

Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología
Universidad de Córdoba

**EL ALTO TRANSPORTE CONVECTIVO MEJORA LOS
PARÁMETROS DE MICROINFLAMACIÓN Y
DISFUNCIÓN ENDOTELIAL INDEPENDIENTEMENTE
DE LA TÉCNICA EMPLEADA.**

Tesis Doctoral propuesta por Francisco Javier Ariza Fuentes, Licenciado en
Medicina, Especialista en Nefrología, para optar al grado de Doctor.

Directores

Dr. Alejandro Martín Malo

Catedrático

Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología
Universidad de Córdoba

Dr. Manuel Rafael Ramírez Chamond

Profesor titular

Departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Alcalá

TITULO: *El alto transporte convectivo mejora los parámetros de microinflamación y disfunción endotelial independientemente de la técnica empleada.*

AUTOR: *FRANCISCO JAVIER ARIZA FUENTES*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

D. ALEJANDRO MARTÍN MALO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA Y OTORRINOLARINGOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y JEFE DE SECCIÓN DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DEL SERVICIO DE NEFROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA DE CÓRDOBA,

INFORMA:

Que D. Francisco Javier Ariza Fuentes ha realizado bajo mi dirección, de forma conjunta entre el Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología de la Universidad de Córdoba y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), el trabajo titulado: **“EL ALTO TRANSPORTE CONVECTIVO MEJORA LOS PARÁMETROS DE MICROINFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL INDEPENDIENTEMENTE DE LA TÉCNICA EMPLEADA”**, y que a mi criterio dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos. Resultados que son de gran relevancia desde el punto de vista científico con varias aportaciones tanto a revistas como a congresos de ámbito internacional.

Por todo ello, autorizo la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, a trece de Mayo de dos mil trece.

Fdo: Alejandro Martín Malo.

D. MANUEL RAFAEL RAMÍREZ CHAMOND, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,

INFORMA:

Que D. Francisco Javier Ariza Fuentes ha realizado bajo mi dirección, de forma conjunta entre el Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología de la Universidad de Córdoba y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), el trabajo titulado:

“EL ALTO TRANSPORTE CONVECTIVO MEJORA LOS PARÁMETROS DE MICROINFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL INDEPENDIENTEMENTE DE LA TÉCNICA EMPLEADA”, y que a mi criterio dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos. Resultados que son de gran relevancia desde el punto de vista científico con varias aportaciones tanto a revistas como a congresos de ámbito internacional.

Por todo ello, autorizo la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, a trece de Mayo de dos mil trece.

Fdo: Manuel Rafael Ramírez Chamond.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS.

Como casi todos los proyectos largos, esta Tesis Doctoral no se habría llevado a término sin la colaboración de un número de personas que casi tiende a infinito. Sin la ayuda de todos ellos este trabajo presentaría deficiencias mucho mayores de las que hoy aún contiene. Por este motivo quiero agradecer profundamente la participación de todas las personas que han influido directa o indirectamente durante los últimos años en el trabajo resumido en esta memoria.

He de agradecer ante todo a la Dra. Ana María Merino Rodríguez la enorme aportación realizada en este trabajo de Tesis Doctoral, perfectamente esta Tesis podría ser suya. Ha sido un honor trabajar conjuntamente con mis directores de Tesis, el Dr. Alejandro Martín Malo y el Dr. Manuel Rafael Ramírez Chamond así como con el Dr. Pedro Aljama García. Agradezco de verdad el apoyo, la confianza, la paciencia y el estímulo que desde el primer momento han proporcionado para la realización de este proyecto de Tesis, así como la crítica y valoración del incesante y duro trabajo diario.

Y ofrecer mención especial a mi familia y amigos más cercanos, por saber respetar mi trabajo, comprender mi estado de ánimo y ayudarme en los momentos difíciles.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN.....	15
SUMMARY.....	19
INTRODUCCIÓN	23
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	29
1. CONSIDERACIONES GENERALES.....	31
1.1.- TERAPIA RENAL SUSTITUTIVA EN ERC	33
2. INFLAMACIÓN EN ERC Y HEMODIÁLISIS	35
2.1. MECANISMO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CRÓNICA.....	35
2.1.1. BASE CELULAR DEL PROCESO INFLAMATORIO.....	37
Papel de los monocitos	38
2.2. CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS	40
2.2.1. CITOQUINAS.....	40
Interleuquina 6	40
Factor de necrosis tumoral alfa.....	42
2.2.2. QUIMIOQUINAS	44
2.3. CAUSAS DE LA INFLAMACIÓN	45
2.4. CONSECUENCIAS DE LA INFLAMACIÓN	50
3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN ERC Y HEMODIÁLISIS	53
3.1. INFLAMACIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	53
3.2. MARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL	59
3.2.1. MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES.....	60
Caracterización de las micropartículas endoteliales	60
3.2.2. CÉLULAS PROGENITORAS DE ENDOTELIO	61
Caracterización de las células progenitoras de endotelio.....	62
3.2.3. FACTORES DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR.....	62
4. ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO EN LA ERC.....	64
4.1. RELACIONADAS CON LA TÉCNICA DE DIÁLISIS	64
4.1.1. HEMODIÁLISIS ALTO FLUJO (HD-HF).....	65
4.1.2. HEMODIAFILTRACIÓN (HDF)	66
5. HEMODIAFILTRACION EN LÍNEA POSTDILUCIÓN (HDF-OL), MID- DILUTION (MID), MICROINFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	71
METODOLOGÍA.....	77
1. PACIENTES	79

2. DISEÑO DEL ESTUDIO	80
3. PARÁMETROS ANALIZADOS	83
3.1. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS PLASMÁTICAS	83
3.2. DETERMINACIÓN DE MONOCITOS CD14+CD16+ EN SANGRE PERIFÉRICA.....	84
3.3. DETERMINACIÓN DE MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES (CD31+ / ANEXINA V+) EN PLASMA	85
3.4. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS DE ENDOTELIO (CD34+ / CD133+ / VEGFR2+) EN SANGRE PERIFÉRICA	86
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	88
RESULTADOS	91
1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y PARÁMETROS DE LABORATORIO	93
2. DETERMINACIÓN DE MONOCITOS CD14+CD16+	97
3. DETERMINACION DE EPCs (CD34+/CD133+/VEGFR2+)	99
4. DETERMINACIÓN DE EMPs (CD31+/ANEXINA V+)	101
5. CORRELACIÓN ENTRE MICROINFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	103
DISCUSIÓN	107
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	123

LISTA DE ABREVIATURAS.

