 149, pp. 208-218.
- Carrero, J.J., Chmielewski, M., Axelsson, J., Snaedal, S., Heimbürger, O., Barany, P., Suliman, M.E., Lindholm, B., Stenvinkel, P. & Qureshi, A.R. 2008, "Muscle atrophy, inflammation and clinical outcome in incident and prevalent dialysis patients", *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, vol. 27, no. 4, pp. 557-564.
- Carrero, J.J., Qureshi, A.R., Axelsson, J., Avesani, C.M., Suliman, M.E., Kato, S., Barany, P., Snaedal-Jonsdottir, S., Alvestrand, A., Heimbürger, O., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. 2007a, "Comparison of nutritional and inflammatory markers in dialysis patients with reduced appetite", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 85, no. 3, pp. 695-701.
- Carrero, J.J., Qureshi, A.R., Axelsson, J., Yilmaz, M.I., Rehnmark, S., Witt, M.R., Barany, P., Heimbürger, O., Suliman, M.E., Alvestrand, A., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. 2007b, "Clinical and biochemical implications of low thyroid hormone levels (total and free forms) in euthyroid patients with chronic kidney disease", *Journal of Internal Medicine*, vol. 262, no. 6, pp. 690-701.
- Carrero, J.J., Qureshi, A.R., Parini, P., Arver, S., Lindholm, B., Barany, P., Heimbürger, O. & Stenvinkel, P. 2009, "Low serum testosterone increases mortality risk among male dialysis patients", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 20, no. 3, pp. 613-620.

- Carrero, J.J. & Stenvinkel, P. 2009, "Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal", *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 4 Suppl 1, pp. S49-55.
- Chanard, J., Bindi, P., Lavaud, S., Toupance, O., Maheut, H. & Lacour, F. 1989, "Carpal tunnel syndrome and type of dialysis membrane", *BMJ (Clinical Research ed.)*, vol. 298, no. 6677, pp. 867-868.
- Chang, C.J., Ko, Y.S., Ko, P.J., Hsu, L.A., Chen, C.F., Yang, C.W., Hsu, T.S. & Pang, J.H. 2005, "Thrombosed arteriovenous fistula for hemodialysis access is characterized by a marked inflammatory activity", *Kidney International*, vol. 68, no. 3, pp. 1312-1319.
- Chen, L.P., Chiang, C.K., Chan, C.P., Hung, K.Y. & Huang, C.S. 2006, "Does periodontitis reflect inflammation and malnutrition status in hemodialysis patients?", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 47, no. 5, pp. 815-822.
- Cheung, A.K., Rocco, M.V., Yan, G., Leypoldt, J.K., Levin, N.W., Greene, T., Agodoa, L., Bailey, J., Beck, G.J., Clark, W., Levey, A.S., Ornt, D.B., Schulman, G., Schwab, S., Teehan, B. & Eknoyan, G. 2006, "Serum beta-2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients: results of the HEMO study", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 17, no. 2, pp. 546-555.
- Combe, C., Pourteu, M., de Precigout, V., Baquey, A., Morel, D., Potaux, L., Vincendeau, P., Beziau, J.H. & Aparicio, M. 1994, "Granulocyte activation and adhesion molecules during hemodialysis with cuprophane and a high-flux biocompatible membrane", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 24, no. 3, pp. 437-442.
- Cooney, R.N. & Shumate, M. 2006, "The inhibitory effects of interleukin-1 on growth hormone action during catabolic illness", *Vitamins and Hormones*, vol. 74, pp. 317-340.
- Cordeiro, A.C., Qureshi, A.R., Stenvinkel, P., Heimbürger, O., Axelsson, J., Barany, P., Lindholm, B. & Carrero, J.J. 2010, "Abdominal fat deposition is associated with increased inflammation, protein-energy wasting and worse outcome in patients undergoing haemodialysis", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 25, no. 2, pp. 562-568.
- Craddock, P.R., Fehr, J., Brigham, K.L., Kronenberg, R.S. & Jacob, H.S. 1977a, "Complement and leukocyte-mediated pulmonary dysfunction in hemodialysis", *The New England Journal of Medicine*, vol. 296, no. 14, pp. 769-774.
- Craddock, P.R., Fehr, J., Dalmaso, A.P., Brigham, K.L. & Jacob, H.S. 1977b, "Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 59, no. 5, pp. 879-888.
- De Mutsert, R., Grootendorst, D.C., Axelsson, J., Boeschoten, E.W., Krediet, R.T., Dekker, F.W. & NECOSAD Study Group 2008, "Excess mortality due to interaction between protein-energy wasting, inflammation and cardiovascular disease in chronic dialysis patients", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 23, no. 9, pp. 2957-2964.

- Descamps-Latscha, B., Herbelin, A., Nguyen, A.T., Roux-Lombard, P., Zingraff, J., Moynot, A., Verger, C., Dahmane, D., de Groote, D. & Jungers, P. 1995, "Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes", *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 154, no. 2, pp. 882-892.
- Dogra, C., Changotra, H., Wedhas, N., Qin, X., Wergedal, J.E. & Kumar, A. 2007, "TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 21, no. 8, pp. 1857-1869.
- Droge, W. 2002, "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiological Reviews*, vol. 82, no. 1, pp. 47-95.
- D'Uscio, L.V., Barton, M., Shaw, S. & Luscher, T.F. 2002, "Chronic ET(A) receptor blockade prevents endothelial dysfunction of small arteries in apolipoprotein E-deficient mice", *Cardiovascular Research*, vol. 53, no. 2, pp. 487-495.
- Eckl, J.M. & Richter, K. 2013, "Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new heights", *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 4, no. 4, pp. 157-165.
- Eknoyan, G., Beck, G.J., Cheung, A.K., Daugirdas, J.T., Greene, T., Kusek, J.W., Allon, M., Bailey, J., Delmez, J.A., Depner, T.A., Dwyer, J.T., Levey, A.S., Levin, N.W., Milford, E., Ornt, D.B., Rocco, M.V., Schulman, G., Schwab, S.J., Teehan, B.P., Toto, R. & Hemodialysis (HEMO) Study Group 2002, "Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis", *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 25, pp. 2010-2019.
- Enia, G., Panuccio, V., Cutrupi, S., Pizzini, P., Tripepi, G., Mallamaci, F. & Zoccali, C. 2007, "Subclinical hypothyroidism is linked to micro-inflammation and predicts death in continuous ambulatory peritoneal dialysis", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 22, no. 2, pp. 538-544.
- European Best Practice Guidelines Expert Group on Hemodialysis 2002, "European Best Practice Guidelines for Haemodialysis (Part I) Section III. Biocompatibility", *Nephrology Dialysis Transplantation*, [Online], vol. 17, no. suppl.7, pp. 32-44.
- Fingerle-Rowson, G., Angstwurm, M., Andreesen, R. & Ziegler-Heitbrock, H.W. 1998, "Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy", *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 112, no. 3, pp. 501-506.
- Floege, J., Granolleras, C., Deschodt, G., Heck, M., Baudin, G., Branger, B., Tournier, O., Reinhard, B., Eisenbach, G.M. & Smeby, L.C. 1989, "High-flux synthetic versus cellulosic membranes for beta 2-microglobulin removal during hemodialysis, hemodiafiltration and hemofiltration", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 4, no. 7, pp. 653-657.
- Floege, J. & Koch, K.M. 1994, "Beta 2-microglobulin associated amyloidosis and therapy with high flux hemodialysis membranes", *Clinical Nephrology*, vol. 42 Suppl 1, pp. S52-6.

- Fouque, D., Kalantar-Zadeh, K., Kopple, J., Cano, N., Chauveau, P., Cuppari, L., Franch, H., Guarnieri, G., Ikizler, T.A., Kaysen, G., Lindholm, B., Massy, Z., Mitch, W., Pineda, E., Stenvinkel, P., Trevino-Becerra, A. & Wanner, C. 2008, "A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease", *Kidney International*, vol. 73, no. 4, pp. 391-398.
- Frostedgard, J., Kjellman, B., Gidlund, M., Andersson, B., Jindal, S. & Kiessling, R. 1996, "Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein", *Atherosclerosis*, vol. 121, no. 1, pp. 93-103.
- Fuss, I.J., Kanof, M.E., Smith, P.D. & Zola, H. 2009, "Isolation of whole mononuclear Cells from peripheral blood and cord blood", *Current Protocols in Immunology*, , no. SUPPL. 85, pp. 7.1.1; 7.1.8.
- Galdiero, M., de l'Ero, G.C. & Marcatili, A. 1997, "Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins", *Infection and Immunity*, vol. 65, no. 2, pp. 699-707.
- Galli, F., Canestrari, F. & Buoncristiani, U. 1999, "Biological effects of oxidant stress in haemodialysis: the possible roles of vitamin E", *Blood Purification*, vol. 17, no. 2-3, pp. 79-94.
- Gangneux, C., Daveau, M., Hiron, M., Derambure, C., Papaconstantinou, J. & Salier, J.P. 2003, "The inflammation-induced down-regulation of plasma Fetuin-A (alpha2HS-Glycoprotein) in liver results from the loss of interaction between long C/EBP isoforms at two neighbouring binding sites", *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 20, pp. 5957-5970.
- Garcia, C.S., *Anatomía básica de los diferentes aparatos del cuerpo humano - Monografias.com*. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos81/anatomia-basica-cuerpo-humano/anatomia-basica-cuerpo-humano.shtml> [11/24/2014].
- Garibotto, G., Russo, R., Sofia, A., Ferone, D., Fiorini, F., Cappelli, V., Tarroni, A., Gandolfo, M.T., Vigo, E., Valli, A., Arvigo, M., Verzola, D., Ravera, G. & Minuto, F. 2008, "Effects of uremia and inflammation on growth hormone resistance in patients with chronic kidney diseases", *Kidney International*, vol. 74, no. 7, pp. 937-945.
- Garibotto, G., Sofia, A., Procopio, V., Villaggio, B., Tarroni, A., Di Martino, M., Cappelli, V., Gandolfo, M.T., Aloisi, F., De Cian, F., Sala, M.R. & Verzola, D. 2006, "Peripheral tissue release of interleukin-6 in patients with chronic kidney diseases: effects of end-stage renal disease and microinflammatory state", *Kidney International*, vol. 70, no. 2, pp. 384-390.
- Gejyo, F., Homma, N., Suzuki, Y. & Arakawa, M. 1986, "Serum levels of beta 2-microglobulin as a new form of amyloid protein in patients undergoing long-term hemodialysis", *The New England Journal of Medicine*, vol. 314, no. 9, pp. 585-586.
- Girndt, M., Heisel, O. & Kohler, H. 1999, "Influence of dialysis with polyamide vs haemophan haemodialysers on monokines and complement activation during a 4-month long-term study", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 14, no. 3, pp. 676-682.
- Gracia-Iguacel, C., Gonzalez-Parra, E., Perez-Gomez, M.V., Mahillo, I., Egado, J., Ortiz, A. & Carrero, J.J. 2013, "Prevalence of protein-energy wasting syndrome and its association

- with mortality in haemodialysis patients in a centre in Spain", *Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*, vol. 33, no. 4, pp. 495-505.
- Grey, H.M., Kubo, R.T., Colon, S.M., Poulik, M.D., Cresswell, P., Springer, T., Turner, M. & Strominger, J.L. 1973, "The small subunit of HL-A antigens is beta 2-microglobulin", *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 138, no. 6, pp. 1608-1612.
- Grooteman, M.P., van den Dorpel, M.A., Bots, M.L., Penne, E.L., van der Weerd, N.C., Mazairac, A.H., den Hoedt, C.H., van der Tweel, I., Levesque, R., Nube, M.J., ter Wee, P.M., Blankestijn, P.J. & CONTRAST Investigators 2012, "Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 23, no. 6, pp. 1087-1096.
- Grootendorst, D.C., de Jager, D.J., Brandenburg, V.M., Boeschoten, E.W., Krediet, R.T., Dekker, F.W. & NECOSAD Study Group 2007, "Excellent agreement between C-reactive protein measurement methods in end-stage renal disease patients--no additional power for mortality prediction with high-sensitivity CRP", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 22, no. 11, pp. 3277-3284.
- Gurland, H.J., Davison, A.M., Bonomini, V., Falkenhagen, D., Hansens, S., Kishimoto, T., Lysaght, M.J., Moran, J. & Valek, A. 1994, "Definitions and terminology in biocompatibility", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 9, no. SUPPL. 2, pp. 4-10.
- Hai, E., Ikura, Y., Naruko, T., Shirai, N., Yoshimi, N., Kayo, S., Sugama, Y., Fujino, H., Ohsawa, M., Tanzawa, K., Yokota, T. & Ueda, M. 2004, "Alterations of endothelin-converting enzyme expression in early and advanced stages of human coronary atherosclerosis", *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 649-654.
- Hakim, R.M. 1993, "Clinical implications of hemodialysis membrane biocompatibility", *Kidney International*, vol. 44, no. 3, pp. 484-494.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3 , repr edn, Clarendon Press; Oxford University Press, Oxford; New York.
- Hansson, G.K. 2009, "Inflammatory mechanisms in atherosclerosis", *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, vol. 7 Suppl 1, pp. 328-331.
- Heine, G.H., Ulrich, C., Seibert, E., Seiler, S., Marell, J., Reichart, B., Krause, M., Schlitt, A., Kohler, H. & Girndt, M. 2008, "CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients", *Kidney International*, vol. 73, no. 5, pp. 622-629.
- Hermans, M.M., Brandenburg, V., Ketteler, M., Kooman, J.P., van der Sande, F.M., Boeschoten, E.W., Leunissen, K.M., Krediet, R.T., Dekker, F.W. & Netherlands cooperative study on the adequacy of Dialysis (NECOSAD) 2007, "Association of serum fetuin-A levels with mortality in dialysis patients", *Kidney International*, vol. 72, no. 2, pp. 202-207.
- Herrero, J.A., Trobo, J.I., Torrente, J., Torralbo, A., Tornero, F., Cruceyra, A., Coronel, F. & Barrientos, A. 1994, "Hemodialysis with acetate, DL-lactate and bicarbonate: a hemodynamic and gasometric study", *Kidney International*, vol. 46, no. 4, pp. 1167-1177.

- Himmelfarb, J., Ault, K.A., Holbrook, D., Lamber, D.A. & Hakim, R.M. 1993, "Intradialytic granulocyte reactive oxygen species production: a prospective, crossover trial", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 4, no. 2, pp. 178-186.
- Himmelfarb, J., Lazarus, J.M. & Hakim, R. 1991, "Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 17, no. 3, pp. 271-276.
- Himmelfarb, J., McMonagle, E. & McMenamin, E. 2000, "Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure", *Kidney International*, vol. 58, no. 6, pp. 2571-2578.
- Hoher, B., Schwarz, A., Slowinski, T., Bachmann, S., Pfeilschifter, J., Neumayer, H.H. & Bauer, C. 2004, "In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin", *Journal of Hypertension*, vol. 22, no. 1, pp. 111-119.
- Hochleitner, B.W., Hochleitner, E.O., Obrist, P., Eberl, T., Amberger, A., Xu, Q., Margreiter, R. & Wick, G. 2000, "Fluid shear stress induces heat shock protein 60 expression in endothelial cells in vitro and in vivo", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 20, no. 3, pp. 617-623.
- Ihling, C., Szombathy, T., Bohrmann, B., Brockhaus, M., Schaefer, H.E. & Loeffler, B.M. 2001, "Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis", *Circulation*, vol. 104, no. 8, pp. 864-869.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I. & Utsumi, K. 2003, "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life", *Current Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 23, pp. 2495-2505.
- Iseki, K., Tozawa, M., Yoshi, S. & Fukiyama, K. 1999, "Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 14, no. 8, pp. 1956-1960.
- Jacobs, A.A., Jr, Ward, R.A., Wellhausen, S.R. & McLeish, K.R. 1989, "Polymorphonuclear leukocyte function during hemodialysis: relationship to complement activation", *Nephron*, vol. 52, no. 2, pp. 119-124.
- Jahn, B., Betz, M., Deppisch, R., Janssen, O., Hansch, G.M. & Ritz, E. 1991, "Stimulation of beta 2-microglobulin synthesis in lymphocytes after exposure to Cuprophan dialyzer membranes", *Kidney International*, vol. 40, no. 2, pp. 285-290.
- Jofre, R., Rodriguez-Benitez, P., Lopez-Gomez, J.M. & Perez-Garcia, R. 2006, "Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 17, no. 12 Suppl 3, pp. S274-80.
- Johansen, K.L., Kaysen, G.A., Young, B.S., Hung, A.M., da Silva, M. & Chertow, G.M. 2003, "Longitudinal study of nutritional status, body composition, and physical function in hemodialysis patients", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 77, no. 4, pp. 842-846.