A continuación se presenta una relación de las abreviaturas más utilizadas a lo largo del texto:

ACVA: Accidente cerebrovascular agudo.

ADMA: Dimetilarginina asimétrica.

AGEs: Productos finales de la glicosilación avanzada.

β2m: Beta 2 microglobulina.

EMPs: Micropartículas endoteliales apoptóticas.

eNOS: Óxido nítrico sintetasa endotelial.

EPCs: Células progenitoras de endotelio.

ERC: Enfermedad renal crónica.

HD-HF: Hemodiálisis de alto flujo.

HDF: Hemodiafiltración.

HDF-OL: Hemodiafiltración en línea postdilucional.

HS: Sujetos controles sanos.

HUVEC: Células endoteliales desarrolladas a partir de cordón umbilical humano.

HVI: Hipertrofia del ventrículo izquierdo.

IAP-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1.

IL: Interleuquina.

IRC: Insuficiencia renal crónica.

LPS: Lipopolisacáridos bacterianos.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

MID: Mid-dilution.

NO: Óxido nítrico.

PCR: Proteína C reactiva.

PMN: Polimorfonucleares.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SAL: Nivel de garantía de esterilidad.

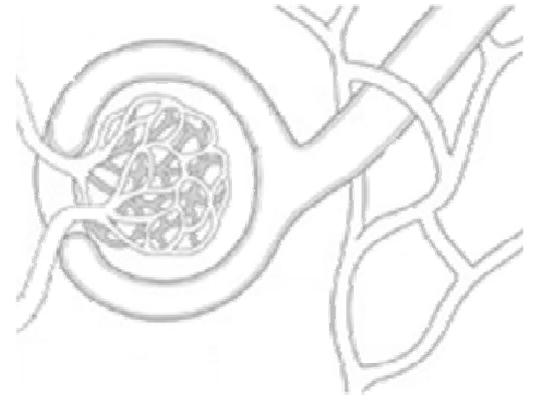
TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

UCP-2: Proteína desacoplante 2.

VCAM-1: Molécula de adhesión de célula vascular 1.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VEGFR2: Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular.



RESUMEN

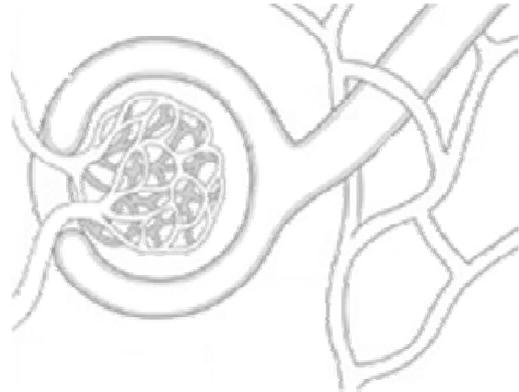
Mid-dilution (MID) es una técnica de hemodiafiltración en línea que combina las ventajas de las técnicas de predilución y postdilución. En este estudio se examinaron los efectos de diferentes técnicas de hemodiafiltración en línea sobre la microinflamación y el daño reparación endotelial. La hipótesis que se planteó fue evaluar si el empleo de una técnica como mid-dilution, que emplea el doble de flujo de sustitución que hemodiafiltración en línea postdilución convencional, podía mejorar aún más los datos obtenidos con esta técnica ya descritos en la bibliografía.

Se diseñó un estudio prospectivo y cruzado, en el que pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis se dializaron en 6 periodos diferentes de 8 semanas cada uno. Fueron divididos en dos grupos: Grupo 1: Hemodiálisis de alto flujo (HD-HF)//MID//Hemodiafiltración en línea postdilución (HDF-OL)//MID//HDF-OL//HD-HF. Grupo 2: HD-HF//HDF-OL//MID//HDF-OL//MID//HD-HF. Se emplearon técnicas de citometría de flujo para medir los monocitos CD14+CD16+ como marcador de inflamación, y las micropartículas endoteliales apoptóticas (EMPs) y las células progenitoras endoteliales (EPCs) como marcadores de daño reparación endotelial.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los pacientes tratados con HD-HF presentaban un marcado estado inflamatorio crónico. El alto transporte convectivo, independientemente de la técnica empleada (MID o HDF-OL), mejoró los parámetros de microinflamación y de daño reparación endotelial al compararlas con HD-HF, sin encontrar diferencias entre ambas técnicas convectivas. En comparación con la población de sujetos sanos la mejora obtenida con estas técnicas no fue suficiente para normalizar los valores.

Estos resultados permiten concluir que la hemodiafiltración en línea de alto transporte convectivo mejora el estado microinflamatorio y el daño reparación

endotelial en estos pacientes independientemente de la técnica empleada.



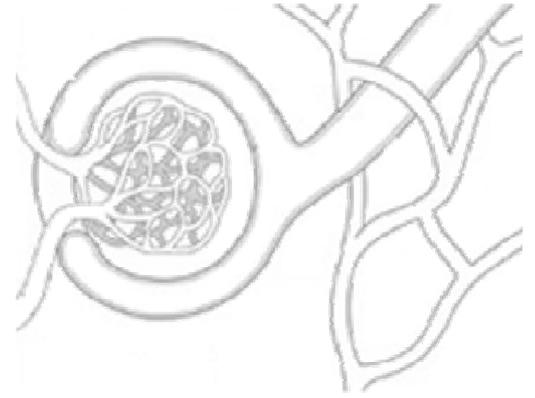
SUMMARY

Mid-dilution (MID) is an on-line hemodiafiltration technique which combines the advantages of pre-dilution and post-dilution modalities. In this study, we examined the effects of different on-line hemodiafiltration techniques on microinflammation and endothelial damage-repair. We hypothesize whether the use of a technique such as mid-dilution with twice flow replacement that post-dilution on-line hemodiafiltration could further improve the data obtained with this technique and described in the literature.

The study was designed as a prospective crossover study. Patients with renal chronic failure in hemodialysis were dialyzed over 6 separate 8 week periods. They were divided into two groups: Group 1: High permeability hemodialysis (HF-HD)//MID// Post- dilution on-line hemodiafiltration (OL-HDF)//MID//OL-HDF//HF-HD. Group 2: HF-HD//OL-HDF//MID//OL-HDF//MID//HF-HD. Flow cytometry was used to measure CD14+CD16+ monocytes (microinflammation), apoptotic endothelial microparticles (EMPs) as endothelial damage parameter, and endothelial progenitor cells (EPCs) as endothelial repair markers.

The results showed that patients treated by hemodialysis with HF-HD showed a marked chronic inflammatory state. High convective transport, independent of the technique used (OL- HDF or MID), improved microinflammatory parameters and the endothelial damage- repair balance compared to HF-HD, with no differences found between the two modalities. In comparison with the population of healthy subjects, the improvement achieved by these techniques was insufficiently strong to attain normal values.

These results lead us to conclude that the on-line hemodiafiltration with high convective transport improves the microinflammatory state and the endothelial damage-repair of these patients independently of the technique used.



INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular son las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica en tratamiento con terapia renal sustitutiva. La enfermedad cardiovascular está íntimamente relacionada con la inflamación crónica en pacientes en hemodiálisis. La inflamación en estos pacientes se asocia con activación de células mononucleares. Las células CD14+CD16+ se han descrito como un grupo de monocitos en sangre periférica que producen citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleuquina 6 (IL-6). Estas células juegan un importante papel en el proceso inflamatorio crónico asociado con la uremia. Niveles elevados de monocitos CD14+CD16+ se han relacionado con la aparición de enfermedad cardiovascular. Además, estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado que niveles elevados de monocitos CD14+CD16+ en pacientes con enfermedad renal crónica se correlacionan con marcadores de daño reparación endotelial como micropartículas endoteliales apoptóticas (EMPs) y células progenitoras de endotelio (EPCs) que constituyen el principal mecanismo de reparación del endotelio vascular.

En un estudio observacional se ha reportado un descenso en la mortalidad en pacientes en hemodiálisis asociado a técnicas convectivas de alta eficacia. Tras varios estudios prospectivos, controlados y randomizados con resultados negativos, un reciente estudio español, atribuye a la técnica de hemodiafiltración en línea postdilucional de alta eficacia un descenso en la mortalidad de los pacientes cuando la comparamos con la hemodiálisis de alto flujo.

Recientemente, se ha diseñado un dializador para optimizar la eliminación de toxinas urémicas. Este dializador debido a su diseño integra en un solo dispositivo las características necesarias para que se produzca en su interior un proceso de hemodiafiltración en línea intermedia. Esta técnica se denomina Mid-dilution. Cambios estructurales en los cabezales del dializador permiten la infusión de

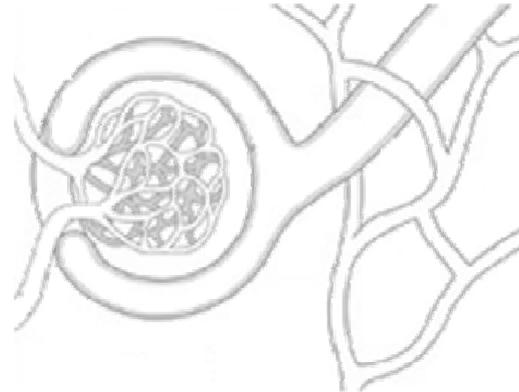
grandes flujos de líquido de sustitución en una primera fase de postdilución previa a una segunda fase de predilución.

Estudios preliminares han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, que Mid-dilution aumenta el aclaramiento de toxinas urémicas de mediano y alto peso molecular (beta 2 microglobulina, cistatina C, retinol unido a proteínas) mientras que mantiene un aclaramiento similar de toxinas urémicas de pequeño peso molecular al compararla con hemodiafiltración en línea postdilución. Otro estudio reciente no confirma estos datos. De cualquier forma, los estudios llevados a cabo hasta ahora con Mid-dilution son solamente de eficacia depuradora y no existen datos del potencial efecto beneficioso de esta técnica sobre la inflamación y el daño endotelial.

En base a estos antecedentes, la **Hipótesis** que se postula en este trabajo de Tesis Doctoral es que el tratamiento con Mid-dilution, debido a su teórica superioridad en la eliminación de toxinas urémicas de mediano y alto peso molecular, podría mejorar el estado microinflamatorio y los parámetros de daño reparación endotelial en pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis. Para analizar la bondad de la hipótesis, los **Objetivos** concretos planteados fueron los siguientes:

- 1.- Diseñar un estudio prospectivo y cruzado en pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis en el que se trataran con diferentes técnicas de hemodiálisis (HD-HF, MID, HDF-OL).
- 2.- Evaluar el efecto de las diferentes técnicas empleadas sobre marcadores de microinflamación y de daño reparación endotelial.
- 3.- Analizar la posible existencia de correlación entre microinflamación y disfunción endotelial.

4.- Comparar los resultados obtenidos en estos marcadores con las diferentes técnicas de hemodiálisis con los niveles presentes en un grupo de sujetos sanos.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. CONSIDERACIONES GENERALES

Comparados con la población general, los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) tienen una elevada tasa de morbimortalidad debida principalmente a enfermedad cardiovascular,^{63,77} incluyendo dentro de esta patología cardiovascular entidades como los accidentes cerebrovasculares agudos (ACVA), la enfermedad vascular periférica, la muerte súbita, la enfermedad arterial coronaria y la insuficiencia cardiaca congestiva. La evidencia actual pone de manifiesto una relación recíproca o bidireccional entre enfermedad renal crónica (ERC) y enfermedad cardiovascular, de tal forma que la enfermedad cardiovascular está relacionada de manera independiente con el descenso de la función renal.^{57,68}

Esta elevada tasa de morbimortalidad no se puede explicar únicamente por los factores de riesgo cardiovascular clásicos (diabetes, hipertensión arterial, tabaquismo, hipercolesterolemia, edad, sexo masculino e hipertrofia de ventrículo izquierdo); junto a estos, los pacientes con IRC presentan factores de riesgo denominados no tradicionales que están directamente relacionados con su enfermedad como son uremia, hiperhomocisteinemia, malnutrición, alteración del metabolismo del calcio y fósforo, aumento del estrés oxidativo, disfunción endotelial y microinflamación crónica.^{37,212,220}

Existe una gran cantidad de biomarcadores tradicionales y no tradicionales (o relacionados con la uremia) que se han relacionado con riesgo cardiovascular y mortalidad en pacientes con IRC. (Tabla 1)

Los marcadores de un sistema inmunitario activado de modo crónico están íntimamente relacionados con varias complicaciones de la ERC, como la aceleración de la aterosclerosis, calcificación vascular, resistencia a la insulina