- Justo, P., Sanz, A.B., Sanchez-Nino, M.D., Winkles, J.A., Lorz, C., Egido, J. & Ortiz, A. 2006, "Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK", *Kidney International*, vol. 70, no. 10, pp. 1750-1758.
- Kadiroglu, A.K., Kadiroglu, E.T., Sit, D., Dag, A. & Yilmaz, M.E. 2006, "Periodontitis is an important and occult source of inflammation in hemodialysis patients", *Blood Purification*, vol. 24, no. 4, pp. 400-404.
- Kaizu, Y., Ohkawa, S., Odamaki, M., Ikegaya, N., Hibi, I., Miyaji, K. & Kumagai, H. 2003, "Association between inflammatory mediators and muscle mass in long-term hemodialysis patients", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 42, no. 2, pp. 295-302.
- Kalantar-Zadeh, K., Block, G., McAllister, C.J., Humphreys, M.H. & Kopple, J.D. 2004, "Appetite and inflammation, nutrition, anemia, and clinical outcome in hemodialysis patients", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 80, no. 2, pp. 299-307.
- Kalantar-Zadeh, K., Kuwae, N., Wu, D.Y., Shantouf, R.S., Fouque, D., Anker, S.D., Block, G. & Kopple, J.D. 2006, "Associations of body fat and its changes over time with quality of life and prospective mortality in hemodialysis patients", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 83, no. 2, pp. 202-210.
- Kanaan, N., Goffin, E., Maisin, D., Struyven, J. & Jadoul, M. 2008, "CRP measurement: does the assay matter in hemodialysis patients?", *Clinical Nephrology*, vol. 70, no. 6, pp. 503-507.
- Kang, E.W., Nam, J.Y., Yoo, T.H., Shin, S.K., Kang, S.W., Han, D.S. & Han, S.H. 2008, "Clinical implications of subclinical hypothyroidism in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients", *American Journal of Nephrology*, vol. 28, no. 6, pp. 908-913.
- Kaplow, L.S. & Goffinet, J.A. 1968, "Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis", *JAMA*, vol. 203, no. 13, pp. 1135-1137.
- Karlsson, F.A., Groth, T., Sege, K., Wibell, L. & Peterson, P.A. 1980, "Turnover in humans of beta 2-microglobulin: the constant chain of HLA-antigens", *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 10, no. 4, pp. 293-300.
- Kato, A., Takita, T., Furuhashi, M., Maruyama, Y. & Hishida, A. 2006, "Association between seroprevalence of anti-chlamydial antibodies and long-term cardiovascular mortality in chronic hemodialysis patients", *Atherosclerosis*, vol. 188, no. 1, pp. 120-125.
- Kawabata, K., Nagake, Y., Shikata, K., Makino, H. & Ota, Z. 1996, "The changes of Mac-1 and L-selectin expression on granulocytes and soluble L-selectin level during hemodialysis", *Nephron*, vol. 73, no. 4, pp. 573-579.
- Ketteler, M., Bongartz, P., Westenfeld, R., Wildberger, J.E., Mahnken, A.H., Bohm, R., Metzger, T., Wanner, C., Jahn-Dechent, W. & Floege, J. 2003, "Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study", *Lancet*, vol. 361, no. 9360, pp. 827-833.
- Kim, D.K., Kim, H.J., Han, S.H., Lee, J.E., Moon, S.J., Kim, B.S., Kang, S.W., Choi, K.H., Lee, H.Y. & Han, D.S. 2008, "Chlamydia pneumoniae accompanied by inflammation is associated with the progression of atherosclerosis in CAPD patients: a prospective study for 3 years", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European*

- Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 23, no. 3, pp. 1011-1018.
- Kim, H.W., Yang, H.N., Kim, M.G., Choi, H.M., Jo, S.K., Cho, W.Y. & Kim, H.K. 2011, "Microinflammation in hemodialysis patients is associated with increased CD14CD16(+) pro-inflammatory monocytes: possible modification by on-line hemodiafiltration", *Blood Purification*, vol. 31, no. 4, pp. 281-288.
- Kishimoto, T. 1989, "The biology of interleukin-6", *Blood*, vol. 74, no. 1, pp. 1-10.
- Klinkmann, H., Baurmeister, U. & Davison, A.M. 1994, "The Consensus Conference on Biocompatibility.", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 9, no. suppl. 2, pp. 1-186.
- Kol, A., Bourcier, T., Lichtman, A.H. & Libby, P. 1999, "Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 103, no. 4, pp. 571-577.
- Kol, A., Lichtman, A.H., Finberg, R.W., Libby, P. & Kurt-Jones, E.A. 2000, "Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells", *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 164, no. 1, pp. 13-17.
- Kovacic, P. & Jacintho, J.D. 2001, "Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer", *Current Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 7, pp. 773-796.
- Kregel, K.G. 2002, "Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance", *Journal of Applied Physiology*, vol. 92, pp. 2177-2186.
- Kshirsagar, A.V., Craig, R.G., Moss, K.L., Beck, J.D., Offenbacher, S., Kotanko, P., Klemmer, P.J., Yoshino, M., Levin, N.W., Yip, J.K., Almas, K., Lupovici, E.M., Usvyat, L.A. & Falk, R.J. 2009, "Periodontal disease adversely affects the survival of patients with end-stage renal disease", *Kidney International*, vol. 75, no. 7, pp. 746-751.
- Landray, M.J., Wheeler, D.C., Lip, G.Y., Newman, D.J., Blann, A.D., McGlynn, F.J., Ball, S., Townend, J.N. & Baigent, C. 2004, "Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 43, no. 2, pp. 244-253.
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B. & Melzer, D. 2008, "Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults", *JAMA*, vol. 300, no. 11, pp. 1303-1310.
- Leavey, S.F., McCullough, K., Hecking, E., Goodkin, D., Port, F.K. & Young, E.W. 2001, "Body mass index and mortality in 'healthier' as compared with 'sicker' haemodialysis patients: results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS)", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 16, no. 12, pp. 2386-2394.
- Lee, P., Peng, H., Gelbart, T., Wang, L. & Beutler, E. 2005, "Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 6, pp. 1906-1910.

- Li, G., Hangoc, G. & Broxmeyer, H.E. 2004, "Interleukin-10 in combination with M-CSF and IL-4 contributes to development of the rare population of CD14+CD16++ cells derived from human monocytes", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 322, no. 2, pp. 637-643.
- Liao, D.F., Jin, Z.G., Baas, A.S., Daum, G., Gygi, S.P., Aebersold, R. & Berk, B.C. 2000, "Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 1, pp. 189-196.
- Locatelli, F., Martin-Malo, A., Hannedouche, T., Loureiro, A., Papadimitriou, M., Wizemann, V., Jacobson, S.H., Czekalski, S., Ronco, C., Vanholder, R. & Membrane Permeability Outcome (MPO) Study Group 2009, "Effect of membrane permeability on survival of hemodialysis patients", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 20, no. 3, pp. 645-654.
- Lonnemann, G. 1993, "Dialysate bacteriological quality and the permeability of dialyzer membranes to pyrogens", *Kidney International. Supplement*, vol. 41, pp. S195-200.
- Lonnemann, G., Koch, K.M., Shaldon, S. & Dinarello, C.A. 1988, "Studies on the ability of hemodialysis membranes to induce, bind, and clear human interleukin-1", *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 112, no. 1, pp. 76-86.
- Lopez-Gomez, J.M., Perez-Flores, I., Jofre, R., Carretero, D., Rodriguez-Benitez, P., Villaverde, M., Perez-Garcia, R., Nassar, G.M., Niembro, E. & Ayus, J.C. 2004, "Presence of a failed kidney transplant in patients who are on hemodialysis is associated with chronic inflammatory state and erythropoietin resistance", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 15, no. 9, pp. 2494-2501.
- Lopez-Ongil, S., Saura, M., Zaragoza, C., Gonzalez-Santiago, L., Rodriguez-Puyol, M., Lowenstein, C.J. & Rodriguez-Puyol, D. 2002, "Hydrogen peroxide regulation of bovine endothelin-converting enzyme-1", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 32, no. 5, pp. 406-413.
- Losito, A., Kalidas, K., Santoni, S. & Jeffery, S. 2003, "Association of interleukin-6 -174G/C promoter polymorphism with hypertension and left ventricular hypertrophy in dialysis patients", *Kidney International*, vol. 64, no. 2, pp. 616-622.
- Macdougall, I.C. & Cooper, A.C. 2005, "Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation", *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 35 Suppl 3, pp. 32-35.
- MacKenzie, A., Wilson, H.L., Kiss-Toth, E., Dower, S.K., North, R.A. & Surprenant, A. 2001, "Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding", *Immunity*, vol. 15, no. 5, pp. 825-835.
- Maddock, A.L. & Westenfelder, C. 1996, "Urea induces the heat shock response in human neuroblastoma cells", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 7, no. 2, pp. 275-282.
- Maduell, F., Moreso, F., Pons, M., Ramos, R., Mora-Macia, J., Carreras, J., Soler, J., Torres, F., Campistol, J.M., Martinez-Castelao, A. & ESHOL Study Group 2013, "High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 24, no. 3, pp. 487-497.

- Mambula, S.S. & Calderwood, S.K. 2006, "Heat induced release of Hsp70 from prostate carcinoma cells involves both active secretion and passive release from necrotic cells", *International Journal of Hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, vol. 22, no. 7, pp. 575-585.
- Martin Malo, A. & De Francisco, A.L.M. 2010, "Dializadores y membranas de dialisis" en *Nefrología al día*, ed. V. Lorenzo Sellarés, 1ª edn, Plus Medical Editorial Nefrología de la Sociedad Española de Nefrología, Badalona, pp. 425-435.
- Martinez-Miguel, P., Medrano-Andres, D., Lopes-Martin, V., Arribas-Gomez, I., Rodriguez-Puyol, M., Rodriguez-Puyol, D. & Lopez-Ongil, S. 2013, "Regulation of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) by the calcimimetic R-568", *Pharmacological Research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, vol. 76, pp. 106-118.
- Martin-Malo, A., Carracedo, J., Ramirez, R., Rodriguez-Benot, A., Soriano, S., Rodriguez, M. & Aljama, P. 2000, "Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 11, no. 5, pp. 936-942.
- Marzec, L., Zdrojewski, Z., Liberek, T., Bryl, E., Chmielewski, M., Witkowski, J.M. & Rutkowski, B. 2009, "Expression of Hsp72 protein in chronic kidney disease patients", *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, vol. 43, no. 5, pp. 400-408.
- Matata, B.M., Courtney, J.M., Sundaram, S., Wark, S., Bowry, S.K., Vienken, J. & Lowe, G.D. 1996, "Determination of contact phase activation by the measurement of the activity of supernatant and membrane surface-adsorbed factor XII (FXII): its relevance as a useful parameter for the in vitro assessment of haemodialysis membranes", *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 31, no. 1, pp. 63-70.
- Mayr, M., Metzler, B., Kiechl, S., Willeit, J., Schett, G., Xu, Q. & Wick, G. 1999, "Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumoniae: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis", *Circulation*, vol. 99, no. 12, pp. 1560-1566.
- Memoli, B., Postiglione, L., Cianciaruso, B., Bisesti, V., Cimmaruta, C., Marzano, L., Minutolo, R., Cuomo, V., Guida, B., Andreucci, M. & Rossi, G. 2000, "Role of different dialysis membranes in the release of interleukin-6-soluble receptor in uremic patients", *Kidney International*, vol. 58, no. 1, pp. 417-424.
- Merino, A., Buendia, P., Martin-Malo, A., Aljama, P., Ramirez, R. & Carracedo, J. 2011, "Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity", *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 186, no. 3, pp. 1809-1815.
- Merino, A., Nogueras, S., Buendia, P., Ojeda, R., Carracedo, J., Ramirez-Chamond, R., Martin-Malo, A. & Aljama, P. 2008a, "Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis", *Contributions to Nephrology*, vol. 161, pp. 83-88.
- Merino, A., Nogueras, S., Garcia-Maceira, T., Rodriguez, M., Martin-Malo, A., Ramirez, R., Carracedo, J. & Aljama, P. 2008b, "Bacterial DNA and endothelial damage in haemodialysis patients", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 23, no. 11, pp. 3635-3642.

- Merino, A., Portoles, J., Selgas, R., Ojeda, R., Buendia, P., Ocana, J., Bajo, M.A., del Peso, G., Carracedo, J., Ramirez, R., Martin-Malo, A. & Aljama, P. 2010, "Effect of different dialysis modalities on microinflammatory status and endothelial damage", *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 5, no. 2, pp. 227-234.
- Methe, H. & Weis, M. 2007, "Atherogenesis and inflammation--was Virchow right?", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 22, no. 7, pp. 1823-1827.
- Minamino, T., Kurihara, H., Takahashi, M., Shimada, K., Maemura, K., Oda, H., Ishikawa, T., Uchiyama, T., Tanzawa, K. & Yazaki, Y. 1997, "Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis", *Circulation*, vol. 95, no. 1, pp. 221-230.
- Miura, Y., Ishiyama, T., Inomata, A., Takeda, T., Senma, S., Okuyama, K. & Suzuki, Y. 1992, "Radiolucent bone cysts and the type of dialysis membrane used in patients undergoing long-term hemodialysis", *Nephron*, vol. 60, no. 3, pp. 268-273.
- Moe, S.M. & Chen, N.X. 2005, "Inflammation and vascular calcification", *Blood Purification*, vol. 23, no. 1, pp. 64-71.
- Morena, M., Delbosc, S., Dupuy, A.M., Canaud, B. & Cristol, J.P. 2005, "Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation", *Hemodialysis International. International Symposium on Home Hemodialysis*, vol. 9, no. 1, pp. 37-46.
- Movilli, E., Brunori, G., Camerini, C., Vizzardi, V., Gaggia, P., Cassamali, S., Scolari, F., Parrinello, G. & Cancarini, G.C. 2006, "The kind of vascular access influences the baseline inflammatory status and epoetin response in chronic hemodialysis patients", *Blood Purification*, vol. 24, no. 4, pp. 387-393.
- Mulvihill, J., Crost, T., Renaux, J.L. & Cazenave, J.P. 1997, "Evaluation of haemodialysis membrane biocompatibility by parallel assessment in an ex vivo model in healthy volunteers", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 12, no. 9, pp. 1968-1973.
- Muntinghe, F.L., Verduijn, M., Zuurman, M.W., Grootendorst, D.C., Carrero, J.J., Qureshi, A.R., Luttrupp, K., Nordfors, L., Lindholm, B., Brandenburg, V., Schalling, M., Stenvinkel, P., Boeschoten, E.W., Krediet, R.T., Navis, G. & Dekker, F.W. 2009, "CCR5 deletion protects against inflammation-associated mortality in dialysis patients", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 20, no. 7, pp. 1641-1649.
- Muntner, P., Hamm, L.L., Kusek, J.W., Chen, J., Whelton, P.K. & He, J. 2004, "The prevalence of nontraditional risk factors for coronary heart disease in patients with chronic kidney disease", *Annals of Internal Medicine*, vol. 140, no. 1, pp. 9-17.
- Musial, K., Szprynger, K., Szczepanska, M. & Zwolinska, D. 2010, "The heat shock protein profile in children with chronic kidney disease", *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, vol. 30, no. 2, pp. 227-232.
- Musial, K., Szprynger, K., Szczepanska, M. & Zwolinska, D. 2009, "Heat shock proteins in children and young adults on chronic hemodialysis", *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, vol. 24, no. 10, pp. 2029-2034.

- Musial, K. & Zwolinska, D. 2011, "Heat shock proteins in chronic kidney disease", *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, vol. 26, no. 7, pp. 1031-1037.
- Nadra, I., Mason, J.C., Philippidis, P., Florey, O., Smythe, C.D., McCarthy, G.M., Landis, R.C. & Haskard, D.O. 2005, "Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification?", *Circulation Research*, vol. 96, no. 12, pp. 1248-1256.
- Nascimento, M.M., Pecoits-Filho, R., Qureshi, A.R., Hayashi, S.Y., Manfro, R.C., Pachaly, M.A., Renner, L., Stenvinkel, P., Lindholm, B. & Riella, M.C. 2004, "The prognostic impact of fluctuating levels of C-reactive protein in Brazilian haemodialysis patients: a prospective study", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 19, no. 11, pp. 2803-2809.
- Nassar, G.M., Fishbane, S. & Ayus, J.C. 2002, "Occult infection of old nonfunctioning arteriovenous grafts: a novel cause of erythropoietin resistance and chronic inflammation in hemodialysis patients", *Kidney International. Supplement*, vol. (80), no. 80, pp. 49-54.
- Nguyen, A.T., Lethias, C., Zingraff, J., Herbelin, A., Naret, C. & Descamps-Latscha, B. 1985, "Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected in vivo and in vitro within microamounts of whole blood", *Kidney International*, vol. 28, no. 2, pp. 158-167.
- Nicolas, G., Viatte, L., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A. & Vaulont, S. 2002, "Hepcidin, a new iron regulatory peptide", *Blood cells, Molecules & Diseases*, vol. 29, no. 3, pp. 327-335.
- Nockher, W.A. & Scherberich, J.E. 1998, "Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis", *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 6, pp. 2782-2790.
- Nockher, W.A., Wiemer, J. & Scherberich, J.E. 2001, "Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ and CD14++ blood monocyte subsets", *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 123, no. 1, pp. 49-55.
- Noh, H., Lee, S.W., Kang, S.W., Shin, S.K., Choi, K.H., Lee, H.Y. & Han, D.S. 1998, "Serum C-reactive protein: a predictor of mortality in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients", *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, vol. 18, no. 4, pp. 387-394.
- Oberg, B.P., McMenamin, E., Lucas, F.L., McMonagle, E., Morrow, J., Ikizler, T.A. & Himmelfarb, J. 2004, "Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease", *Kidney International*, vol. 65, no. 3, pp. 1009-1016.
- Ohi, H., Tamano, M. & Sudo, S. 2001, "Cellulose membranes suppress complement activation in patients after hemodialysis", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 38, no. 2, pp. 384-389.
- Ojeda, R. & Aljama, P.A. 2008, "Chronic microinflammation and endothelial damage in uremia", *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, vol. 28, no. 6, pp. 583-586.