	MARCADORES BIOQUÍMICOS
FACTORES DE RIESGO TRADICIONALES	
Edad	
Sexo masculino	
Hipertensión	
Hipertrofia del ventrículo izquierdo	
Tabaco	
Diabetes mellitus	Hemoglobina glicosilada, glucosa
Dislipemia	Colesterol, lipoproteína A
FACTORES DE RIESGO NO TRADICIONALES O RELACIONADOS CON LA UREMIA	
Inflamación	Interleuquina (IL) 6, IL-18, albúmina, leucocitos totales, fibrinógeno, ácido hialurónico, mieloperoxidasa, proteína C reactiva (PCR), pentraxina 3, ferritina
Estrés oxidativo	Mieloperoxidasa, plasmalógenos, LDL oxidada, especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO)
Disfunción endotelial	Pentaxina 3, ADMA (Dimetilarginina asimétrica), homocisteína, albúmina, VCAM (Molécula de adhesión de célula vascular), microalbuminuria, proteinuria
Gasto proteico-energético	Albúmina, creatinina, prealbúmina
Activación simpática	Noradrenalina
Alteración coagulación	Fibrinógeno
Resistencia insulina	HOMA (Modelo de evaluación de la homeostasis)
Genética / epigenética	SNP (Polimorfismo de nucleótido único), acortamiento telomérico, metilación ADN
Calcificación vascular	Ca, P, PTH, fetuina A, osteoprotegerina, osteopontina, FGF23
Toxinas urémicas	Creatinina, P-cresol, Indoxil sulfato, β 2m
Nuevas toxinas urémicas	Proteómica
Sobrecarga volumen	Troponina T, NT-pro-BNP (N-terminal pro-péptido natriurético cerebral)
Hipotiroidismo subclínico	T3, fT3
Adipoquinas	Leptina, adiponectina, visfatina
Anemia	Hemoglobina, ferritina, IST

Tabla 1. Factores de riesgo tradicionales y no tradicionales en pacientes con IRC

aumento del catabolismo muscular, pérdida de apetito, remodelamiento óseo o aumento de la permeabilidad de la membrana peritoneal. En varios estudios se ha demostrado repetidamente que biomarcadores de la inflamación, como la proteína C reactiva (PCR), la interleuquina (IL) 6, el fibrinógeno, el recuento de leucocitos y el ácido hialurónico, son poderosos predictores de la mortalidad en los pacientes en diálisis, mientras que los índices de calidad de diálisis y los índices nutricionales son factores de riesgo mucho más débiles.²¹⁷

1.1.- TERAPIA RENAL SUSTITUTIVA EN ERC

En la actualidad, las opciones de terapia renal sustitutiva disponibles para pacientes con ERC en estadio 5 (filtrado glomerular menor de 15 ml/min/1,73 m²) son las siguientes:

- HEMODIÁLISIS:²²³ La hemodiálisis convencional es la terapia renal sustitutiva más empleada. Se basa en la difusión de solutos por gradiente de concentración a través de una membrana semipermeable y es efectiva en la eliminación de pequeños solutos (urea, creatinina), así como en corregir las alteraciones electrolíticas, del equilibrio ácido-base y la sobrecarga de fluidos observada.

El paso de solutos a través de la membrana depende del tamaño de los poros de esta. Existen membranas de baja permeabilidad (low-flux) y membranas de alta permeabilidad (high-flux). Las membranas de alta permeabilidad presentan entre otras características, un tamaño de poro mayor que las de baja permeabilidad, permitiendo por tanto la eliminación de solutos de mayor peso molecular como por ejemplo la beta 2 microglobulina (β_2m). La eliminación de solutos de mediano y alto peso molecular adquiere una vital importancia en estos pacientes debido a que la acumulación de este tipo de toxinas urémicas se ha relacionado con muchas de las complicaciones que presentan este tipo de pacientes así como

con la elevada tasa de morbimortalidad global y cardiovascular.

Para potenciar la eliminación de solutos de mediano y alto peso molecular, se han desarrollado técnicas de diálisis que añaden transporte convectivo al transporte difusivo propio de la hemodiálisis convencional. Este tipo de técnicas que combinan transporte difusivo y convectivo son técnicas de hemodiafiltración. Existen diferentes técnicas de hemodiafiltración. Entre ellas, destacan actualmente las técnicas de hemodiafiltración en línea en sus diferentes modalidades (predilución, postdilución, mixta y mid-dilution). La más utilizada en la actualidad es la hemodiafiltración en línea postdilución.

- **DIÁLISIS PERITONEAL:** En este tipo de técnica, indicada en pacientes y en circunstancias determinadas, la membrana de intercambio de solutos entre el compartimento sanguíneo y la solución peritoneal empleada en cada caso específico, es el peritoneo del paciente.

- **TRASPLANTE RENAL:** Si las características del paciente no lo contraindican, el trasplante renal es la opción más recomendada a los pacientes con ERC en estadios avanzados. Es la opción con mejores resultados, ya que si el funcionamiento del riñón trasplantado es óptimo, este suple todas las funciones que desempeñaban los riñones nativos del paciente. Es una técnica no exenta de riesgo y complicaciones. A las propias de la técnica quirúrgica y del postoperatorio inmediato, se suman las de un posible rechazo a corto y/o largo plazo. Además, los pacientes trasplantados deben tomar una combinación de tratamiento inmunosupresor, con los efectos secundarios que ello conlleva.³⁴

2. INFLAMACIÓN EN ERC Y HEMODIÁLISIS

2.1. MECANISMO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CRÓNICA

Tanto los humanos como el resto de seres vivos se tienen que defender de los agentes dañinos que sean capaces de trastornar su homeostasis. Con esta finalidad, se han desarrollado varios mecanismos efectores capaces de defender al organismo frente a estos antígenos y agentes, que pueden estar mediados por células o por moléculas solubles. Como consecuencia del daño tisular, se activa el sistema inmunitario innato y después el adaptativo, como parte de una compleja reacción del organismo que expresa la respuesta al daño celular. La inflamación se consideraba como un sistema de defensa primario del individuo y, desde este punto de vista, como la reacción clave de la respuesta inmunitaria innata. Sin embargo, la inflamación puede considerarse un arma de doble filo y conducir también a la muerte o a enfermedades debilitantes, especialmente cuando no se limita a la reacción inicial. El mecanismo que desencadena la respuesta del organismo a la lesión es extremadamente sensible, y es importante que pueda responder a la lesión sanando y reparando el tejido dañado, así como eliminando el agente causante e interrumpiendo la respuesta inflamatoria.¹⁶⁹

Las células del sistema inmunitario están ampliamente distribuidas por todo el cuerpo, pero si se produce una infección o se lesiona un tejido, es necesario que se concentren, y también sus productos, en el lugar de la lesión. Los factores principales de la respuesta inmunitaria son, por lo tanto, la vasodilatación (aumento de flujo sanguíneo a la zona dañada), el aumento de la permeabilidad vascular (paso de compuestos difusibles al interior de la célula), el movimiento de las células inflamatorias a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia el lugar de la lesión, los cambios en los perfiles biosintéticos, metabólicos y catabólicos de muchos órganos, y la activación de las células del sistema inmunitario. Además, durante la inflamación se producen un gran número de

efectos más distantes. Entre éstos se incluyen la producción de proteínas de fase aguda, los componentes complementarios, la fiebre y la activación de la inmunidad sistémica.

Para evitar el daño tisular, la respuesta inflamatoria debe producirse de forma limitada y coordinada. En esta respuesta, una amplia variedad de células conectadas entre sí y de mecanismos solubles se activan cuando se produce la lesión tisular. El desarrollo de las reacciones inflamatorias está controlado por las citoquinas, por productos del sistema enzimático del plasma, por las prostaglandinas, los leucotrienos, y por los mediadores vasoactivos. Las citoquinas interactúan primero con los receptores de la membrana celular de alta afinidad y después regulan la transcripción de una serie de genes celulares mediante señales secundarias. Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), las IL 1, 2, 3, 4, 5 y 6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), los productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs), la angiotensina II, y los antígenos inespecíficos se acumulan y/o están presentes en el plasma urémico y representan unas fuentes de reacción inflamatoria. Estas moléculas interactúan con receptores específicos de la célula para estimular las rutas de transcripción, principalmente la ruta JAK-STAK por parte de las IL y la ruta NF κ B (factor de transcripción Kappa B) por parte del resto de moléculas, que acaban produciendo la expresión de proteínas inflamatorias en el núcleo de diversas células. Estas transcripciones alteradas producen cambios en el comportamiento celular. Las células diana, sobre las cuales las citoquinas transforman sus señales de información, se pueden localizar en cualquier compartimento del organismo, muy distantes en algunas ocasiones del lugar de secreción.

En las reacciones inflamatorias el último control depende del propio antígeno y, por esta razón, la acumulación de células en el lugar de la infección crónica o en las reacciones autoinmunitarias (donde al antígeno no puede al final erradicarse) es bastante diferente de aquella que se produce en lugares donde el estímulo

antigénico se elimina rápidamente. La inflamación crónica es una respuesta inflamatoria de duración prolongada (semanas, meses o incluso indefinidamente) y se perpetúa por la persistencia del estímulo causante de la inflamación. En esta situación, una reacción inflamatoria caracterizada por la infiltración de neutrófilos y por un edema da lugar a la predominancia de fagocitos mononucleares y de linfocitos. El proceso inflamatorio crónico provoca inevitablemente la lesión tisular, lo cual, hasta cierto punto, sucede con mayor probabilidad en el proceso de curación normal. Pero este proceso llega a ser exagerado y crónico cuando hay una eliminación ineficaz de las materias extrañas, como sucede en ciertas infecciones crónicas o después de la introducción de cuerpos extraños, de moléculas modificadas o de la precipitación de cristales. En esta situación, la acumulación de toxinas urémicas y la sobrecarga de fluidos propia de los pacientes con enfermedad renal crónica, la interacción entre la sangre y el dializador, y la introducción de compuestos exógenos (como las endotoxinas del dializado) representan un modelo de estímulos crónicos para la respuesta inflamatoria. El deterioro de la respuesta inmune en la uremia y la disminución de la función de los neutrófilos y los linfocitos T en pacientes con ERC se traducen en un mayor riesgo de infección⁵¹ que puede ejercer también como estímulo crónico del proceso inflamatorio.

2.1.1. BASE CELULAR DEL PROCESO INFLAMATORIO

La respuesta inflamatoria esta mediada por células inmunocompetentes, encargadas de generar esta respuesta y determinar la necesidad de su persistencia. La inflamación se caracteriza por la presencia de fagocitos mononucleares y sus derivados (células epiteloides y gigantes), linfocitos, células plasmáticas (linfocitos diferenciados que adoptan una morfología especial), neutrófilos, eosinófilos y fibroblastos.¹³⁶ En el curso natural de la respuesta inmune, las células circulantes inmunocompetentes reconocen el antígeno generando una respuesta

inflamatoria rápida y eficaz que limita la agresión. Para ello, estas células están dotadas de moléculas de superficie como el CD14, receptor para el LPS, presente en la mayoría de los monocitos.⁷⁰ Cuando el antígeno se une al receptor CD14 se inicia la respuesta inflamatoria y cuando cesa el estímulo antigénico, se detiene la producción de señales inflamatorias desencadenando una respuesta antiinflamatoria en la que las células inmunocompetentes mueren por apoptosis.¹⁵² Este mecanismo biológico asegura una respuesta inflamatoria limitada y eficaz. Cuando el estímulo antigénico perdura en el tiempo, o la red de control antiinflamatoria no actúa de manera eficaz, las células inflamatorias prolongan su supervivencia haciendo que la respuesta sea crónica.¹³⁶

Papel de los monocitos

Los monocitos de sangre periférica constituyen una población de células muy heterogénea, sin embargo, la mayoría de ellos tiene en común que presentan una elevada expresión del receptor CD14, en su membrana plasmática. En la década de los 80, se descubrió una subpoblación de monocitos con una baja expresión de CD14 y que coexpresaban CD16.¹⁶⁸ La función biológica de CD16 o FcγRIII en la célula es actuar como componente del receptor de baja afinidad para Fc, FcγRIII, y mediar en la fagocitosis y citotoxicidad debida a células dependientes de anticuerpos. En función a los receptores CD14 y CD16 se pueden diferenciar tres tipos de poblaciones de monocitos por citometría de flujo (Figura 1):