- Ok, E., Asci, G., Toz, H., Ok, E.S., Kircelli, F., Yilmaz, M., Hur, E., Demirci, M.S., Demirci, C., Duman, S., Basci, A., Adam, S.M., Isik, I.O., Zengin, M., Suleymanlar, G., Yilmaz, M.E., Ozkahya, M. & Turkish Online Haemodiafiltration Study 2013, "Mortality and cardiovascular events in online haemodiafiltration (OL-HDF) compared with high-flux dialysis: results from the Turkish OL-HDF Study", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 28, no. 1, pp. 192-202.
- Okumoto, S., Taniguchi, Y., Nakashima, A., Masaki, T., Ito, T., Ogawa, T., Takasugi, N., Kohno, N. & Yorioka, N. 2009, "C-C chemokine receptor 2 expression by circulating monocytes influences atherosclerosis in patients on chronic hemodialysis", *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*, vol. 13, no. 3, pp. 205-212.
- Pachaly, M.A., do Nascimento, M.M., Suliman, M.E., Hayashi, S.Y., Riella, M.C., Manfro, R.C., Stenvinkel, P. & Lindholm, B. 2008, "Interleukin-6 is a better predictor of mortality as compared to C-reactive protein, homocysteine, pentosidine and advanced oxidation protein products in hemodialysis patients", *Blood Purification*, vol. 26, no. 2, pp. 204-210.
- Papayianni, A., Alexopoulos, E., Giamalis, P., Gionanlis, L., Belechri, A.M., Koukoudis, P. & Memmos, D. 2002, "Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 17, no. 3, pp. 435-441.
- Paramo, J.A., Beloqui, O. & Diez, J. 2001, "Atherosclerosis: Is it time for a new name?", *Circulation*, vol. 104, no. 7, pp. E38.
- Parekh, R.S., Plantinga, L.C., Kao, W.H., Meoni, L.A., Jaar, B.G., Fink, N.E., Powe, N.R., Coresh, J. & Klag, M.J. 2008, "The association of sudden cardiac death with inflammation and other traditional risk factors", *Kidney International*, vol. 74, no. 10, pp. 1335-1342.
- Park, C.W., Shin, Y.S., Kim, C.M., Lee, S.Y., Yu, S.E., Kim, S.Y., Choi, E.J., Chang, Y.S. & Bang, B.K. 2002, "Increased C-reactive protein following hemodialysis predicts cardiac hypertrophy in chronic hemodialysis patients", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 40, no. 6, pp. 1230-1239.
- Pascual, M. & Schifferli, J.A. 1993, "Adsorption of complement factor D by polyacrylonitrile dialysis membranes", *Kidney International*, vol. 43, no. 4, pp. 903-911.
- Pecoits-Filho, R., Barany, P., Lindholm, B., Heimbürger, O. & Stenvinkel, P. 2002, "Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 17, no. 9, pp. 1684-1688.
- Pecoits-Filho, R., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. 2003, "End-stage renal disease: a state of chronic inflammation and hyperleptinemia", *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 33, no. 6, pp. 527-528.
- Peetermans, W.E., Raats, C.J., van Furth, R. & Langermans, J.A. 1995, "Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein induces tumor necrosis factor alpha and interleukin 6,

- reactive nitrogen intermediates, and toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages", *Infection and Immunity*, vol. 63, no. 9, pp. 3454-3458.
- Pérez García, R., González Parra, E. & Sociedad Española de Nefrología 2006, *Guías de Gestión de Calidad del Líquido de Diálisis (LD)*, Atrium Comunicación Estratégica, Badalona. Barcelona.
- Perez-Garcia, R., Anaya, F., Chisvert, J. & Valderrabano, F. 1995, "Association of high-flux dialysers and bacterial contamination of dialysate-induced chronic release of cytokines in haemodialysis patients", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 10, no. 11, pp. 2164-2166.
- Plesner, T. & Bjerrum, O.J. 1980, "Distribution of 'free' and HLA-associated human beta 2-microglobulin in some plasma membranes and biological fluids", *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 11, no. 3, pp. 341-351.
- Pockley, A.G. 2002, "Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease", *Circulation*, vol. 105, no. 8, pp. 1012-1017.
- Pockley, A.G., Wu, R., Lemne, C., Kiessling, R., de Faire, U. & Frostegard, J. 2000, "Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease", *Hypertension*, vol. 36, no. 2, pp. 303-307.
- Poole, S., Bird, T.A., Selkirk, S., Gaines-Das, R.E., Choudry, Y., Stephenson, S.L., Kenny, A.J. & Saklatvaa, J. 1990, "Fate of injected interleukin 1 in rats: sequestration and degradation in the kidney", *Cytokine*, vol. 2, no. 6, pp. 416-422.
- Port, F.K., Ashby, V.B., Dhingra, R.K., Roys, E.C. & Wolfe, R.A. 2002, "Dialysis dose and body mass index are strongly associated with survival in hemodialysis patients", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 13, no. 4, pp. 1061-1066.
- Pupim, L.B. & Ikizler, T.A. 2003, "Uremic malnutrition: new insights into an old problem", *Seminars in Dialysis*, vol. 16, no. 3, pp. 224-232.
- Qian, J., Yu, Z., Dai, H., Zhang, Q. & Chen, S. 1995, "Influence of hemodialysis membranes on gene expression and plasma levels of interleukin-1 beta", *Artificial Organs*, vol. 19, no. 8, pp. 842-846.
- R&D Systems 2014, *Reactive Oxygen Species (ROS)* Disponible en: http://www.rndsistemas.com/mini_review_detail_objectname_MR97_ROS.aspx11/17/2014
- Raj, D.S., Boivin, M.A., Dominic, E.A., Boyd, A., Roy, P.K., Rihani, T., Tzamaloukas, A.H., Shah, V.O. & Moseley, P. 2007, "Haemodialysis induces mitochondrial dysfunction and apoptosis", *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 37, no. 12, pp. 971-977.
- Raj, D.S., Dominic, E.A., Pai, A., Osman, F., Morgan, M., Pickett, G., Shah, V.O., Ferrando, A. & Moseley, P. 2005, "Skeletal muscle, cytokines, and oxidative stress in end-stage renal disease", *Kidney International*, vol. 68, no. 5, pp. 2338-2344.
- Ramirez, R., Carracedo, J., Berdud, I., Carretero, D., Merino, A., Rodriguez, M., Tetta, C., Martin-Malo, A. & Aljama, P. 2006, "Microinflammation in hemodialysis is related to a preactivated subset of monocytes", *Hemodialysis International. International Symposium on Home Hemodialysis*, vol. 10 Suppl 1, pp. S24-7.

- Ramirez, R., Carracedo, J., Merino, A., Nogueras, S., Alvarez-Lara, M.A., Rodriguez, M., Martin-Malo, A., Tetta, C. & Aljama, P. 2007, "Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport", *Kidney International*, vol. 72, no. 1, pp. 108-113.
- Ramirez, R., Carracedo, J., Merino, A., Soriano, S., Ojeda, R., Alvarez-Lara, M.A., Martin-Malo, A. & Aljama, P. 2011, "CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells", *Contributions to Nephrology*, vol. 171, pp. 57-61.
- Ramirez, R., Carracedo, J., Soriano, S., Jimenez, R., Martin-Malo, A., Rodriguez, M., Blasco, M. & Aljama, P. 2005, "Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 45, no. 2, pp. 353-359.
- Ramirez, R., Martin-Malo, A. & Aljama, P. 2011, "Evolution of the concept of biocompatibility and the cardioprotective effect of on-line hemodiafiltration", *Contributions to Nephrology*, vol. 175, pp. 110-116.
- Retzlaff, C., Yamamoto, Y., Hoffman, P.S., Friedman, H. & Klein, T.W. 1994, "Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures", *Infection and Immunity*, vol. 62, no. 12, pp. 5689-5693.
- Reuter, S., Bangen, P., Edemir, B., Hillebrand, U., Pavenstadt, H., Heidenreich, S. & Lang, D. 2009, "The HSP72 stress response of monocytes from patients on haemodialysis is impaired", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 24, no. 9, pp. 2838-2846.
- Rodriguez Bent, A., Hernandez Herrera, G. & Aljama Garcia, P. 2006, "Biocompatibilidad del proceso de hemodialisis" en *Tratado de Hemodiálisis*, ed. R. Jofré, 2 ed. actualizada edn, Editorial Médica Jims, Barcelona, pp. 183-199.
- Rogacev, K.S., Seiler, S., Zawada, A.M., Reichart, B., Herath, E., Roth, D., Ulrich, C., Fliser, D. & Heine, G.H. 2011, "CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease", *European Heart Journal*, vol. 32, no. 1, pp. 84-92.
- Rogacev, K.S., Ziegelin, M., Ulrich, C., Seiler, S., Girndt, M., Fliser, D. & Heine, G.H. 2009, "Haemodialysis-induced transient CD16+ monocytopenia and cardiovascular outcome", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 24, no. 11, pp. 3480-3486.
- Rollins, B.J. 1997, "Chemokines", *Blood*, vol. 90, no. 3, pp. 909-928.
- Rotondi, M., Netti, G.S., Rosati, A., Mazzinghi, B., Magri, F., Ronconi, E., Becherucci, F., Pradella, F., Salvadori, M., Serio, M., Romagnani, P. & Chiovato, L. 2008, "Pretransplant serum FT3 levels in kidney graft recipients are useful for identifying patients with higher risk for graft failure", *Clinical Endocrinology*, vol. 68, no. 2, pp. 220-225.
- Ruiz-Torres, M.P., Perez-Rivero, G., Rodriguez-Puyol, M., Rodriguez-Puyol, D. & Diez-Marques, M.L. 2006, "The leukocyte-endothelial cell interactions are modulated by extracellular matrix proteins", *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 17, no. 5-6, pp. 221-232.

- Saederup, N., Chan, L., Lira, S.A. & Charo, I.F. 2008, "Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis", *Circulation*, vol. 117, no. 13, pp. 1642-1648.
- Salzman, E.W. 1971, "Thrombosis in Artificial Organs", *Transplantation Proceedings*, [Online], vol. 3, no. 4, pp. 1491-1496.
- Sanz, A.B., Justo, P., Sanchez-Nino, M.D., Blanco-Colio, L.M., Winkles, J.A., Kretzler, M., Jakubowski, A., Blanco, J., Egido, J., Ruiz-Ortega, M. & Ortiz, A. 2008, "The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 19, no. 4, pp. 695-703.
- Sanz, A.B., Sanchez-Nino, M.D., Izquierdo, M.C., Jakubowski, A., Justo, P., Blanco-Colio, L.M., Ruiz-Ortega, M., Selgas, R., Egido, J. & Ortiz, A. 2010, "TWEAK activates the non-canonical NFkappaB pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21", *PLoS One*, vol. 5, no. 1, pp. e8955.
- Schafer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Muller-Esterl, W., Schinke, T. & Jahnke-Dechent, W. 2003, "The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 3, pp. 357-366.
- Schardijn, G.H. & Statius van Eps, L.W. 1987, "Beta 2-microglobulin: its significance in the evaluation of renal function", *Kidney international*, vol. 32, no. 5, pp. 635-641.
- Scherberich, J.E. & Nockher, W.A. 2000, "Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 15, no. 5, pp. 574-578.
- Scherberich, J.E. & Nockher, W.A. 1999, "CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC*, vol. 37, no. 3, pp. 209-213.
- Schett, G., Xu, Q., Amberger, A., Van der Zee, R., Recheis, H., Willeit, J. & Wick, G. 1995, "Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 96, no. 6, pp. 2569-2577.
- Schiffrin, E.L., Lipman, M.L. & Mann, J.F. 2007, "Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system", *Circulation*, vol. 116, no. 1, pp. 85-97.
- Schindler, R., Senf, R. & Frei, U. 2002, "Influencing the inflammatory response of haemodialysis patients by cytokine elimination using large-pore membranes", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 17, no. 1, pp. 17-19.
- Schoels, M., Jahn, B., Hug, F., Deppisch, R., Ritz, E. & Hansch, G.M. 1993, "Stimulation of mononuclear cells by contact with cuprophane membranes: further increase of beta 2-microglobulin synthesis by activated late complement components", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 21, no. 4, pp. 394-399.

- Schwedler, S., Schinzel, R., Vaith, P. & Wanner, C. 2001, "Inflammation and advanced glycation end products in uremia: simple coexistence, potentiation or causal relationship?", *Kidney International. Supplement*, vol. 78, pp. S32-6.
- Sester, U., Sester, M., Heine, G., Kaul, H., Girndt, M. & Kohler, H. 2001, "Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 16, no. 7, pp. 1402-1408.
- Sirolli, V., Ballone, E., Amoroso, L., Di Liberato, L., Di Mascio, R., Capelli, P., Albertazzi, A. & Bonomini, M. 1999, "Leukocyte adhesion molecules and leukocyte-platelet interactions during hemodialysis: effects of different synthetic membranes", *The International Journal of Artificial Organs*, vol. 22, no. 8, pp. 536-542.
- Stein, G., Schneider, A., Thoss, K., Ritz, E., Schaefer, K., Huller, M., Sperschneider, H. & Marzoll, I. 1991, "Beta 2-microglobulin serum concentration and associated amyloidosis in dialysis patients", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 6 Suppl 3, pp. 57-61.
- Stenvinkel, P. 2003, "Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease", *Journal of Renal Nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, vol. 13, no. 2, pp. 144-148.
- Stenvinkel, P., Heimbürger, O. & Jøgestrand, T. 2002, "Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid artery atherosclerosis in dialysis patients: association with Chlamydia pneumoniae seropositivity", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 39, no. 2, pp. 274-282.
- Stenvinkel, P., Heimbürger, O. & Lindholm, B. 2004, "Wasting, but not malnutrition, predicts cardiovascular mortality in end-stage renal disease", *Nephrology, Dialysis, Transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 19, no. 9, pp. 2181-2183.
- Stenvinkel, P., Heimbürger, O., Paultre, F., Diczfalusy, U., Wang, T., Berglund, L. & Jøgestrand, T. 1999, "Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure", *Kidney International*, vol. 55, no. 5, pp. 1899-1911.
- Stenvinkel, P., Ketteler, M., Johnson, R.J., Lindholm, B., Pecoits-Filho, R., Riella, M., Heimbürger, O., Cederholm, T. & Girndt, M. 2005, "IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly", *Kidney International*, vol. 67, no. 4, pp. 1216-1233.
- Stenvinkel, P., Lindholm, B., Heimbürger, M. & Heimbürger, O. 2000, "Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in pre-dialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease", *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 15, no. 10, pp. 1624-1630.
- Stenvinkel, P., Pecoits-Filho, R., Lindholm, B. & DialGene Consortium 2005a, "Gene polymorphism association studies in dialysis: the nutrition-inflammation axis", *Seminars in Dialysis*, vol. 18, no. 4, pp. 322-330.

- Stenvinkel, P., Wang, K., Qureshi, A.R., Axelsson, J., Pecoits-Filho, R., Gao, P., Barany, P., Lindholm, B., Jogestrand, T., Heimbürger, O., Holmes, C., Schalling, M. & Nordfors, L. 2005b, "Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin", *Kidney International*, vol. 67, no. 6, pp. 2383-2392.
- Stenvinkel, P., Wanner, C., Metzger, T., Heimbürger, O., Mallamaci, F., Tripepi, G., Malatino, L. & Zoccali, C. 2002, "Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage?", *Kidney International*, vol. 62, no. 5, pp. 1791-1798.
- Stone, W.J. & Hakim, R.M. 1989, "Beta-2-microglobulin amyloidosis in long-term dialysis patients", *American Journal of Nephrology*, vol. 9, no. 3, pp. 177-183.
- Stuehr, D.J. 1997, "Structure-function aspects in the nitric oxide synthases", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 37, pp. 339-359.
- Suliman, M.E., Heimbürger, O., Barany, P., Anderstam, B., Pecoits-Filho, R., Rodriguez Ayala, E., Qureshi, A.R., Fehrman-Ekholm, I., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. 2003, "Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in end-stage renal disease patients starting on dialysis therapy", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 14, no. 6, pp. 1614-1622.
- Sundaram, S., King, A.J. & Pereira, B.J. 1997, "Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing factor during hemodialysis: clinical determinants and role of different membranes", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 8, no. 3, pp. 463-470.
- Sydow, K. & Munzel, T. 2003, "ADMA and oxidative stress", *Atherosclerosis.Supplements*, vol. 4, no. 4, pp. 41-51.
- Tabor, B., Geissler, B., Odell, R., Schmidt, B., Blumenstein, M. & Schindhelm, K. 1998, "Dialysis neutropenia: the role of the cytoskeleton", *Kidney International*, vol. 53, no. 3, pp. 783-789.
- Tintut, Y., Patel, J., Territo, M., Saini, T., Parhami, F. & Demer, L.L. 2002, "Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro", *Circulation*, vol. 105, no. 5, pp. 650-655.
- Toren, M., Goffinet, J.A. & Kaplow, L.S. 1970, "Pulmonary bed sequestration of neutrophils during hemodialysis", *Blood*, vol. 36, no. 3, pp. 337-340.
- Torpy, D.J., Tsigos, C., Lotsikas, A.J., Defensor, R., Chrousos, G.P. & Papanicolaou, D.A. 1998, "Acute and delayed effects of a single-dose injection of interleukin-6 on thyroid function in healthy humans", *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 47, no. 10, pp. 1289-1293.
- Tracey, K.J. 2002, "The inflammatory reflex", *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 853-859.
- Traut, M., Haufe, C.C., Eismann, U., Deppisch, R.M., Stein, G. & Wolf, G. 2007, "Increased binding of beta-2-microglobulin to blood cells in dialysis patients treated with high-flux dialyzers compared with low-flux membranes contributed to reduced beta-2-microglobulin concentrations. Results of a cross-over study", *Blood Purification*, vol. 25, no. 5-6, pp. 432-440.

- Tsunoda, N., Kokubo, K., Sakai, K., Fukuda, M., Miyazaki, M. & Hiyoshi, T. 1999, "Surface roughness of cellulose hollow fiber dialysis membranes and platelet adhesion", *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*, vol. 45, no. 5, pp. 418-423.
- Ulrich, C., Heine, G.H., Gerhart, M.K., Kohler, H. & Girndt, M. 2008, "Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients", *American Journal of Transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, vol. 8, no. 1, pp. 103-110.
- Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapta, P. & Bilton, R.F. 2001, "Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1527, no. 3, pp. 161-166.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. 2006, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160, no. 1, pp. 1-40.
- Vallance, P., Collier, J. & Bhagat, K. 1997, "Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link?", *Lancet*, vol. 349, no. 9062, pp. 1391-1392.
- Van Snick, J. 1990, "Interleukin-6: an overview", *Annual Review of Immunology*, vol. 8, pp. 253-278.
- Van Ypersele de Strihou, C., Jadoul, M., Malghem, J., Maldague, B. & Jamart, J. 1991, "Effect of dialysis membrane and patient's age on signs of dialysis-related amyloidosis. The Working Party on Dialysis Amyloidosis", *Kidney International*, vol. 39, no. 5, pp. 1012-1019.
- Verbeelen, D., Jochmans, K., Herman, A.G., Van der Niepen, P., Sennesael, J. & De Waele, M. 1991, "Evaluation of platelets and hemostasis during hemodialysis with six different membranes", *Nephron*, vol. 59, no. 4, pp. 567-572.
- Vienken, J. 2006, "Membranas de diálisis" en *Tratado de Hemodiálisis*, ed. R. Jofré, 2 ed. actualizada edn, Editorial Médica Jims, Barcelona, pp. 99-133.
- Vienken, J., Diamantoglou, M., Hahn, C., Kamusewitz, H. & Paul, D. 1995, "Considerations on developmental aspects of biocompatible dialysis membranes", *Artificial Organs*, vol. 19, no. 5, pp. 398-406.
- Vincent, J.L., Vanherweghem, J.L., Degaute, J.P., Berre, J., Dufaye, P. & Kahn, R.J. 1982, "Acetate-induced myocardial depression during hemodialysis for acute renal failure", *Kidney International*, vol. 22, no. 6, pp. 653-657.
- Vom Saal, F.S. & Myers, J.P. 2008, "Bisphenol A and risk of metabolic disorders", *JAMA*, vol. 300, no. 11, pp. 1353-1355.
- Wang, A.Y., Sea, M.M., Tang, N., Sanderson, J.E., Lui, S.F., Li, P.K. & Woo, J. 2004a, "Resting energy expenditure and subsequent mortality risk in peritoneal dialysis patients", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 15, no. 12, pp. 3134-3143.
- Wang, A.Y., Wang, M., Woo, J., Lam, C.W., Lui, S.F., Li, P.K. & Sanderson, J.E. 2004b, "Inflammation, residual kidney function, and cardiac hypertrophy are interrelated and

- combine adversely to enhance mortality and cardiovascular death risk of peritoneal dialysis patients", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 15, no. 8, pp. 2186-2194.
- Wang, A.Y., Woo, J., Lam, C.W., Wang, M., Chan, I.H., Gao, P., Lui, S.F., Li, P.K. & Sanderson, J.E. 2005, "Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients", *Nephrology, Dialysis, Transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 20, no. 8, pp. 1676-1685.
- Wang, A.Y., Woo, J., Lam, C.W., Wang, M., Sea, M.M., Lui, S.F., Li, P.K. & Sanderson, J. 2003, "Is a single time point C-reactive protein predictive of outcome in peritoneal dialysis patients?", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 14, no. 7, pp. 1871-1879.
- Wang, T., Zhang, X. & Li, J.J. 2002, "The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses", *International Immunopharmacology*, vol. 2, no. 11, pp. 1509-1520.
- Wanner, C., Krane, V., Marz, W., Olschewski, M., Mann, J.F., Ruf, G., Ritz, E. & German Diabetes and Dialysis Study Investigators 2005, "Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis", *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 3, pp. 238-248.
- Ward, R.A., Ouseph, R. & McLeish, K.R. 2003, "Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress", *Kidney International*, vol. 63, no. 1, pp. 353-359.
- Welch, W.J. 1993, "How cells respond to stress", *Scientific American*, vol. 268, no. 5, pp. 56-64.
- Winkles, J.A. 2008, "The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting", *Nature Reviews. Drug discovery*, vol. 7, no. 5, pp. 411-425.
- Wright, B.H., Corton, J.M., El-Nahas, A.M., Wood, R.F. & Pockley, A.G. 2000, "Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease", *Heart and Vessels*, vol. 15, no. 1, pp. 18-22.
- Xu, Q. 2002, "Role of heat shock proteins in atherosclerosis", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 22, no. 10, pp. 1547-1559.
- Xu, Q., Schett, G., Perschinka, H., Mayr, M., Egger, G., Oberhollenzer, F., Willeit, J., Kiechl, S. & Wick, G. 2000, "Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population", *Circulation*, vol. 102, no. 1, pp. 14-20.
- Xu, Q., Schett, G., Seitz, C.S., Hu, Y., Gupta, R.S. & Wick, G. 1994, "Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells", *Circulation Research*, vol. 75, no. 6, pp. 1078-1085.
- Yang, Z. & Ming, X.F. 2006, "Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis", *Clinical Medicine & Research*, vol. 4, no. 1, pp. 53-65.
- Yilmaz, M.I., Carrero, J.J., Martin-Ventura, J.L., Sonmez, A., Saglam, M., Celik, T., Yaman, H., Yenicesu, M., Eyileten, T., Moreno, J.A., Egido, J. & Blanco-Colio, L.M. 2010, "Combined therapy with renin-angiotensin system and calcium channel blockers in type 2

- diabetic hypertensive patients with proteinuria: effects on soluble TWEAK, PTX3, and flow-mediated dilation", *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 5, no. 7, pp. 1174-1181.
- Zacho, J., Tybjaerg-Hansen, A., Jensen, J.S., Grande, P., Sillesen, H. & Nordestgaard, B.G. 2008, "Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease", *The New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 18, pp. 1897-1908.
- Zaoui, P.M., Stone, W.J. & Hakim, R.M. 1990, "Effects of dialysis membranes on beta 2-microglobulin production and cellular expression", *Kidney International*, vol. 38, no. 5, pp. 962-968.
- Zhang, D.X. & Gutterman, D.D. 2007, "Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells", *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 292, no. 5, pp. H2023-31.
- Zhang, L., Kao, W.H., Berthier-Schaad, Y., Plantinga, L., Fink, N., Smith, M.W. & Coresh, J. 2007, "C-Reactive protein haplotype predicts serum C-reactive protein levels but not cardiovascular disease risk in a dialysis cohort", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 49, no. 1, pp. 118-126.
- Ziegler-Heitbrock, L. 2007, "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation", *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, no. 3, pp. 584-592.
- Zimmermann, J., Herrlinger, S., Pruy, A., Metzger, T. & Wanner, C. 1999, "Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients", *Kidney International*, vol. 55, no. 2, pp. 648-658.
- Zoccali, C., Benedetto, F., Mallamaci, F., Tripepi, G., Cutrupi, S., Pizzini, P., Malatino, L.S., Bonanno, G. & Seminara, G. 2006, "Low triiodothyronine and cardiomyopathy in patients with end-stage renal disease", *Journal of Hypertension*, vol. 24, no. 10, pp. 2039-2046.
- Zoccali, C., Mallamaci, F. & Tripepi, G. 2003, "Inflammation and atherosclerosis in end-stage renal disease", *Blood Purification*, vol. 21, no. 1, pp. 29-36.
- Zoccali, C., Mallamaci, F., Tripepi, G., Cutrupi, S. & Pizzini, P. 2006, "Low triiodothyronine and survival in end-stage renal disease", *Kidney International*, vol. 70, no. 3, pp. 523-528.
- Zoccali, C., Mallamaci, F., Tripepi, G., Parlongo, S., Cutrupi, S., Benedetto, F.A., Bonanno, G., Seminara, G., Fatuzzo, P., Rapisarda, F. & Malatino, L.S. 2003, "Chlamydia pneumoniae, overall and cardiovascular mortality in end-stage renal disease (ESRD)", *Kidney International*, vol. 64, no. 2, pp. 579-584.
- Zoccali, C., Tripepi, G., Cutrupi, S., Pizzini, P. & Mallamaci, F. 2005, "Low triiodothyronine: a new facet of inflammation in end-stage renal disease", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 16, no. 9, pp. 2789-2795.
- Zoccali, C., Tripepi, G. & Mallamaci, F. 2006, "Dissecting inflammation in ESRD: do cytokines and C-reactive protein have a complementary prognostic value for mortality in dialysis patients?", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 17, no. 12 Suppl 3, pp. S169-73.

ANEXOS

**INFLUENCE OF POLYSULPHONE-DERIVED DIALYSIS MEMBRANES ON
THE INTERACTION OF CIRCULATING MONONUCLEAR CELLS WITH THE
ENDOTHELIUM. Patricia Martínez-Miguel et al.
Int J Artif Organs 2014;37(6):455-465**

ORIGINAL ARTICLE

Influence of polysulphone-derived dialysis membranes on the interaction of circulating mononuclear cells with the endothelium

Patricia Martínez-Miguel^{1,2}, Patricia de Sequera³, Álvaro Molina⁴, Victoria Oviedo⁵, Jesús Grande⁶, Cipriano Escaja⁶, Hugo Díaz⁶, Elisa Abreu⁷, Manuel Asensio⁸, Diego Rodríguez-Puyol^{1,2}
Susana López-Ongil²

¹ Nephrology Section, Príncipe de Asturias University Hospital, Alcalá de Henares, Madrid - Spain

² Research Unit of the Foundation for Biomedical Research, Príncipe de Asturias University Hospital, Alcalá de Henares, Madrid - Spain

³ Nephrology Section, Infanta Leonor Hospital, Vallecas, Madrid - Spain

⁴ Nephrology Section, Hospital of Segovia, Segovia - Spain

⁵ Nephrology Section, Río Carrión Hospital, Palencia - Spain

⁶ Nephrology Section, Virgen de la Concha Hospital, Zamora - Spain

⁷ Ponfederal Dialysis Center, Ponferrada, León - Spain

⁸ Nephrology Section, Soria Hospital, Soria - Spain

Purpose: Cardiovascular morbidity in hemodialysis (HD) patients may be influenced by the activation of circulating mononuclear cells (MCs) with subsequently increased endothelium interaction. The use of more biocompatible membranes would reduce this monocyte activation. We compare monocyte activation after using two different high-flux polymers, polysulphone and polyethersulphone.

Methods: The first part of the study was done with 10 patients who successively received dialysis for 2 weeks with polysulphone and polyethersulphone. The second part with 30 patients dialyzed for 3 months with polysulphone or polyethersulphone. Blood samples were taken before (pre-HD) and after (post-HD) the first HD session with each membrane to evaluate the effect of a single HD session. To assess acute and chronic effects of membranes, blood samples were taken pre-HD, after 2 weeks (first part of study) and after 3 months (second part of study). MCs were isolated from blood and then incubated with cultured human endothelial cells to evaluate MC adhesion, MC-dependent endothelial toxicity, and endothelial protein expressions of nitric oxide synthase and endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1).

Results: One single HD session did not induce any changes. Dialysis for 2 weeks (first part of study) with polyethersulphone reduced MC adhesion to endothelium, cellular toxicity, and ECE-1 protein expression compared to polysulphone or basal conditions. Dialysis for 3 months (second part of study) increased MC adhesion to endothelium, whereas cellular toxicity was decreased with both dialyzers compared to the basal situation.

Conclusions: Although polyethersulphone HD decreased the interaction of MC with the endothelium in short-term experiments, both membranes were comparable in the long-term.

Keywords: Dialysis membranes, Endothelium, Monocytes, Adhesion, Activation

Accepted: March 18, 2014

INTRODUCTION

Hemodialysis patients present a pro-inflammatory state that contributes to an increase in morbidity and mortality of cardiovascular origin. The relationship between inflammation and cardiovascular damage is now better explained, and it is widely accepted that inflammation causes endothelial injury, a critical event in the pathogenesis of vascular damage (1-3). The causes of inflammation in end-stage renal disease, particularly in hemodialysis patients, are multiple, and include the comorbidities of the patients, the increased plasma concentration of uremic toxins, and the consequences of exposing blood to hemodialysis components such as dialyzers and dialysis solutions (4-6).

The term biocompatibility was described taking into account the consequences of the interaction between dialysis components, especially dialysis membranes, and blood (7, 8). A low biocompatibility membrane is defined as a dialysis membrane that elicits an active inflammatory response by blood components. More biocompatible membranes share additional properties with endothelial cells and after being in contact with blood, the inflammatory response is significantly lessened (9, 10). Multiple biomarkers have been proposed to measure biocompatibility, from the initial descriptions of the changes in leukocyte counts elicited by low biocompatible membranes, to the systematic evaluation of multiple aspects of inflammation with different dialysis membranes, and significant information about biocompatibility markers has been generated (11-15). Recently, considering the relevance of circulating cells in the genesis of vascular damage in arteriosclerosis, monocyte activation has been evaluated in order to test biocompatibility. In this regard, researchers have described how exposure of blood to low biocompatibility dialysis membranes (16-19) or to lipopolysaccharide (20), a potential contaminant of dialysates, causes activation of circulating mononuclear cells, and a higher production of interleukin-1.

The measurement of activated monocytes provides valuable information concerning biocompatibility (18), but not regarding the consequences of this activation on vascular function. Previous studies have analyzed this problem by using monocyte-endothelial cell co-cultures. For instance, Ruiz-Torres et al reported that leukocyte-endothelial cell interaction is modulated by extracellular matrix proteins (21). Endothelium is the most active player in controlling leukocyte traffic (22). Endothelial cells show a characteristic pattern of adhesiveness to leukocytes. Under normal

conditions, the endothelium is mainly a non-adhesive barrier preventing leukocyte migration from blood vessels into the underlying tissues; only in cases of inflammation or damage is this barrier physiologically removed. The activation of the endothelium by cytokines (23) or vasoactive substances (24) promotes reorganization of the adhesion molecules leading to changes in leukocyte adhesion. We hypothesized that monocytes may not only be activated by dialysis membranes but may also be induced to interact with endothelial cells, with subsequent phenotypic changes such as variations in the synthesis of endothelial vasoactive factors.

Polyethersulphone is a high-flux dialysis membrane with chemical and structural differences compared to the conventional high-flux polysulphone membrane. Although it could be argued that these differences could determine different degrees of biocompatibility, the fact that the differences between these two membranes do not seem to be very relevant led us to hypothesize that the analysis of monocyte activation and vascular function could better reflect differences in biocompatibility than the analysis of classical biocompatibility markers, in which significant differences would not be expected. Thus, the study was designed to analyze the monocyte-dependent changes in endothelial function caused by dialysis with polyethersulphone in comparison with polysulphone.

METHODS

Study design

The study was performed in accordance with the Ethics Committee of each hospital; all patients included in the study signed an informed consent form. Criteria to include patients were the following: 1) patients on hemodialysis (HD) for at least 3 months and at least 18 years old, 2) patients clinically stable, and 3) patients with no serious illness, or in women, no possibility of pregnancy. Table I illustrates the baseline characteristics of patients.

The study consisted of two different parts. The first studied the acute effect and the second, the chronic effect of two different dialyzers on some blood parameters related to monocyte activation and vascular function. Table II illustrates the characteristics of the dialyzers used in the study. In the first part of the study, ten patients were included in order to assess the short-term effect (2 weeks) of the

TABLE I - BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS INCLUDED IN THE STUDY

Parameters	Acute effect	Chronic effect		p
		PSu	PES	
Number of patients	10	11	19	
Gender: male/female	5/5	4/7	12/7	0.16
Age (year); median (interquartile range)	70 (23)	72 (25)	73 (17)	0.44
Duration of dialysis treatment (min); median (interquartile range)	225 (29)	225 (30)	240 (30)	0.91
Dialysis vintage (months); median (interquartile range)	24 (23)	26 (25)	26.5 (25)	0.54
Arteriovenous fistula n (%)	8 (80)	7 (64)	16 (84)	0.19
Catheter n (%)	2 (20)	4 (36)	3 (16)	
Comorbidity n (%)				
Diabetes	3 (30)	1 (9)	7 (37)	0.19
Hypertension	4 (40)	10 (90)	15 (79)	0.63
Ischemic heart disease	1 (10)	0 (0)	5 (26)	0.13
ACVA	0 (0)	0 (0)	4 (21)	0.27
Peripheral vascular disease	3 (30)	2 (18)	4 (21)	1
Underlying renal disease n (%)				
Glomerulonephritis	4 (40)	5 (45)	4 (21)	
Nephroangiosclerosis	1 (10)	1 (9)	3 (16)	
Interstitial nephropathy	2 (20)	3 (27)	1 (5)	
Diabetic nephropathy	2 (20)	1 (9)	5 (26)	0.2
APKD	1 (10)	0	2 (11)	
Alport syndrome	0 (0)	0 (0)	1 (5)	
Unknown	0 (0)	1 (9)	3 (16)	
Previous dialyzer				
Cellulose derived	0	2	4	
Low-flux polysulphone	6	5	1	0.1
High-flux polysulphone	3	3	13	
Polyacrylonitrile	1	1	1	
Relevant Medication n (%)				
Antihypertensives	5 (50)	5 (45)	9 (47)	0.9
ACE inhibitors	2 (20)	2 (18)	5 (26)	0.7
Statins	2 (20)	4 (36)	10 (52)	0.1
Iron supplement	3 (30)	6 (54)	9 (47)	0.9
Erythropoietin	9 (90)	9 (82)	17 (89)	0.5
Phosphorus binders	6 (60)	11 (100)	13 (68)	0.1
Vitamin D supplement	2 (20)	4 (36)	7 (37)	0.9
Calcimimetics	2 (20)	3 (27)	4 (21)	0.6

The characteristics of patients included in the first part of the study are represented as Acute effect (on the left hand of the table) and the patients included in the second part of the study are represented as Chronic effect (on the right hand of the table) and divided into 2 groups according to membranes studied: high-flux polysulphone polymer (PSu) and high-flux polyethersulphone polymer (PES). The last column indicates the statistical analysis of chronic effect comparing PSu with PES.

TABLE II - CHARACTERISTICS OF THE DIALYZERS USED IN THE STUDY

Dialyzer name	Membrane polymer	Surface Area	Manufacturer	Sterilization mode	Ultrafiltration Coefficient (KUF) ml/h x mmHg
HF80	Polysulphone (PSu)	1.89 m ²	Fresenius Medical Care	INLINE steam	55
Pureflux 190H	Polyethersulphone (PES)	1.9 m ²	Nipro	Gamma dry ray	75

polyethersulphone and polysulphone dialyzers. Patients were sequentially and randomly treated with both dialyzers for two weeks, with a crossover study design, and allowing a two week wash-out period between each treatment, with their usual low-flux polysulphone dialyzer (F8; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany). In the second part of study, 30 patients were included from different Spanish hospitals to assess the chronic effect (3 months) of these dialyzers. Patients were dialyzed for three months with polysulphone (11 patients) or polyethersulphone (19 patients) according to the criteria set by the patient's nephrologist. The analysis of the water in the dialysis system always showed absence of bacteria (<100 CFU per milliliter) or bacteriological contaminant products (endotoxin levels <0.025 endotoxin units). Blood flow rate ranged from 200 ml/min to 400 ml/min. Anticoagulation was performed with a heparin bolus (1500-2500 IU) followed by a continuous heparin infusion (500-1 000 IU/h).

For all patients, blood samples were taken at baseline, before (pre-HD) and after (post-HD) the HD session, only on the first day that each membrane was used in order to evaluate the effect of a single HD session. To assess the chronic effects of each membrane, blood samples were collected pre-HD, after two weeks of HD (first part of study) and after three months of HD (second part of study). Blood was collected in order to measure urea and creatinine concentrations, isolate peripheral blood mononuclear cells, and calculate urea and creatinine reduction ratios. Blood pressure, ultrafiltration rate, and white blood cell count (measured under basal conditions and 30 min after starting the HD) were registered in all patients during the HD session.

Blood sampling and isolation of peripheral blood mononuclear cells

Blood samples were collected and allowed to coagulate at room temperature for 10 min. Peripheral blood MCs were isolated from whole blood by differential centrifugation

gradient with Ficoll (Comercial Rafer, Madrid, Spain) (25). MCs were isolated from each patient in order to assess the effect of the HD sessions in both parts of the study: the short-term effect after two weeks (first part of the study), and the chronic effect after three months (second part of the study). For this purpose, blood was diluted 1:2 with phosphate buffer saline (PBS) (139 mM NaCl, 8.66 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM NaH₂PO₄, pH 7), and was added slowly over the Ficoll reagent. Then, samples were centrifuged at 600 g for 45 min without active braking. The cottony layer containing MCs was carefully removed and washed with PBS. After centrifuging at 800 g for 15 min, cells were precipitated and collected in PBS in order to count the total number of MCs in each patient.

Human endothelial cell line

EA.hy926, a human endothelial cell line (EC), was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), and was used to analyze the effects induced by MCs from each patient at the endothelial level. The EC was grown in Dulbecco's Modified Eagle Media containing 4.5 g/l of glucose supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in a 5% CO₂ atmosphere (26). The culture media came from Pierce (Rockford, IL, USA). Experiments were routinely performed on confluent monolayers, made quiescent by serum deprivation.

A million MCs were added to a confluent monolayer of ECs, and the co-culture was incubated at 37°C for 24 h. After incubation, different parameters were measured: cellular toxicity, monocyte adhesion to the EC, and endothelial protein expression.

Measurement of cellular toxicity

After incubating the co-culture for 24 h, supernatants of cells were collected to assess cellular toxicity. Cellular

toxicity was evaluated under all experimental conditions by the trypan blue dye exclusion method and by the measurement of lactic dehydrogenase activity in the incubation media.