- CD14⁺⁺CD16⁻: representan más del 80% de los monocitos en sujetos sanos.
- CD14⁺⁺CD16⁺: es una población que no está bien caracterizada. Recientemente se ha publicado un estudio donde estas células presentan un papel predictor de eventos cardiovasculares en pacientes en diálisis.⁷⁶
- CD14⁺CD16⁺: esta población representa menos del 5% del total de monocitos

en sujetos sanos y está relacionada con enfermedades inflamatorias.⁶²

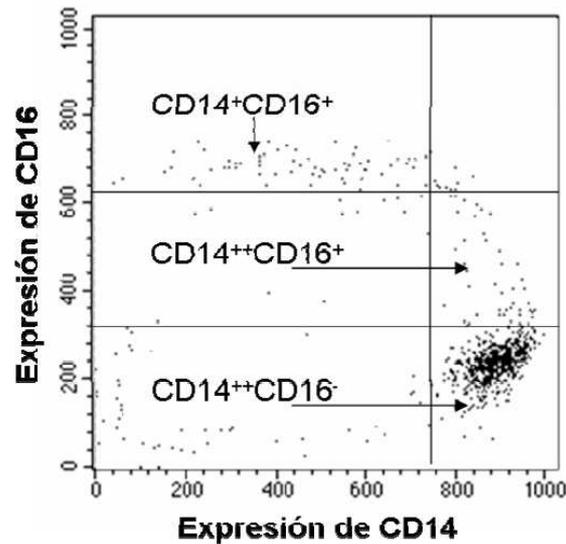


Figura 1. Análisis de las subpoblaciones monocíticas por citometría de flujo. Para analizar las tres subpoblaciones de monocitos se selecciona una región donde se incluyen el total de monocitos en la ventana de tamaño y complejidad (no se muestra). A partir de esta región se separan las subpoblaciones de monocitos utilizando los anticuerpos CD14 y CD16. La imagen muestra un ejemplo de la identificación de estas células en un sujeto sano.

Aunque CD14+CD16+ sea una población minoritaria en sujetos sanos, puede alcanzar hasta el 40% del total de monocitos en algunas enfermedades inflamatorias como en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA),⁶² insuficiencia renal crónica (IRC),¹⁵⁷ lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.²⁵ Estos monocitos han sido descritos como una subpoblación de células más maduras que CD14++CD16- y productoras de citoquinas proinflamatorias como TNF α .¹⁰

2.2. CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS

2.2.1. CITOQUINAS

Las citoquinas son proteínas solubles de bajo peso molecular, producidas fundamentalmente por linfocitos y macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales, del tejido conjuntivo y adiposo. Actúan como mensajeras del sistema inmune y controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos.

Se han descrito una gran variedad de citoquinas proinflamatorias que se encuentran alteradas en el entorno urémico e influyen en el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Describiremos detenidamente dos de ellas: la interleuquina 6 (IL 6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

Interleuquina 6

La interleuquina 6 (IL 6) es una glicoproteína producida por numerosos tipos de células inmunes, incluyendo monocitos, células mesoteliales, fibroblastos, adipocitos y linfocitos en respuesta a estímulos fisiológicos, tal como TNF α , IL 1 β , endotoxinas y estrés oxidativo.²¹⁵ Las citoquinas ejercen su efecto biológico a través de su unión con receptores específicos expresados en la superficie celular. Los receptores son proteínas de membrana que constan de una región extracitoplasmática de unión con la citoquina, una región transmembrana y una región citoplasmática que interviene en la transmisión de señales al interior de la célula.

El receptor de la IL 6 se compone de una subunidad de unión al ligando (IL6-R o gp 80) y una subunidad gp 130 que traduce las señales al interior de la célula. La

unión de la molécula a su receptor en la superficie de la célula forma un complejo que favorece la heterodimerización de la subunidad gp 130²²² iniciando una cascada de señalización que, en último término, dará lugar a la transcripción de determinados genes cuyos productos proteicos son los que van a ejercer el efecto biológico correspondiente.⁹⁴

Los niveles séricos de IL 6 se encuentran elevados en la mayoría de los pacientes con ERC.²¹¹ Las causas pueden ser atribuidas a multitud de factores (Tabla 2). Pacientes con función renal disminuida presentan signos de inflamación^{52,171} que sugieren que el riñón interviene en el aclaramiento de citoquinas proinflamatorias, puesto que los niveles de proteínas inflamatorias se incrementan a medida que la lesión renal progresa.

Aunque una menor eliminación puede ser una de las principales causas de elevación de IL 6 en pacientes con ERC, el incremento en la producción de la misma también es importante. La sobrecarga de volumen y la insuficiencia cardiaca congestiva contribuyen a incrementar los niveles de IL 6 y TNF α a medida que se deteriora la función renal.²⁰¹

Tabla 2. Factores que se asocian con un incremento en los niveles de IL 6 y TNF α en pacientes con ERC.

Factores genéticos.
Edad.
Disminución de la función renal y retención de solutos urémicos.
Comorbilidad.
Sobrecarga de volumen / insuficiencia cardiaca congestiva.
Infecciones persistentes.
<i>Chlamydia pneumoniae</i> .
Catéter (<i>Staphylococcus aureus</i>).
Periodontitis.
Estrés oxidativo.
Obesidad.
Factores relacionados con la diálisis.
Membranas.
Líquido de diálisis no estéril.

Además, infecciones persistentes por *Chlamydia pneumoniae*, se asocian con aterosclerosis y eventos cardiovasculares.²⁵⁷ Se ha demostrado que *C. pneumoniae* induce la producción de IL 6 en las células endoteliales,¹⁵⁶ mecanismo por el cual la infección por *C. pneumoniae* podría contribuir al proceso de daño vascular durante el desarrollo y progresión de lesiones ateroscleróticas.^{96,213}

Elevados niveles de IL 6 se han asociado con la progresión de aterosclerosis en pacientes con ERC.²¹³ Además disminuye la expresión de adiponectina, una adipocina antiaterogénica, en estudios in vitro²³ otro mecanismo por el cual la IL 6 promueve la aterosclerosis.

Factor de necrosis tumoral alfa

La teoría de una respuesta anti-tumoral del sistema inmune in vivo fue reconocida por el médico William B. Coley hace unos 100 años. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) debe su nombre a la habilidad para destruir células tumorales (ejerce citotoxicidad en líneas celulares tumorales) y causar necrosis hemorrágica en tumores en modelos animales in vivo.³³ Es producido principalmente por macrófagos en respuesta a daño tisular o infección.^{9,82} Pertenece a una familia de ligandos que activan a sus receptores iniciando señales para la proliferación celular y apoptosis.^{9,82,120,135}

TNF α es una potente citoquina proinflamatoria que interviene en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas, tal como la artritis reumatoide y la ERC.