Monocyte adhesion to endothelial cells

After incubating the co-culture of MCs with the ECs for 24 h, cells were washed twice with PBS and then collected to assess monocyte adhesion to the EC by cytometry assay. Briefly, the ECs were incubated in duplicate with a monoclonal anti-human CD14 antibody conjugated to phycoerythrin, CD14-PE (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain), which specifically recognizes monocytes, for 30 min at room temperature in the dark. A negative control was done with the ECs incubated with the isotype of CD14-PE, a mouse IgG2a-PE antibody (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain), under the same conditions. After centrifugation at 1 500 rpm, cells were resuspended in 500 μ L PBS to be acquired in Flow Cytometry (FC 500; Beckman Coulter, CA, USA). The amount of MCs adhered to the ECs was determined as CD14-PE⁺.

Western blot assays

Proteins were obtained from the ECs after the incubation in co-culture with MCs from each patient for 24 h. Cells were washed twice with PBS and proteins were extracted using a Lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate) containing a protease inhibitors cocktail (Roche Diagnostics, Madrid, Spain). Protein concentration was determined with the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Proteins were separated on SDS-PAGE 6% (30 μ g protein/lane) and transferred onto nitrocellulose membranes (Pierce, Rockford, IL, USA). Membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline and Tween 20 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20) at room temperature, and then incubated for 90 min with 10 μ g/ml of the monoclonal anti-ECE-1 antibody (mAb AEC32-236 provided by Dr. Kohei Shimada, Biological Research Laboratories, Sankyo, Tokyo, Japan) or with 1:3000 dilution of monoclonal anti-eNOS antibody (BD Biosciences, Madrid, Spain). ECE-1 and eNOS antibodies were used to evaluate protein content of ECE-1 and eNOS, respectively (26). After washing in Tris-buffered saline and Tween 20, blots

were incubated with 200-fold-diluted horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Pierce, Rockford, IL, USA). The immunoreactive bands were visualized with the SuperSignal[®] West Pico detection system from Cytex (Pierce, Rockford, IL, USA) after 30 sec of exposure to CL-Xposure films (Pierce, Rockford, IL, USA). Blots were then reblotted with a rabbit anti-actin antibody (Sigma-Aldrich-Fluka Chemical, St Louis, MO, USA) in order to normalize ECE-1 and eNOS levels.

Statistical analysis

Non-parametric tests were used to compare groups. The Wilcoxon test was used to compare two related samples, the Friedman test to compare more than two related samples, the Mann-Whitney test to compare two independent samples and the Kruskal Wallis test to compare more than two independent samples. Data in graphs is expressed as mean and standard deviation, while data in tables include values expressed as median and interquartile ranges. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

In the first part of the study, which was performed to analyze the intra-dialysis and the short-term dialysis effect of two different dialyzers, no differences were observed in urea and creatinine reduction ratios (urea reduction ratio: polyethersulphone 71.7% (5.16); polysulphone 70.9% (5.2), creatinine reduction ratio: polyethersulphone 62.5% (8.7); polysulphone 61.3% (9.3)). The double pools Kt/V were also similar with both membranes: polyethersulphone 1.14 (0.27); polysulphone 1.24 (0.31). The acute effect of one single HD session is shown in Figure 1. A slight, but not significant decrease in monocyte adhesion to the ECs was observed with both dialyzers (Fig. 1A). There were also no changes in MC-induced EC toxicity (Fig. 1B), or in endothelial eNOS and ECE-1 protein expression after incubating the ECs with 1 million MCs from each patient (Figs. 1C and D). The acute effect of dialysis during two weeks with both dialyzers is shown in Figure 2.

Remarkably, after six HD sessions, a significant decrease in monocyte adhesion to the ECs was observed in samples from patients using polyethersulphone compared to polysulphone or under basal conditions (Fig. 2A). In addition, polyethersulphone induced a reduction in cellular toxicity

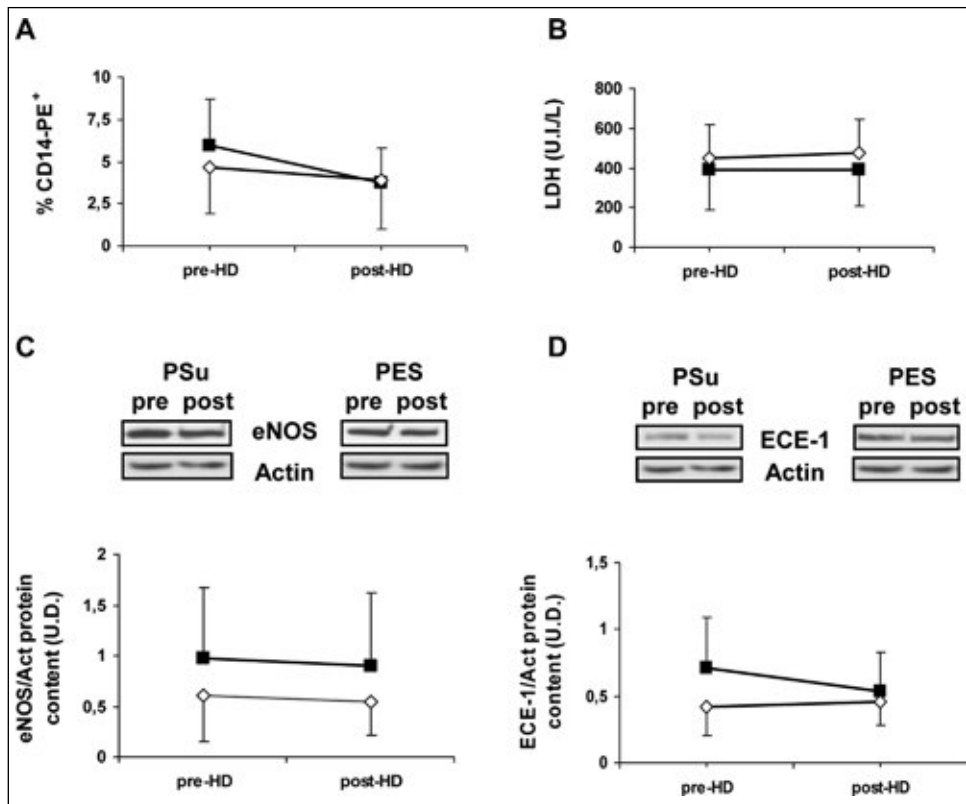


Fig. 1 - Acute effect of hemodialysis (HD) with two different membranes before (pre-HD) and after (post-HD) one HD session in the first part of the study. Monocyte cells (MC) isolated from each patient, were incubated for 24 h with cultured endothelial cells (EC). A) Monocyte adhesion to the EC was measured by flow cytometer after labeling the MC with CD14-PE antibody. B) Endothelial cell toxicity was measured as lactic dehydrogenase (LDH) levels released to culture media. C, D) eNOS and ECE-1 protein content was evaluated in EC protein extracts by Western blot using specific antibodies. In the upper part of panels C and D a representative Western-blot is shown, whereas in the lower part the densitometric analysis of all patients is given. Data are expressed as mean and standard deviation. High-flux polysulphone polymer (PSu) is represented by closed squares, and high-flux polyethersulphone polymer (PES) by open diamonds. Differences were considered significant at $p < 0.05$. No statistical differences were found in the acute effect of any measured parameters with PES or PSu membranes.

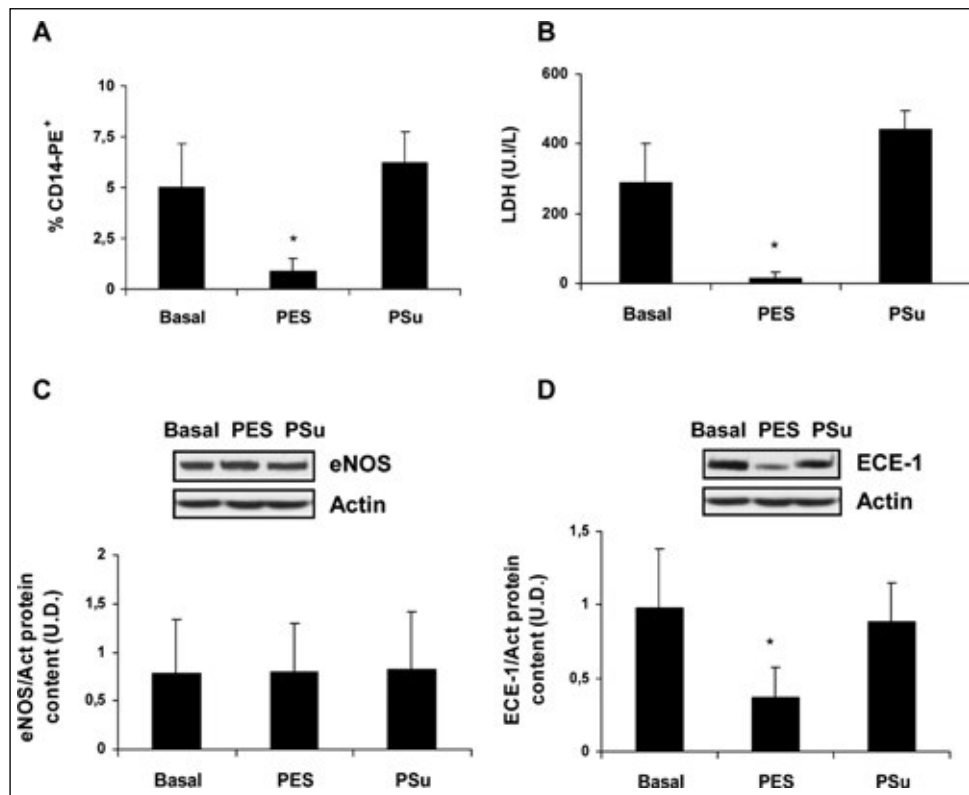


Fig. 2 - Effect of hemodialysis sessions for 15 days with two different high-flux polymers polyethersulphone (PES) and polysulphone (PSu). Monocyte cells (MC) were incubated for 24 h with cultured endothelial cells (EC). A) Monocyte adhesion to the EC was measured by flow cytometer after labeling the MC with CD14-PE antibody. B) Endothelial cell toxicity was measured as lactic dehydrogenase (LDH) levels released to culture media. C, D) eNOS and ECE-1 protein content was evaluated in EC protein extracts by Western blot using specific antibodies. In the upper part of panels C and D a representative Western-blot is shown, whereas in the lower part the densitometric analysis of all patients is given. Data are expressed as mean and standard deviation, and basal data express the mean value of the two basal determinations of each patient. * $p < 0.05$ vs. other groups.

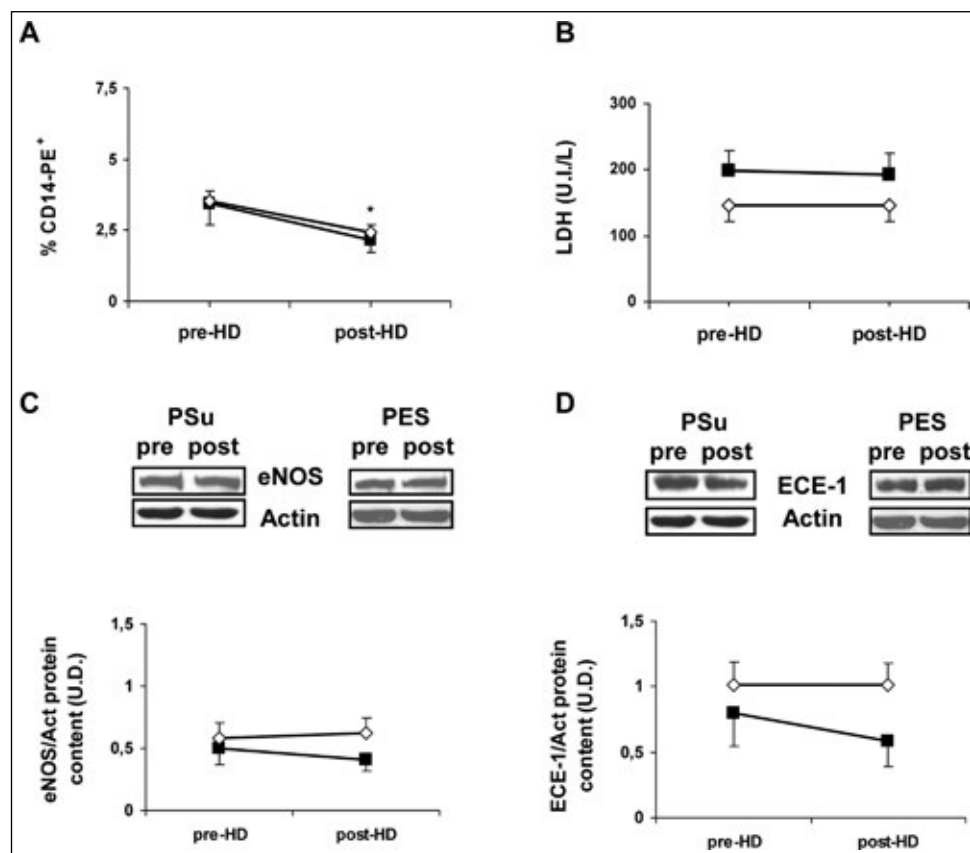


Fig. 3 - Acute effect of hemodialysis (HD) with two different membranes before (pre-HD) and after (post-HD) one HD session in the second part of the study. Monocyte cells (MC) were incubated for 24 h with cultured endothelial cells (EC). **A)** Monocyte adhesion to the EC was measured by flow cytometer after labeling the MC with CD14-PE antibody. **B)** Endothelial cell toxicity was measured as lactic dehydrogenase (LDH) levels released to culture media. **C, D)** eNOS and ECE-1 protein content was evaluated in EC protein extracts by Western blot using specific antibodies. In the upper part of panels C and D a representative Western-blot is shown, whereas in the lower part the densitometric analysis of all patients is given. Data are expressed as mean and standard deviation. High-flux polysulphone (PSu) is represented by closed squares, and high-flux polyethersulphone (PES) by open diamonds. * $p < 0.05$ vs. pre-HD.

compared to polysulphone or basal dialysis (Fig. 2B). Endothelial eNOS protein expression did not change under any of the experimental conditions (Fig. 2C), although polyethersulphone did induce a significant decrease in endothelial ECE-1 protein content compared to polysulphone or basal conditions (Fig. 2D). No differences were detected in basal values from the different parameters tested after the two-week wash-out dialysis periods with low-flux polysulphone membranes.

Findings from the second part of the study only partially confirmed the results found in the first short-term analysis. The effect of one single HD session was similar to that observed in the first study, with no changes in any of the parameters tested (Fig. 3). The chronic effect of dialysis during three months with both dialyzers is shown in Figure 4. A significant increase in monocyte adhesion to ECs was observed after three months of dialysis with both polyethersulphone and polysulphone compared to the basal situation (Fig. 4A), whereas cellular toxicity was significantly decreased with both dialyzers (Fig. 4B). Thus, in spite of increasing MC adhesion we found less

endothelial toxicity after treating the patients with the new membranes. None of the membranes significantly modified endothelial eNOS and ECE-1 protein content after three months (Figs. 4C and D). No differences were observed in any of the tested parameters between the two groups of patients after three months of dialysis (Fig. 4).

In general terms, there were no significant changes in mean blood pressure during the short-term and long-term studies with both membranes (Tab. III). The ultrafiltration rate showed no variations during the short-term studies; however, during the long-term studies, we observed a slight decrease in the ultrafiltration rate with polysulphone, which was not observed with polyethersulphone (Tab. III). The possible development of leukopenia, a classical parameter of biocompatibility assessment, was also measured: the reduction in the white blood cell count induced by both dialyzers was also comparable (% of reduction in the white cell count after 30 min of dialysis: 11.3% with polyethersulphone and 7.5% with polysulphone, $p = 0.80$).

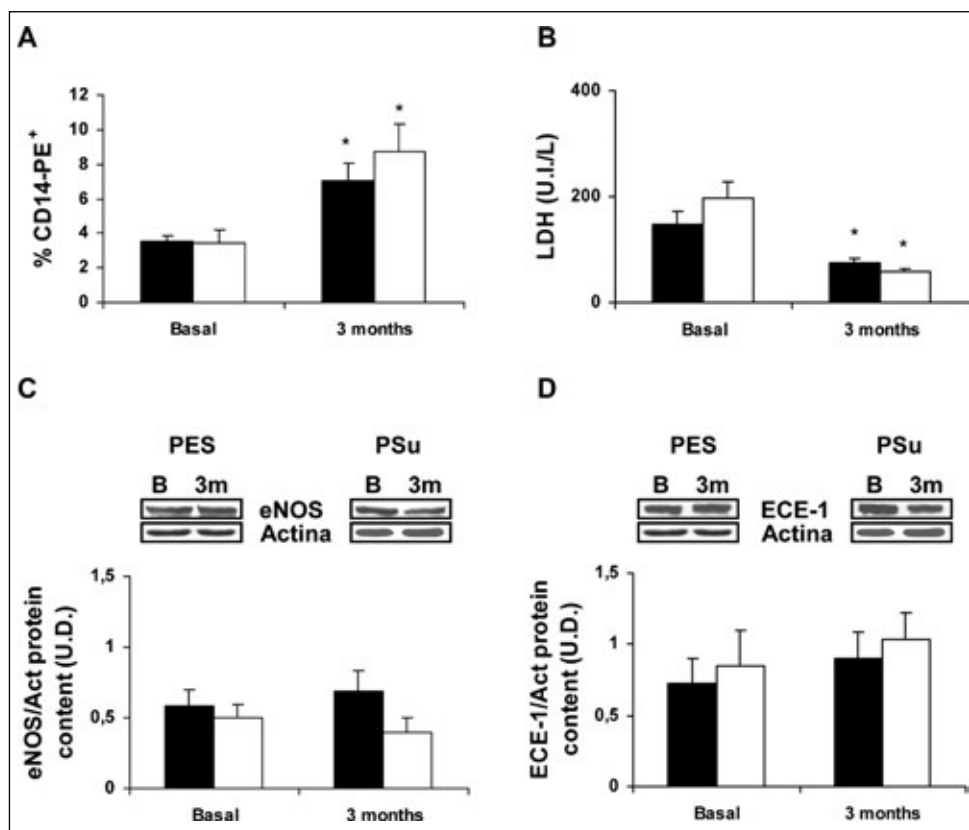


Fig. 4 - Effect of hemodialysis sessions for 3 months with two different polymers polyethersulphone and polysulphone. Monocyte cells (MC) were incubated for 24 h with cultured endothelial cells (EC). **A) Monocyte adhesion to the EC was measured by flow cytometer after labelling the MC with CD14-PE antibody. **B**) Endothelial cell toxicity was measured as lactic dehydrogenase (LDH) levels released to culture media. **C, D**) eNOS and ECE-1 protein content was evaluated in EC protein extracts by Western blot using specific antibodies. In the upper part of panels C and D a representative Western-blot is shown, whereas in the lower part the densitometric analysis of all patients is given. Data are expressed as mean and standard deviation. High-flux polyethersulphone (PES) is represented by closed bars, and high-flux polysulphone (PSu) by open bars. * $p < 0.05$ PES or PSu compared to basal.**

DISCUSSION

These experiments were carried out in order to analyze the consequences of the inflammatory process elicited by the lack of biocompatibility of hemodialysis membranes. Instead of studying the amount of inflammatory mediators in blood or the number of circulating activated cells, we evaluated the ability of potentially activated circulating mononuclear cells (MCs) to induce pathological changes in cultured endothelial cells (ECs). Circulating MCs were isolated from the blood of HD patients in which two high-flux membranes were used, a standard polysulphone and a polyethersulphone membrane. Three properties of these cells were then tested: adhesion to EC monolayers, the induction of EC damage, and the ability to modify the pattern of synthesis of endothelial vasoactive factors. We selected polysulphone polymers because they are one of the most widely used materials.