TNF α es sintetizado principalmente como una proteína transmembrana, dispuesta en homotrímeros estables, que se expresa en la superficie celular de linfocitos y macrófagos activados además de otros tipos celulares.^{104,125,175} A través de una escisión proteolítica mediada por una metaloproteinasa, TACE (TNF α enzima conversora), pasa a su forma soluble, que es liberada y ejerce sus acciones biológicas a través de la unión con sus receptores específicos TNF-R1 y TNF-R2. TNF α transmembrana también se une a ambos receptores, aunque principalmente

ejerce sus efectos biológicos a través del receptor tipo 2.⁷¹ Por lo que TNF α transmembrana ejerce su función biológica por contacto célula-célula o de forma local, a diferencia de la forma soluble que entra en el torrente sanguíneo y actúa en sitios remotos o alejados de su lugar de producción.¹⁷⁷

Después de la liberación de la forma soluble de TNF α por TACE, el dominio intracelular residual del precursor migra (o se transloca) hacia el núcleo de la célula, donde media la producción de citoquinas.⁸²

TNF-R1 y TNF-R2 se expresan en la mayoría de células nucleadas²³² y forman dímeros en la superficie celular, donde se unen a una molécula de TNF α trimérica, provocando la activación de un complejo proceso de señalización intracelular que media los efectos pleiotrópicos del TNF α .^{22,127}

Una señalización exagerada mediada por esos receptores lleva a inflamación severa, daño tisular y choque cardiovascular, mientras que una producción lenta y continuada de TNF α lleva a inflamación crónica.

En la uremia, el deterioro de la función renal puede ser uno de los factores más importantes asociados con un significativo aumento de la actividad de TNF α .¹⁵¹

En modelos animales se ha demostrado que la reducción de la función renal afecta al aclaramiento de TNF α .¹¹

TNF α parece tener un papel importante en el desarrollo de calcificaciones vasculares. Además de intervenir en la disfunción endotelial^{15,61} varios estudios han demostrado que la incubación de células vasculares calcificantes con concentraciones crecientes de TNF α condujo a un incremento dosis-dependiente de la actividad de la fosfatasa alcalina y al depósito mineral en las células.^{226,239}

Asimismo, en co-cultivos de células vasculares calcificantes y monocitos, la actividad de la fosfatasa alcalina alcanzó niveles significativamente mayores con respecto a los cultivos de células vasculares calcificantes sin monocitos.²²⁷ La activación con LDL de los monocitos en co-cultivo también produjo un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina. Sin embargo, en cultivos de

células vasculares calcificantes sin monocitos o en co-cultivos en los cuales las células vasculares calcificantes y los monocitos no tenían contacto directo (cultivo con insertos) no se observó este incremento en la actividad de dicha enzima. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el aumento de calcificación en células vasculares calcificantes inducida por los monocitos se debe a dos tipos de mecanismos: la interacción intercelular y la producción de factores solubles como el TNF α .

Otro estudio reciente,¹⁵⁰ evidencia la correlación entre la homeostasis iónica y los mecanismos inflamatorios. Nadra y cols. demostraron que los cristales básicos de fosfato cálcico provocan una respuesta inflamatoria en macrófagos humanos *in vitro*. En su estudio, los macrófagos estimulados con los cristales de fosfato cálcico liberaron TNF α , IL 1 e IL 8.

2.2.2. QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas, denominadas también citoquinas quimioatrayentes, son pequeñas proteínas que dirigen el movimiento de los leucocitos circulatorios a los lugares de inflamación o de daño. Pertenecen a una gran familia de polipéptidos de bajo peso molecular altamente básicos y que están formadas por 70-125 aminoácidos. Existen aproximadamente 40 quimioquinas humanas que se agrupan en cuatro familias en función de su estructura. La mayor de ellas, es la familia "CC". Su función se basa en atraer a las células mononucleares a los lugares de inflamación crónica y la más característica de ellas es la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP 1). Las quimioquinas interfieren con las células mediante la activación de los receptores transmembrana de superficie.³⁹

Su función consiste en regular procesos celulares como la migración, el crecimiento y la activación de leucocitos, y otros tipos celulares.¹⁶⁰ Las quimioquinas se producen en respuesta a una serie de citoquinas proinflamatorias primarias, tales como IL 1 y TNF α .

2.3. CAUSAS DE LA INFLAMACIÓN

Las principales causas de inflamación en pacientes con ERC y las causas adicionales en pacientes con ERC en hemodiálisis se muestran en la Tabla 3.

CAUSAS EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	CAUSAS ADICIONALES EN HEMODIÁLISIS
Comorbilidad (edad avanzada, hábito tabáquico, insuficiencia cardiaca crónica, diabetes mellitus, obesidad, hipertensión, inactividad física, dislipemia)	Infecciones en acceso vascular, presencia de catéter venoso central como acceso vascular, trombosis de FAVI y/o prótesis
Reducción en el aclaramiento renal de citoquinas	Bioincompatibilidad del dializador
Acumulación de toxinas urémicas	Exposición a endotoxinas y a otras sustancias del dializado activadoras de citoquinas
Infección persistente no reconocida (enfermedad periodontal, tuberculosis, Helicobacter Pilory, Chlamydia Pneumoniae)	Injerto renal no funcionante en paciente trasplantado previamente
Sobrecarga de fluidos	
Alteraciones en el metabolismo mineral	

Tabla 3. Causas de inflamación en ERC y causas adicionales en hemodiálisis.

2.3.1. EL ESTADO DE UREMIA COMO CAUSA DE LA INFLAMACIÓN (CAUSAS DE LA INFLAMACIÓN NO RELACIONADAS CON LA DIÁLISIS)

La causa del estado proinflamatorio en los pacientes con ERC todavía no está bien establecida, aunque es probable que sea multifactorial y depende de la definición de la inflamación. En primer lugar, la inflamación se puede definir como un aumento en los niveles plasmáticos de las citoquinas proinflamatorias, lo cual podría estar causado tanto por una disminución en el aclaramiento renal como por un incremento en la producción de citoquinas. Cuando los niveles plasmáticos de IL 1 y de TNF α se compararon en pacientes antes del comienzo de la diálisis frente a aquellos con un tratamiento a largo plazo, no se encontraron diferencias.¹⁷⁶ Esto sugiere que la ERC por sí misma puede ser la causa más importante de la presencia de citoquinas inflamatorias en el plasma. Sin embargo, otros estudios sugieren que la duración de la diálisis tiene un impacto importante en el estado inflamatorio crónico.⁷⁵ De hecho, el deterioro de la función renal se ha asociado con un aumento significativo de los niveles de citoquinas plasmáticas en los pacientes con ERC y el aclaramiento de creatinina se correlaciona con los niveles de varias citoquinas y de sus receptores solubles en circulación en los pacientes con diversos grados de insuficiencia renal.¹⁷² Además en los pacientes con ERC se encontró una excreción urinaria de IL6-R más baja en comparación con los controles,¹³⁸ y la disminución de la función renal puede afectar al aclaramiento tanto de TNF α ¹¹ como de IL 1.¹⁷⁹