Other studies have been conducted to evaluate the role of microinflammation mediated by monocytes in endothelial damage in chronic kidney disease patients. For example, in order to study the effect of inflammatory products released

by activated CD14⁺CD16⁺ monocytes on ECs, a co-culture of these monocytes with human umbilical vein endothelial cells (HuVEC) grown in 24-well plates was developed by Merino et al (27). HuVECs showed an increased ROS activity and features of apoptosis, supporting the idea that oxidative stress induced by microinflammation in the EC is sufficient to induce endothelial injury (22). More recent studies confirm that CD14⁺CD16⁺ monocytes from chronic kidney disease patients show a high capacity of adhesion to the ECs (28).

The short-term effect observed in the first part of the study was that polyethersulphone induced significant changes in the bioactivity of circulating MCs. In comparison with basal values, obtained after two weeks of dialysis with low-flux polysulphone, the polyethersulphone membrane decreased the adhesion of MCs to the ECs, reduced the cellular toxicity induced by these MCs and modified the synthesis pattern of endothelial vasoactive factors, leading to a reduced expression of one of the proteins involved in endothelin synthesis, the ECE-1. These effects took place after two weeks of dialysis, but not acutely, suggesting that an accumulative beneficial effect must

TABLE III - PRE HAEMODIALYSIS MEAN BLOOD PRESSURE (MBP) AND ULTRAFILTRATION (UF) RATE OF PATIENTS INCLUDED IN THE FIRST AND SECOND PARTS OF THE STUDY

	MBP; median (interquartile range)	UF (ml/h); median (interquartile range)
Acute effect		
Basal	118 (25)	835 (232)
2 weeks PSu	111 (22)	789 (496)
2 weeks PES	108 (29)	775 (268)
<i>p</i>	0.3	0.83
Chronic effect		
PSu		
Basal	101 (33)	714 (305)
3 months	99 (28)	550 (333)
<i>p</i>	0.76	0.04
PES		
Basal	99 (16)	586 (409)
3 months	93 (24)	587 (370)
<i>p</i>	0.92	0.85

Acute effect represents patients included in the first short-term study who were dialysed two weeks with each membrane, high-flux polysulphone (PSu) and high-flux polyethersulphone (PES). Chronic effect represents patients included in the second part of the study where each group was dialysed with one membrane, PSu or PES, for 3 months.

be involved. In contrast, no changes were observed in the different parameters analyzed after polysulphone dialysis, suggesting that this dialysis membrane did not induce the same changes as polyethersulphone. It should be pointed out that, although the number of patients in the study was very limited, each patient served as his or her own control, and measurements were performed in every case after two weeks of dialysis with the same type of membrane.

Although these results support a possible beneficial effect of high-flux polysulphones, especially polyethersulphone, when considering the capacity of mononuclear circulating cells to damage the endothelium, hemodialysis contributes to the continuous induction of vascular damage. For this reason, we tested the effect of both membranes on a long-term basis, under standard clinical conditions. After three months, both high-flux dialyzers (polysulphone and polyethersulphone) induced a marked increase in the adhesion of MCs to the ECs; compared

to basal conditions, the endothelial damage also diminished significantly. No differences were observed at three months between the two dialyzers tested. At this point, it must be stressed that this part of the study was not randomized, and doctors prescribed dialyzers following their own criteria. In consequence, the final groups were highly unbalanced and, although the factors that we analyzed did not show any significant difference between the basal characteristics of the groups, we cannot be completely sure that groups were homogeneous. Considering these facts, some doubts may be raised with respect to the finding that the two dialyzers were completely comparable. However, both caused a marked decreased in MC adhesion and toxicity compared to basal conditions, and this result support the beneficial effect of dialysis with these two membranes.

It is difficult to provide a single explanation for the acute, short-term, and long-term effects of the tested membranes as well as the apparent discrepancy between adhesiveness and toxicity in the chronic experiments. Concerning the differences in the response times of both membranes, it seems obvious that an accumulative effect linked to the continuous use of these high quality dialyzers must be involved. Perhaps the beneficial effect takes place before, with the use of polyethersulphone, but both dialyzers (polyethersulphone and polysulphone) seem to protect ECs on a long-term basis. It would be more difficult to explain the fact that the increase in adhesiveness is associated with a decrease in toxicity. However, the regulation of these two effects takes place by different mechanisms (29-33) and it could be possible that MCs express more adhesion molecules and simultaneously exhibit a decreased cytotoxic activity. As in other studies, the beneficial effects observed could be due to the better biocompatibility or the increased clearance of toxic molecules, as patients were previously treated with other membranes or polymers.

To summarize, the present data demonstrates that the possible beneficial effects of dialysis can be evaluated by testing the ability of circulating cells to damage endothelial monolayers. With this approach, it seems that some polysulphone-derived polymers (polyethersulphone and polysulphone) prevent MC-dependent endothelial damage on a long term basis, but not adhesion to ECs. This beneficial effect may appear earlier with polyethersulphone than with polysulphone, while no differences are observed between them after three months.

ABBREVIATIONS

eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
ECE-1	Endothelin-Converting Enzyme-1
HD	Hemodialysis
EC	Human endothelial cell line, EA.hy926
MC	Peripheral blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Saline

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Kohei Shimada (Biological Research Laboratories, Sankyo, Tokyo, Japan) for providing monoclonal antibody against bovine ECE-1 (mAb AEC32-236).

Informed Consent: Informed consent was obtained from human subjects. The study complies with the Helsinki Declaration of 1975 and was approved by our Institutional Ethics Committee.

Financial Support: This work was supported by grants from the Health Research Fund (FIS)-FEDER [grants PI10/00181, PI11/01630], the FIS Network Program REDinREN [grant RD12/0021/0006], and Nipro Laboratories. SLO holds a contract from the Research Stabilization program of the FIS [CES07/032].

Conflict of Interest: None.

Meeting Presentations: 38th National Congress of the Spanish Society of Nephrology, San Sebastian, October 4-7, 2008, under the auspices of Nipro Laboratories.

Address for correspondence:
Susana López-Ongil, PhD
Unidad de Investigación
Fundación para la Investigación Biomédica, 5^oD
Hospital Universitario Príncipe de Asturias
Ctra. Alcalá-Meco s/n
28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
slorgil@salud.madrid.org

REFERENCES

1. Páramo JA, Beloqui O, Díez J. Atherosclerosis: Is it time for a new name? *Circulation*. 2001;104(7):E38.
2. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Inflammation and atherosclerosis in end-stage renal disease. *Blood Purif*. 2003;21(1):29-36.
3. Vallance P, Collier J, Bhagat K. Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet*. 1997;349(9062):1391-1392.
4. Jofré R, Rodríguez-Benitez P, López-Gómez JM, Pérez-García R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(12 Suppl 3):S274-S280.
5. Dinarello CA. Cytokines: agents provocateurs in hemodialysis? *Kidney Int*. 1992;41(3):683-694.
6. Burke F, Naylor MS, Davies B, Balkwill F. The cytokine wall chart. *Immunol Today*. 1993;14(4):165-170.
7. European Best Practice Guidelines Expert Group on Hemodialysis, European Renal Association. Section III. Biocompatibility. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(Suppl 7):32-44.
8. Wauters JP. Biocompatibility aspects of chronic hemodialysis and their clinical relevance. *Clin Nephrol*. 1995;44(Suppl 1):S19-S23.
9. Pascual M, Swinford RD, Tolkoff-Rubin N. Acute renal failure: role of dialysis membrane biocompatibility. *Annu Rev Med*. 1997;48:467-476.
10. Cheung AK. Biocompatibility of hemodialysis membranes. *J Am Soc Nephrol*. 1990;1(2):150-161.
11. Memoli B. Cytokine production in hemodialysis. *Blood Purif*. 1999;17(2-3):149-158.
12. Pascual M, Schifferli JA. Adsorption of complement factor D by polyacrylonitrile dialysis membranes. *Kidney Int*. 1993;43(4):903-911.
13. Himmelfarb J, Ault KA, Holbrook D, Leeber DA, Hakim RM. Intradialytic granulocyte reactive oxygen species production: a prospective, crossover trial. *J Am Soc Nephrol*. 1993;4(2):178-186.
14. Raj DS, Boivin MA, Dominic EA, et al. Haemodialysis induces mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(12):971-977.
15. Sester U, Sester M, Heine G, Kaul H, Girndt M, Köhler H. Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(7):1402-1408.
16. Martín-Malo A, Carracedo J, Ramírez R, et al. Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(5):936-942.
17. Carracedo J, Ramírez R, Pintado O, et al. Cell aggregation and apoptosis induced by hemodialysis membranes. *J Am Soc Nephrol*. 1995;6(6):1586-1591.
18. Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Rodríguez M, Aljama P. Nonbiocompatible hemodialysis membranes induce apoptosis in mononuclear cells: the role of G-proteins. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(1):46-53.
19. Carracedo J, Ramírez R, Madueño JA, et al. Cell apoptosis and hemodialysis-induced inflammation. *Kidney Int Suppl*. 2002;61:S89-S93. Review.

20. Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Rodríguez M, Aljama P. The effect of LPS, uraemia, and haemodialysis membrane exposure on CD14 expression in mononuclear cells and its relation to apoptosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17(3):428-434.
21. Ruíz-Torres MP, Pérez-Rivero G, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, Díez-Marqués ML. The leukocyte-endothelial cell interactions are modulated by extracellular matrix proteins. *Cell Physiol Biochem*. 2006;17(5-6):221-232.
22. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:827-872.
23. Masinovsky B, Urdal D, Gallatin WM. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol*. 1990;145(9):2886-2895.
24. Schmid-Schönbein GW, Usami S, Skalak R, Chien S. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc Res*. 1980;19(1):45-70.
25. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2009; Chapter 7:Unit 7.1.
26. Martínez-Miguel P, Medrano-Andrés D, Lopes-Martín V, et al. Regulation of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) by the calcimimetic R-568. *Pharmacol Res*. 2013; 76: 106-118.
27. Merino A, Noguerras S, Buendía P, et al. Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. *Contrib Nephrol*. 2008;161:83-88. Review.
28. Ramírez R, Carracedo J, Merino A, et al. CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contrib Nephrol*. 2011;171:57-61. Review.
29. Herter J, Zarbock A. Integrin regulation during leukocyte recruitment. *J Immunol*. 2013;190(9):4451-4457. Review
30. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1412-1418. Review.
31. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112(4):935-945. Review.
32. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood*. 2003;102(4):1515-1524.
33. Schubert SY, Benarroch A, Monter-Solans J, Edelman ER. Monocyte activation state regulates monocyte-induced endothelial proliferation through Met signaling. *Blood*. 2010; 115(16):3407-3412.

Copyright of International Journal of Artificial Organs is the property of Wichtig Editore and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

**EVALUATION OF A POLYNEPHRONE DIALYSIS MEMBRANE CONSIDERING
NEW ASPECTS OF BIOCOMPATIBILITY. Patricia Martínez-Miguel et al.
Int J Artif Organs. Aceptado Diciembre 2014.**

Evaluation of a polynephron dialysis membrane considering new aspects of biocompatibility

Patricia Martínez-Miguel^{1,2}, Patricia de Sequera³, Marta Albalate³, Diana Medrano², Rafael Sánchez-Villanueva⁴, Alvaro Molina⁵, Fernando Sousa⁶, Jesús Benito⁷, Jesús Nuñez⁸, Carmen Vozmediano⁹, Inés Aragoncillo¹⁰, Guillermina Barril¹¹, Diego Rodríguez-Puyol^{1,2}, Rafael Pérez-García³, Susana López-Ongil²

¹ Nephrology Section, Foundation for Biomedical Research, Príncipe de Asturias Hospital, Alcalá de Henares, Madrid - Spain

² Research Unit, Foundation for Biomedical Research, Príncipe de Asturias Hospital, Alcalá de Henares, Madrid - Spain

³ Nephrology Section, Infanta Leonor Hospital, Vallecas, Madrid - Spain

⁴ Nephrology Section, La Paz Hospital, Madrid - Spain

⁵ Nephrology Section, Segovia Hospital Complex, Segovia - Spain

⁶ Nephrology Section, Río Carrión Hospital, Palencia - Spain

⁷ Nephrology Section, Infanta Cristina Hospital, Madrid - Spain

⁸ Nephrology Section, Valladolid Hospital, Valladolid - Spain

⁹ Nephrology Section, Ciudad Real General Hospital, Ciudad Real - Spain

¹⁰ Nephrology Section, Infanta Sofía Hospital, Madrid - Spain

¹¹ Nephrology Section, La Princesa Hospital, Madrid - Spain

ABSTRACT

Purpose: The biocompatibility of dialyzers may influence the inflammatory state of hemodialysis patients. This study compares the effect of a high-flux polynephron membrane with other high-flux membranes, helixone and polyamide, on some inflammation biomarkers based on the analysis of circulating mononuclear cells (MC).

Methods: The study included 47 patients on hemodialysis with helixone and polyamide; 9 formed the control group, without changes in their dialyzers throughout the study, and 38 formed the intervention group, in which their dialyzers were replaced by polynephron. In both groups, blood samples were taken at the beginning of the study before and after hemodialysis session, and at the end of the study 4 months later. In each extraction, biochemical parameters were determined, and MC isolated using Ficoll gradient. Production of reactive oxygen species and the percentage of activated MC (CD14⁺CD16⁺) were measured by flow cytometry, and protein levels of heat-shock proteins (Hsp70/Hsp90) studied by Western blot.

Results: After 1 hemodialysis session with different membranes, no significant differences were observed in the different parameters considered. After 4 months of dialysis with polynephron, a significant reduction in the percentage of CD14⁺CD16⁺ and in the β_2 -microglobulin reduction ratio were found, with respect to helixone and polyamide, without changes in the other parameters analyzed.

Conclusions: The use of polynephron for 4 months reduces the percentage of CD14⁺CD16⁺ compared to helixone and polyamide, suggesting a better profile regarding activation of the inflammatory response. These findings could be explained by a better biocompatibility or an increased reduction of medium-sized toxic molecules.

Keywords: Activated monocytes, Biocompatibility, Dialysis membranes, Heat-shock proteins, Reactive oxygen species

Introduction

Patients with chronic kidney disease (CKD) present a higher rate in morbidity and mortality of cardiovascular origin than

the general population from the initial stages of the disease and this rate may be multiplied by 1000 in advanced stages (IV-V) of CKD and in renal replacement therapy (1). This high rate in morbidity and mortality can not be explained solely by classic cardiovascular risk factors such as diabetes, hypertension, smoking, hypercholesterolemia, and age. It is now considered that the pro-inflammatory state characteristic of these patients plays a fundamental role in the genesis of cardiovascular morbidity and mortality (2-4).

In general terms, the pro-inflammatory state of uremic patients may be attributed to two fundamental mechanisms: the retention of inflammatory mediators, perpetuated by the reduction of renal clearance by such patients; and the generation of new pro-inflammatory molecules, conditioned by different causative agents that concur in patients with CKD

Accepted: December 16, 2014

Published online:

Corresponding author:

Susana López-Ongil, PhD

Unidad de Investigación

Fundación para la Investigación Biomédica, 5^oD

Hospital Universitario Príncipe de Asturias

Ctra. Alcalá-Meco s/n. 28805

Alcalá de Henares, Madrid, Spain

slorgil@salud.madrid.org

(5, 6). The causes that may provoke inflammation in patients with CKD may be related to CKD itself and to the hemodialysis treatment. Among those related to CKD are the retention of pro-inflammatory molecules, chronic heart failure due to volume overload, infectious processes, and genetic and immunological factors. The causes associated with hemodialysis treatment are the use of vascular prostheses and catheters, the possible contamination of dialysate, and the bio-incompatibility grade of the dialysis system, especially the dialysis membrane.

The relationships between inflammation and cardiovascular damage have been widely explored, especially in the field of arteriosclerosis, and it is believed that endothelial dysfunction may be a key factor in the first phases of vascular damage, both in arteriosclerosis and in CKD. Recently, a potential pathogenic role has been attributed to circulating peripheral blood mononuclear cells (MC). These cells interact with the endothelium that lines the walls of the vessels, and subsequently go to different tissues (7, 8). In the presence of different pathological stimuli, such as oxidized LDL or uremia itself, these cells could be activated, interacting with the endothelium and inducing different degrees of endothelial dysfunction, even changing the phenotype of these cells. In uremic patients, Nguyen et al found an increase in the synthesis of reactive oxygen species (ROS) induced by MC (9). Other authors have also found an increase in the percentage of activated MC (CD14⁺CD16⁺) (10, 11) in uremic patients.

Less is known about the role of heat-shock proteins (Hsp) on the phenomenon of inflammation as generative of tissue damage. Hsp are constitutively present in all species and in all cell types. They are named according to their molecular weight, and their intracellular function consists of stabilizing and protecting the rest of the intracellular proteins in situations of cellular aggression (12). In these situations, Hsp are capable of binding to damaged peptides or proteins, assisting their repair or degradation. Hsp have also been detected at the level of the circulation, especially in the presence of cellular damage. In this context, various studies show the relationship between the circulating levels of Hsp60 and Hsp70, and the development of atherosclerosis (13-15).

The quality of dialysis membranes today is much better than some years ago, not only with respect to their dialyzing capacity but also to their biocompatibility. Classically, membrane biocompatibility was measured by analyzing the reduction of white blood cells or the complement activation in the

circulation (16-18). With the improvement of membranes, more sophisticated measurements of biocompatibility are being developed in order to detect the pro-inflammatory capacity of dialysis membranes with greater sensitivity and specificity (19-21). The present study was designed to compare the effect of 2 widely-used, high-flux dialysis membranes, helixone and polyamide, with a more recently developed high-flux membrane, polynephron, on some inflammation parameters such as the ROS production by MC and its phenotypic differentiation to CD14⁺CD16⁺ as well as to assess the protein levels of Hsp70 and Hsp90 in monocytes, which could constitute a marker of cellular stress.

Methods

Study design

The study was performed with a multi-center, prospective, randomized and controlled design. It was performed in accordance with the Ethics Committee of each hospital and all patients included in the study signed the informed consent. Criteria to include patients were the following: 1) they had been on hemodialysis (HD) with high-flux dialysis membranes (helixone or polyamide) for at least 3 months prior to starting the study, 2) they were at least 18 years old, 3) they were in a stable clinical situation and 4) they had no serious diseases or in women no possibility of pregnancy.

Patients were selected in a consecutive way every 5 patients: 4 were assigned to the intervention group and 1 to the control group. Control patients were studied in basal conditions and after 4 months of dialysis with the same high-flux dialysis membranes. In the intervention group, patients were evaluated in basal conditions and after 4 months of dialysis with a polynephron membrane. The characteristics of the dialyzers used are shown in Table I.

Dialysis conditions were kept stable in every patient. About 40% of patients were on "on-line" hemodiafiltration and this technique was maintained over the whole period of the study. The substitution volumes used were always between 20 L and 25 L per session in both groups. Blood flow rate ranged from 200 ml/min to 400 ml/min. Anticoagulation was performed using either sodium heparin or low molecular-weight heparin. Analysis of the dialysis system always revealed a bacterial count under 0.1 CFU/ml and endotoxin levels below 0.025 EU/ml. Patients with a clinical event that required hospitalization were excluded. Blood

TABLE I - Characteristics of the dialyzers used in the study

Trade name of membrane	Membrane polymer	Surface Area (m ²)	Manufacturer	Sterilization mode	Ultrafiltration Coefficient (KUF) ml/h x mmHg
Helixone	Polysulphone	2.2	Fresenius Medical Care	Inline steam	73
Polyamix	Polyamide ¹	2.1	Gambro	Inline steam	83
Polynephron	Polyethersulphone	2.1	Nipro	Gamma dry ray	82

¹Polyamide/polyarylethersulphone/polyvinylpyrrolidone blend.



pressure and ultrafiltration rate were registered in all patients during the HD session.

Pre-hemodialysis (pre-HD: before starting the blood pump), intra-hemodialysis (30 min after beginning HD session) and post-hemodialysis (post-HD: 60 s after setting the blood pump at 50 ml/min) blood samples were drawn from the inlet line. Samples were collected in basal conditions and after the 4 month-period of study. In both cases, sampling was performed on 2 consecutive dialyses, performed 1 week apart. As soon as the HD session finished, all samples from each hospital were sent in the same conditions (refrigerated to preserve them) to Principe de Asturias Hospital (single laboratory), where they were properly processed. Serum, whole blood, and MC were obtained from pre-HD and post-HD samples. Serum was used to measure C-reactive protein, urea, creatinine, and β_2 -microglobulin concentrations. White cell count and the analysis of activated MC (CD14⁺CD16⁺ MC) were performed in whole blood. White blood cell count was measured 30 min after beginning the HD session and registered in all patients during the HD session.

Blood was collected to calculate urea, creatinine, and β_2 -microglobulin reduction ratios as well as isolate peripheral blood mononuclear cells (MC). A portion of blood was used directly to quantify activated monocytes (subpopulation CD14⁺CD16⁺) by flow cytometry and the MC isolated from total blood were used to evaluate the ROS production by flow cytometry and protein expression of Hsp70 and Hsp90 by Western blot assays.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

MC were isolated (22) from whole blood by a differential centrifugation gradient with Ficoll (Comercial Rafer, Madrid, Spain). For this purpose, blood was diluted 1:2 with phosphate buffer saline (PBS) (139 mM NaCl, 8.66 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM NaH₂PO₄, pH 7), and it was added slowly over the Ficoll reagent. Then, samples were centrifuged at 600 g for 45 min without brake. The cottony layer containing MC was carefully removed and washed with PBS. After centrifuging at 800 g for 15 min, cells were precipitated and collected in PBS to measure ROS production and protein expression of Hsp70 and Hsp90.

Measurement of reactive oxygen species (ROS)

MC isolated from the whole blood of each patient were incubated for 30 min at 37°C in the presence or absence of the reduced form of dichloro-dihydrofluorescein diacetate probe (H₂DCFDA; Molecular Probes, Life Technologies, Madrid, Spain) dissolved in PBS. After incubation, the samples were centrifuged and the MC were resuspended in 500 μ L PBS to be acquired in Flow Cytometry (FC 500; Beckman Coulter, CA, USA). ROS from each sample oxidized the probe, which in this form is fluorescent and detectable by fluorimetric assay (23). The fluorescent signal was directly proportional to the amount of ROS contained in the MC.

Evaluation of CD14 and CD16 mononuclear expression

A total of 100 μ L of whole blood was incubated with 4 μ L CD14 antibody PE-labeled and 4 μ L of CD16 antibody FITC-

labeled for 20 min at room temperature, in the dark and in agitation (8, 22). The samples were taken in triplicate and a negative control was performed with blood and the isotypes of each CD14 and CD16 antibody, IgG2a-PE and IgM-FITC, respectively. Mouse IgM CD16-FITC, mouse IgM-FITC, mouse IgG2a CD14-PE and mouse IgG2a-PE antibodies were purchased from Miltenyi Biotec (Madrid, Spain). After incubation, the red blood cells were broken with 1x BD FACS Lysing solution (Becton Dickinson, CA, USA) during 10 minutes at room temperature. Then, cells were washed 3 times with PBS to eliminate Lysing solution. Lastly, the cells were resuspended in 500 μ L of PBS containing 3% formaldehyde, to be acquired in the FACScan cytometer (FC 500, Beckman Coulter, San Jose, CA, USA).

Protein expression of Hsp70 and Hsp90 in MC

Proteins were obtained from MC using a Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate) containing a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Madrid, Spain) as described Martínez-Miguel et al (20). Protein concentration was determined with the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Proteins were separated on SDS-PAGE 6% (30 μ g protein/lane) and transferred onto nitrocellulose membranes (Pierce, Rockford, IL, USA). Membranes were blocked with 5% (w/v) nonfat dry milk in Tris-Buffered saline and Tween 20 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20) at room temperature. Detection of Hsp70 and Hsp90 proteins was performed using polyclonal rabbit anti-Hsp70 and anti-Hsp90 antibodies (1:750 dilution in 3% BSA overnight at 4°C) (Cell Signalling, IZASA, Barcelona, Spain). After washing in Tris-Buffered saline and Tween 20, blots were incubated with 1:10 000 dilution horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Chemicon; Millipore, Temecula, CA, USA). The immunoreactive bands were visualized with the SuperSignal West Pico detection system from Cytex (Pierce, Rockford, IL, USA) after 60 s of exposure to CL-Xposure films (Pierce, Rockford, IL, USA). Then blots were reblotted with a rabbit anti-actin antibody (Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co, St Louis, MO, USA) in order to normalize Hsp70 and Hsp90 levels.

Statistical analysis

In the chronic study, each value was the mean of the values obtained from the 2 consecutive dialysis sessions performed 1 week apart. The statistical tests used were Chi-square, Student's *T*-test for paired measures, if the variables complied with the condition of normality, and Wilcoxon Test for non-normal variables. Data are reported as mean \pm standard deviation, median and interquartile ranges, percentages and rates, as appropriate. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

The baseline characteristics of patients from both groups are shown in Table II. There were no statistically significant differences in the different parameters considered. The acute effect of a single dialysis with each one of the dialyzers

TABLE II - Baseline characteristics of the patients

Groups	Control	Polynephron	P
No. of patients	9	38	
Gender n (%)			
Male	6 (67)	27 (71)	0.5
Female	3 (33)	11 (29)	
Age (years)			
(mean ± sd)	59 ± 14	65 ± 17	0.4
T on HD (months)			
(mean ± sd)	52 ± 55	56 ± 60	0.9
Online	4 (44)	14 (37)	
Type of HD n (%)			
High-flux	5 (56)	24 (63)	1
Nephroangiosclerosis	1 (11)	4 (10)	
Diabetic Nephropathy	1 (11)	11 (29)	
CKD etiology n (%)			
Interstitial nephropathy	2 (22)	1 (3)	0.4
Glomerulonephritis	2 (22)	7 (18)	
APKD	1 (11)	1 (3)	0.5
Amyloidosis	0 (0)	1 (3)	
Unknown	2 (22)	13 (34)	
Smoker	1 (11)	7 (18)	0.2
Hypertension	6 (67)	32 (84)	
Diabetes mellitus			
Comorbidity n (%)	2 (22)	16 (42)	0.2
Ischemic heart disease	0 (0)	7 (18)	0.2
Peripheral vascular disease	1 (11)	6 (16)	0.6
Baseline dialyzer n (%)			
Helixone	7 (78)	19 (50)	0.1
Polyamide	2 (22)	19 (50)	

Control = control group, patients dialyzed throughout the study with the same membrane, helixone or polyamide; Polynephron = patients in which the helixone or polyamide membrane was replaced by polynephron for 4 months; T on HD = time on hemodialysis. The data are expressed as absolute frequency (n) and percentage (%) or as mean ± standard deviation (sd).

TABLE III - Acute effect of one hemodialysis session on circulating monocytes

	Control				Polynephron			
	Basal		4 months		Basal		4 months	
	preHD	postHD	preHD	postHD	preHD	postHD	preHD	postHD
No. MC ROS ⁺ /10 000 cells	646 (830)	942 (774)	462 (495)	566 (439)	1143 (1145)	957 (1116)	805 (1577)	878 (1501)
No. MC CD14 ⁺ CD16 ⁺ /10,000 cells	726 (2807)	535 (1516)	547 (621)	267* (510)	1127 (1839)	840* (1672)	610 (980)	476 (749)
Hsp70/Act/μg protein expression	1.6 (2.1)	1.3 (2.1)	1.8 (2.1)	2.0 (1.1)	1.2 (1.4)	0.8 (1.1)	0.7 (1.5)	0.6 (1.6)
Hsp90/Act/μg protein expression	2.6 (5.3)	2.7 (5.7)	2.0 (5.1)	1.2 (3.6)	1.1 (1.8)	0.7 (1.7)	1.2 (3.0)	0.9 (1.8)

Control = control group, patients dialyzed throughout the study with the same membrane, helixone or polyamide; Polynephron = patients in which the helixone or polyamide membrane was replaced by polynephron for 4 months. Analyses were performed before (pre-HD) and after (post-HD) one hemodialysis session, at the beginning of the study (Basal) and after 4 months of treatment in both groups. No. MC ROS⁺ = number of MC producing ROS; No. MC CD14⁺CD16⁺ = number of MC positives for CD14 and CD16; Hsp = Heat-shock protein. The data are expressed as median (interquartile range). Differences are considered statistically significant at *P<0.05.

included in the study is expressed in Table III. No statistically significant differences were observed between the initial and final values of ROS amount or Hsp70/90 expression with any of the membranes evaluated. On the contrary, the percentage of CD14⁺CD16⁺ MC, was reduced with a single dialysis in all cases, although the differences were only statistically significant in the control group in the evaluations performed at 4 months, and in the polynephron group in the baseline studies (Table III).

Parameters analyzed after 4 months in the control group did not show any change with respect to basal conditions (panels A and C of Figs. 1 and 2). When the usual high-flux dialyzers were changed for polynephron, no changes were observed in the ROS production by MC (Fig. 1B). In contrast, a significant reduction was observed in the percentage of CD14⁺CD16⁺ MC (Fig. 1D). With regard to the expression of Hsp in MC after 4 months, dialysis with polynephron induced a reduction of the content of Hsp70 (Fig. 2B), which did not reach statistical significance, without modifications in Hsp90 (Fig. 2D). Taking into account that half of the patients included in the study were dialyzed regularly with helixone and the other half with polyamide, the different variables analyzed in both subgroups of patients were compared. The results were similar to those previously described, although the reduction in the percentage of CD14⁺CD16⁺ MC did not reach statistical significance (helixone vs. polynephron: helixone: 947 (1222); polynephron: 465 (641) P = 0.179; polyamide vs. polynephron: polyamide: 688 (1677); polynephron: 423 (715), P = 0.091).

Mean blood pressure, total ultrafiltration, white cell count at 30 min from the dialysis beginning, C-reactive protein, and urea, creatinine and β₂-microglobulin reduction ratios are shown in Table IV. No statistically significant differences were observed in any of the parameters evaluated, except that the β₂-microglobulin reduction ratio was higher in polynephron group after 4 months respect to the basal situation.

Discussion

Progressive knowledge of the importance of the biocompatibility of dialysis membranes has led to a qualitative change in the treatment of patients with CKD by means of extracorporeal waste removal techniques. The old membranes derived from cellophane have been replaced by different synthetic polymers, capable of minimizing the biological responses of

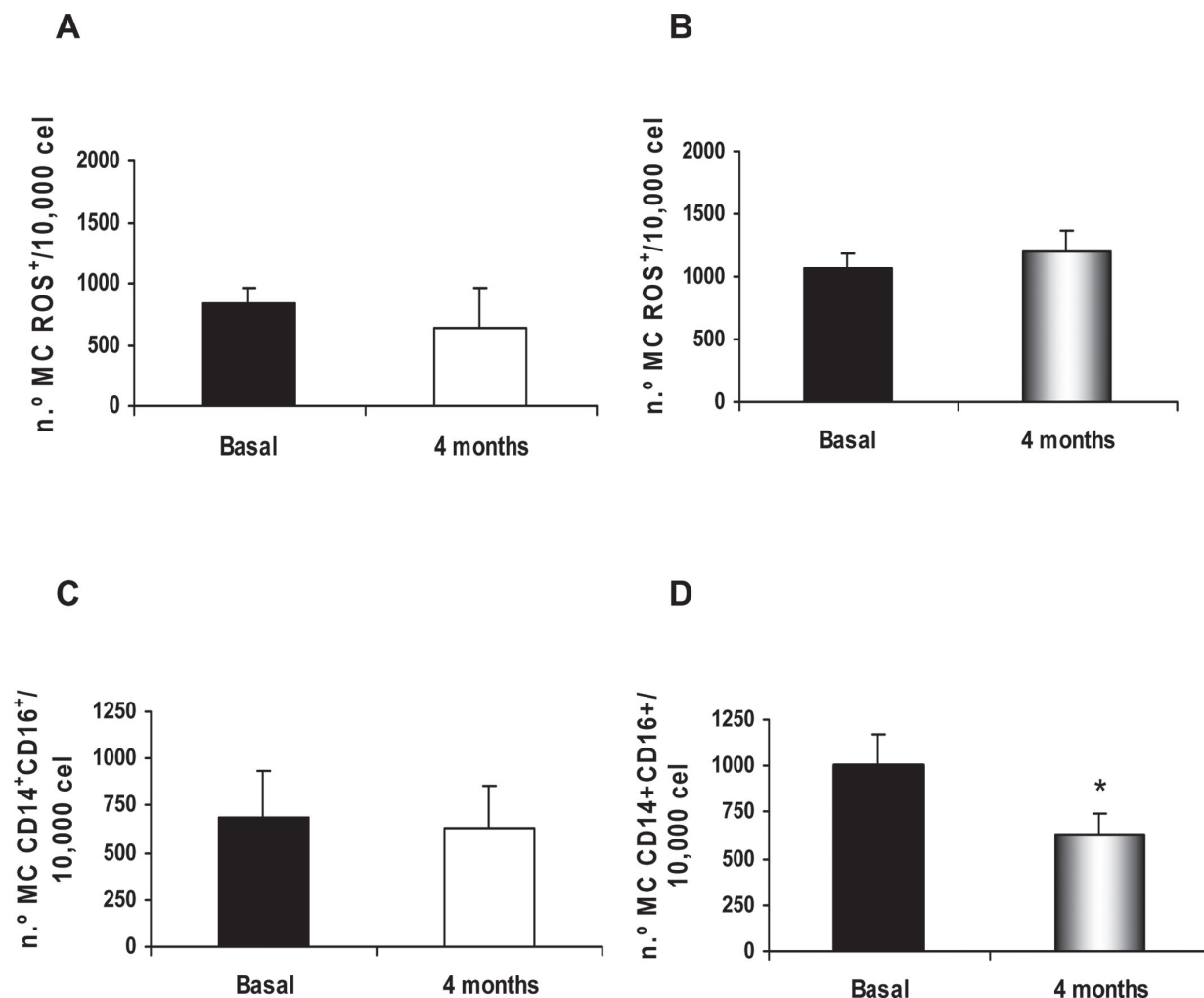


Fig. 1 - Chronic effect of 4 months of hemodialysis with polynephrone in comparison with the baseline dialyzers polyamide and helixone on the production of ROS in monocytes and on the percentage of CD14⁺CD16⁺ monocytes. **A, B**) MC were isolated from each patient before HD-session (pre-HD) from the beginning of the study (Basal) and after 4 months, and then incubated with H₂DCFDA probe to measure ROS production by flow cytometry, indicating the number of MC that produce ROS (n.° MC ROS⁺) per 10 000 cells analyzed. **A**) Production of ROS in the control group, after 4 months of treatment with the same dialyzer, polyamide or helixone (open bars). **B**) Production of ROS in the polynephrone group, after 4 months of treatment with polynephrone (grey bars). The data are expressed as mean and standard error of the mean. **C, D**) 100 μ L of whole blood was incubated with CD14 and CD16 antibodies for 20 minutes at room temperature, to detect the activated monocytes that were positive for both markers (n.° MC CD14⁺CD16⁺) per 10 000 cells analyzed by flow cytometry. **C**) Percentage of activated monocytes in the control group after 4 months of treatment with the same baseline dialyzer, polyamide or helixone (open bars). **D**) Percentage of activated monocytes in the polynephrone group, after 4 months of treatment with polynephrone (grey bars). The data are expressed as mean and standard error of the mean. * $P < 0.05$ vs. baseline dialyzer (closed bars).

the blood when entering into contact with materials of a different chemical composition (24-26). In this process of substituting new membranes for old ones, indirect procedures were established for measuring biocompatibility, and it was thus possible to select the best possible dialyzers. Many of the membranes currently used are of excellent quality, really differing little in the classic biocompatibility measurement parameters, such as leukopenia or complement decrease, which are observed in the first phases of dialysis. For this reason, in recent years, procedures have been developed for measuring the pro-inflammatory state of individuals, such as, for example, cytokine synthesis (27-31), which have contributed to discriminating between the greater or lesser biocompatibility of the new materials.

Polynephron is a dialysis membrane that was introduced into the market relatively recently. Its characteristics of permeability and biocompatibility, apparently, do not differ from those of the dialyzers most widely used at present, such as helixone or polyamide. This study was proposed to compare polynephron with these more traditional membranes, but the study concentrated on the analysis of the capacity of the membranes to modify the phenotype of circulating mononuclear cells, thus being able to influence, indirectly, the process of the generation of vascular damage. When analyzing the circulating cells, the percentage of positive CD14 and CD16 cells, a subtype of monocytes with pro-inflammatory activity (11), and the cellular content of free radicals and heat shock proteins were studied.

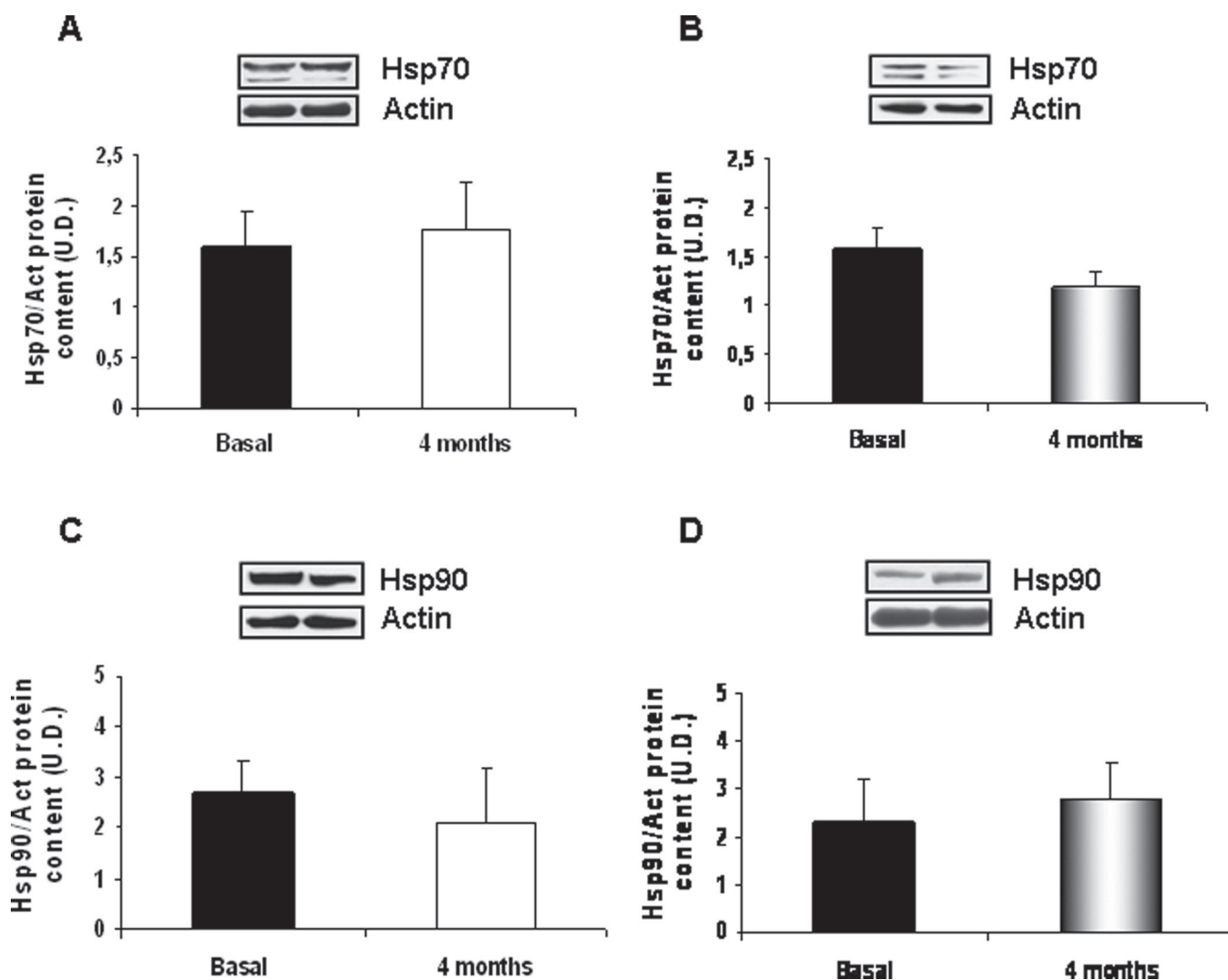


Fig. 2 - Chronic effect of 4 months of treatment in hemodialysis with polynephron in comparison with the baseline dialyzers polyamide and helixone on the protein expression of Hsp70 and Hsp90 in monocytes. MC were isolated from each patient before HD-session (pre-HD) from the beginning of the study (Basal) and after 4 months. Proteins were extracted from these MC in order to quantify the protein levels of Hsp70 and Hsp90 by Western blot assay. The upper part of each panel shows a representative Western blot and the lower part shows a graph with the densitometric analysis of all the data. Expression of Hsp70 (**A**) and Hsp90 (**C**) in the monocytes of the control group, after 4 months of treatment with the same dialyzer, polyamide or helixone (open bars). Expression of Hsp70 (**B**) and Hsp90 (**D**) in the monocytes of the polynephron group, after 4 months of treatment with polynephron (grey bars). The results are expressed as mean and standard error of the mean. No statistical differences were found in any group comparing 4 months with respect to baseline dialyzer (closed bars).

The results obtained only showed differences in the percentage of positive CD14CD16 monocytes, with no differences being detected in the other parameters analyzed. In fact, the percentage of these cells diminished over the course of a dialysis procedure with the various membranes analyzed, although the differences observed were not significant in each case, probably due to the variability of this parameter. These changes in the percentage of pro-inflammatory monocytes over the course of a dialysis have been described previously, and have been correlated with the removal of toxic molecules or dialysis system biocompatibility (19). More relevant than the acute changes are the modifications that took place after 4 months of treatment with polynephron. The replacement

of the more traditional membranes with this membrane caused a reduction in pro-inflammatory monocytes, which in the long term may bring about a reduction in the cardiovascular damage of patients dialyzed with this material.

The role of free radicals in the damage associated with the lack of biocompatibility has been evaluated previously, but the studies that analyze the net production of these metabolites in circulating mononuclear cells are scarce (9, 32, 33). Some of them show that an improvement in the quality of the dialysis, from the point of view of waste removal or biocompatibility, reduces the net production of these metabolites by the blood cells. Our study evaluated the production of ROS with the H_2DCFDA probe, which is a chemically

TABLE IV - Patient hematological and biochemical parameters for hd session comparing baseline with 4-month chronic treatment in the control and polynephrone groups

Groups	Control		Polynephrone	
	Basal	4 months	Basal	4 months
Initial MAP (mmHg)	97 ± 16	99 ± 17	94 ± 17	97 ± 16
ΔMAP (mmHg)	2 ± 12	14 ± 22	3 ± 14	9 ± 22
UF (ml/h)	427 ± 381	478 ± 257	634 ± 133	694 ± 242
Leukopenia (%)	8.5 ± 17.4	17.6 ± 15.6	7.3 ± 18.2	2.5 ± 28.6
Hemoglobin (g/dl)	12.1 ± 0.8	11.2 ± 1.3	11.7 ± 1.5	11.7 ± 1.2
CRP (mg/l)	9.7 ± 9.1	8.6 ± 9.0	9.8 ± 12.5	9.9 ± 20.8
Ca (mg/dl)	8.7 ± 0.7	8.8 ± 0.7	8.6 ± 1.5	9.1 ± 0.6
P (mg/dl)	4.2 ± 1.2	4.5 ± 1.7	4.8 ± 1.7	4.5 ± 1.1
Uric acid (mg/dl)	7.2 ± 1.6	7.6 ± 1.6	6.6 ± 1.4	6.3 ± 1.2
Albumin (g/dl)	3.6 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.6 ± 0.9	3.8 ± 0.4
URR (%)	81 (13)	80 (11)	75 (12)	74 (11)
CrRR (%)	73 (18)	70 (13)	67 (13)	64 (9)
β ₂ -microglobulinRR (%)	65 (32)	64 (26)	62 (46)	70 (32)*

Control = control group, patients dialyzed throughout the study with the same membrane, helixone or polyamide; Polynephrone = patients in which the helixone or polyamide membrane was replaced by polynephrone for 4 months; MAP = mean arterial pressure at the beginning of the HD session; ΔMAP = difference between the MAP at the beginning and at the end of the HD session; UF = ultrafiltration rate during the HD session; Leukopenia (%) = white blood cell count reduction at 30 min of HD in comparison with the beginning of the session; CRP = C-reactive protein; URR = urea reduction ratio; CrRR = creatinine reduction ratio; β₂-microglobulinRR = β₂-microglobulin reduction ratio. The data are expressed as mean ± standard deviation or as median (interquartile range) according to whether the variable is of normal distribution or not. *P<0.05.

reduced form of fluorescein used as an indicator for detecting the generation of ROS in neutrophils and macrophages. No relevant changes were detected on the basis of the different membranes used.

Very few studies have considered that Hsp may be cellular stress markers in dialysis patients. Cells incubated at high temperatures or in the presence of external aggressions, such as the free radicals mentioned earlier, over-express these proteins, which try to prevent cellular damage induced by external stimuli. It would not be strange if in adverse physiopathological conditions, such as hemodialysis, these proteins were to be increased, allowing them to serve as markers of the intensity of the aggression. This property of Hsp has been used in other fields of biomedical knowledge, and its relevance has been demonstrated in different cardiovascular diseases (12). In general, these studies assume that the over-expression of these stress proteins leads to an increase in their release to the extracellular space, perhaps as a consequence of cellular damage; based on this assumption, the content of heat shock proteins in circulation is analyzed. A recent study refers to an increase in the serum concentration of Hsp60 and Hsp90 at the end of the hemodialysis session with polysulphone (34), while another refers to an increase of Hsp70 under the same conditions (32). These studies attribute the increase in Hsp proteins to the cellular stress situation created by the hemodialysis session, specifically by the possible contact of the cells

with endotoxins and with the possible reactions of bioincompatibility that may be caused by the dialyzer.

This is the first study that analyzes the changes in Hsp in intact circulating mononuclear cells in dialysis patients, according to the biocompatibility of the membranes. The analysis focused on 2 proteins of molecular weights of 70 KDa and 90 KDa, which are the most frequently studied. No significant differences were observed after a single HD session, or after 4 months of dialysis treatment. Future studies could use measurement strategies similar to those described here, referring to the measurements of Hsp, and could add information to this interesting field of the measurement of cellular damage in renal failure. Interestingly, various hypotheses could be proposed concerning the potential pathological consequences of uremia or dialysis-induced changes on these proteins not only in monocytes but also in other cell types. As Hsp90 seem to be involved in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function (35), a potential link could exist between the Hsp90 changes and endothelial dysfunction. On the other hand, different Hsp are also involved in the maintenance of the cellular protein turnover in physiological conditions (12), and changes in the cellular content of these proteins could be linked to inadequate tissue remodeling or immunological responses that characterize patients with advanced uremia in hemodialysis.

Three methodological considerations need to be made at this point in order to evaluate whether or not the data presented in

this study are valid. First, the patients included in the study were dialyzed indistinctly with helixone or polyamide (see Tab. I). Since these membranes do not differ at all with regard to the parameters analyzed, all the patients were considered together when considering the changes observed in comparison with chronic dialysis with polynephron.

Second, not all the measurements that we performed are standardized adequately in studies on human beings. While the detection of CD14⁺CD16⁺ monocytes via flow cytometry is a simple and reproducible procedure, the analysis of the synthesis of ROS and, especially, the measurement of the content of Hsp, are not well resolved with currently available techniques. For this reason, the data shown are the mean of 2 measurements made on the same patient, with the introduction of internal controls to standardize the data. Moreover, we introduced a control group in the study to demonstrate that after 4 months of treatment with the same membranes, the parameters analyzed were not modified, thus the modifications observed when dialyzing with polynephron were more relevant. Finally, although the changes observed may be attributed to the different biocompatibilities of the membranes, the polynephron dialyzer has a slightly higher clearing capacity for β_2 -microglobulin, which suggests greater clearance of medium-sized toxic molecules. This is something that may also affect the improvement in the percentage of pro-inflammatory monocytes observed when using polynephron. In fact, in various studies high convective transport dialysis (on-line hemodialysis), which allows greater clearance of medium-sized molecules, has demonstrated a reduction in the percentage of activated CD14⁺CD16⁺ monocytes compared to high-flux dialysis (8, 22, 36-37) as well as a decrease in the markers of endothelial damage (22). The percentage of patients on HDF in our study was comparable in both groups and remained without changes through the study, which is the main reason why we think that the changes observed in β_2 -microglobulin reduction ratio are related to polynephron treatment and not to the type of hemodialysis, suggesting that HDF did not have any influence in these differences.

In conclusion, polynephron is a membrane of comparable quality to the more classic helixone or polyamide, and may show some advantages when inducing monocyte activation, either due to greater biocompatibility or to its greater clearance of medium-sized molecules.

Abbreviations

Chronic kidney disease	CKD
Circulating peripheral blood mononuclear cells	MC
2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	H ₂ DCFDA
Hemodialysis	HD
Heat-shock proteins	Hsp
Phosphate buffer saline	PBS
Reactive oxygen species	ROS

Acknowledgements

We thank the collaboration of all Hospitals involved in collecting all the blood samples and registering all the dialysis parameters from dialysis patients treated with the various study dialyzers.

Disclosures

Financial support: This work was supported by grants from the Health Research Fund (FIS)-FEDER [grants PI10/00181, PI11/01630], the FIS Network Program REDinREN [grant RD12/0021/0006], and Nipro Laboratories. SLO holds a contract from the Research Stabilization program of the FIS [CES07/032].

Conflict of interest: None to report.

Meeting presentations: These results were presented at the 40th and 42nd National Congresses of the Spanish Society of Nephrology, under the auspices of Nipro Laboratories, held in Granada and the Canary Islands in October 2010 and 2012, respectively.

References

- Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007;116(1):85-97.
- Stenvinkel P. Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. *J Ren Nutr*. 2003;13(2):144-148.
- Landray MJ, Wheeler DC, Lip GY, et al. Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(2):244-253.
- Ramírez R, Carracedo J, Merino A, et al. Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int*. 2007;72(1):108-113.
- Carrero JJ, Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease—what have we learned in 10 years? *Semin Dial*. 2010;23(5):498-509.
- Jofré R, Rodríguez-Benitez P, López-Gómez JM, Pérez-García R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(12 Suppl 3):S274-S280.
- Merino A, Nogueras S, Buendía P, et al. Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. *Contrib Nephrol*. 2008;161:83-88.
- Ramírez R, Carracedo J, Merino A, et al. CD14⁺CD16⁺ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contrib Nephrol*. 2011;171:57-61.
- Nguyen AT, Lethias C, Zingraff J, Herbelin A, Naret C, Descamps-Latscha B. Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected *in vivo* and *in vitro* within microamounts of whole blood. *Kidney Int*. 1985;28(2):158-167.
- Ojeda R, Aljama PA. Microinflamación crónica y daño endotelial en la uremia [Chronic microinflammation and endothelial damage in uremia]. *Nefrología*. 2008;28(6):583-586.
- Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584-592.
- Pockley AG. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;105(8):1012-1017.
- Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, Frostegård J. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension*. 2000;36(2):303-307.
- Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegård J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension*. 2003;42(3):235-238.
- Xu Q, Schett G, Perschinka H, et al. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation*. 2000;102(1):14-20.
- Kaplow LS, Goffinet JA. Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. *JAMA*. 1968;203(13):1135-1137.



17. Craddock PR, Fehr J, Dalmaso AP, Brigham KL, Jacob HS. Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin Invest.* 1977;59(5):879-888.
18. Toren M, Goffinet JA, Kaplow LS. Pulmonary bed sequestration of neutrophils during hemodialysis. *Blood.* 1970;36(3):337-340.
19. Sester U, Sester M, Heine G, Kaul H, Girndt M, Köhler H. Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(7):1402-1408.
20. Martínez-Miguel P, Sequera PD, Molina A, et al. Influence of polysulphone-derived dialysis membranes on the interaction of circulating mononuclear cells with the endothelium. *Int J Artif Organs.* 2014;37(6):455-465. PubMed
21. Mares J, Richtrova P, Hricinova A, et al. Proteomic profiling of blood-dialyzer interactome reveals involvement of lectin complement pathway in hemodialysis-induced inflammatory response. *Proteomics Clin Appl.* 2010;4(10-11):829-838.
22. Carracedo J, Merino A, Noguera S, et al. On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: A prospective, crossover study. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(8):2315-2321.
23. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(1-2):146-159.
24. Martín-Malo A. Biocompatibilidad de la diálisis en insuficiencia renal crónica, diálisis y trasplante renal. In: Valderrábano F, Llach F, eds. *Insuficiencia Renal Crónica. Diálisis y trasplante renal.* 2nd ed. Madrid: Ediciones Norma;1997:1049-1070.
25. Mandolfo S, Tetta C, David S, et al. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of substituted cellulose and synthetic membranes. *Int J Artif Organs.* 1997;20(11):603-609.
26. Grooteman MP, Nubé MJ, van Limbeek J, van Houte AJ, Daha MR, van Geelen JA. Biocompatibility and performance of a modified cellulosic and a synthetic high flux dialyzer. A randomized crossover comparison between cellulose triacetate and polysulphon. *ASAIO J.* 1995;41(2):215-220.
27. Galli F, Benedetti S, Floridi A, et al. Glycooxidation and inflammatory markers in patients on treatment with PMMA-based protein-leaking dialyzers. *Kidney Int.* 2005;67(2):750-759.
28. Teehan GS, Guo D, Perianayagam MC, Balakrishnan VS, Pereira BJ, Jaber BL. Reprocessed (high-flux) Polyflux dialyzers resist trans-membrane endotoxin passage and attenuate inflammatory markers. *Blood Purif.* 2004;22(4):329-337.
29. Varela MP, Kimmel PL, Phillips TM, Mishkin GJ, Lew SQ, Bosch JP. Biocompatibility of hemodialysis membranes: interrelations between plasma complement and cytokine levels. *Blood Purif.* 2001;19(4):370-379.
30. Qian J, Yu Z, Dai H, Zhang Q, Chen S. Influence of hemodialysis membranes on gene expression and plasma levels of interleukin-1 beta. *Artif Organs.* 1995;19(8):842-846.
31. Girndt M, Heisel O, Köhler H. Influence of dialysis with polyamide vs haemophan haemodialysers on monokines and complement activation during a 4-month long-term study. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(3):676-682.
32. Raj DS, Boivin MA, Dominic EA, et al. Haemodialysis induces mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 2007;37(12):971-977.
33. Ward RA, Ouseph R, McLeish KR. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. *Kidney Int.* 2003;63(1):353-359.
34. Musiał K, Szprynger K, Szczepańska M, Zwolińska D. Heat shock proteins in children and young adults on chronic hemodialysis. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(10):2029-2034.
35. García-Cardeña G, Fan R, Shah V, et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998;392(6678):821-824.
36. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, et al. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J.* 2011;32(1):84-92.
37. Kim HW, Yang HN, Kim MG, et al. Microinflammation in hemodialysis patients is associated with increased CD14CD16(+) pro-inflammatory monocytes: possible modification by on-line hemodiafiltration. *Blood Purif.* 2011;31(4):281-288.