La definición más habitual de inflamación en la práctica clínica ha sido una elevación plasmática de PCR. La mayoría de los estudios publicados muestran hallazgos consistentes sobre una estrecha correlación entre la PCR circulante y las citoquinas proinflamatorias, especialmente IL 6, que depende de la estimulación de TNF α y de IL 1. Por lo tanto, la PCR refleja la respuesta hepática a los altos

niveles de citoquinas proinflamatorias en circulación, y las mismas causas que se describen para la inflamación en ERC podrían ser responsables de los altos niveles de PCR. Otras causas de una PCR elevada en los pacientes con ERC, no relacionadas con la diálisis, pueden ser factores como la insuficiencia cardiaca crónica con sobrecarga de fluidos,¹⁵⁵ que parece agravarse con la progresión de la enfermedad renal.²⁴¹ Se ha descrito una importante asociación entre la ERC y la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) en los pacientes que todavía no habían sido sometidos a diálisis.²⁴² Una correlación positiva similar se ha observado entre la ERC y el índice de la masa del ventrículo izquierdo en pacientes hemodializados.¹⁶⁶

Sin embargo, sigue sin definirse aún si existe una relación causal entre la ERC y la HVI en pacientes urémicos. Por otra parte, es posible que la ERC sólo sea un marcador de la HVI o que tenga un efecto directo sobre el miocardio, favoreciendo la HVI. Finalmente, la ERC y la HVI se pueden relacionar fácilmente debido a factores subyacentes en común, como la sobrecarga de volumen y la hipertensión arterial. La sobrecarga de volumen es una complicación frecuente en los pacientes en diálisis que se relaciona con la función renal residual¹⁰¹ y puede por sí misma asociarse a activación inmunitaria.¹⁵⁵ Esta activación se puede producir por una translocación de bacterias o toxinas en pacientes con edema grave en el intestino, como resultado de una sobrecarga de volumen grave³ que, por su parte, puede llevar a un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, incluido TNF α .¹¹² Esta hipótesis concuerda con un trabajo que muestra que los pacientes en diálisis con un historial de insuficiencia cardiaca presentaban una PCR más alta.²⁴² Además, tener una sobrecarga de volumen crónica o presentar con anterioridad episodios de sobrecarga de volumen se asocia con una mayor hipertrofia y dilatación, así como una mayor disfunción del ventrículo izquierdo.¹⁰⁰ Otra explicación de la asociación entre la PCR y la HVI se puede relacionar con un aumento del estrés oxidativo, que es altamente

prevalente en los pacientes con ERC²³⁷ y que también se relaciona con la inflamación.¹⁵⁴ Cabe destacar que, en un modelo experimental de insuficiencia renal, el tratamiento con el antioxidante d1- α -tocoferol previene el desajuste de cardiomiocitos en el ventrículo izquierdo y reduce la fibrosis miocárdica, lo cual indica el papel del incremento del estrés oxidativo sobre la patogénesis de la HVI y sobre la fibrosis miocárdica en la uremia.²

Otro importante factor para la activación de la respuesta inflamatoria es el efecto inmunológico de las toxinas urémicas sobre el sistema inmunitario. Un ejemplo de toxinas urémicas con efectos proinflamatorios son los AGEs. Cuando los grupos aldehídos o cetonas de los carbohidratos reaccionan con los aminoácidos, se forman varios AGEs. En los pacientes con ERC, es posible que la acumulación de AGEs producida por una disminución del aclaramiento renal pueda también favorecer la inflamación. De hecho, se ha encontrado una correlación entre un AGEs, la pentosidina, y la ERC en pacientes tanto renales²¹⁹ como no renales.¹⁴⁶ Además, un estudio *in vitro*²⁰⁰ mostró que los AGEs pueden desencadenar una respuesta inflamatoria a través del receptor celular de los AGEs (RAGE) y de la activación de la cascada de señales del NF κ B.

Es cada vez más evidente que el tejido adiposo no es sólo un depósito de energía inerte, sino también un órgano endocrino activo que produce varias adipocinas, incluidos la leptina, la resistina, la adiponectina, la IL 6, el TNF α y el inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (IAP-1).¹²⁶ Hemos encontrado recientemente una relación entre la masa de grasa corporal (especialmente la grasa corporal del tronco) y los parámetros inflamatorios en los pacientes con ERC próximos al comienzo de la diálisis.²¹⁸ Así, es probable que la producción de marcadores inflamatorios por parte del tejido adiposo pueda contribuir a la inflamación en pacientes con ERC. El aumento de la masa de grasa corporal es un hallazgo cada vez más frecuente en los pacientes que comienzan hemodiálisis y puede llegar a ser excesivo en algunos pacientes.⁹³ Esto podría deberse en parte a

una predisposición genética, según la información proporcionada de que los pacientes en diálisis peritoneal con una delección/delección polimórfica en el genotipo del gen de la proteína desacoplante-2 (UCP-2) (una proteína con propiedades termogénicas que desempeña un papel en el control de la eficacia metabólica) presentaron un aumento significativo en el peso corporal y en la masa de grasa corporal durante la diálisis peritoneal, en comparación con los pacientes con una inserción/delección del genotipo UCP-2.¹⁵⁸ Por otra parte, la ingesta calórica en la dieta puede contribuir a la adiposidad, y estos factores, al igual que el nivel de la actividad física de los pacientes, deben modificarse.

2.3.2. CAUSAS DE LA INFLAMACIÓN RELACIONADAS CON LA DIÁLISIS

Aunque se sabe que los niveles de citoquinas proinflamatorias en circulación están elevados antes del comienzo del tratamiento con diálisis, está claro que el procedimiento de diálisis por sí mismo puede provocar una actividad inflamatoria adicional. Los signos de la inflamación se observan habitualmente tanto en pacientes en hemodiálisis¹⁶¹ como en pacientes en diálisis peritoneal,²⁴² y parece que la hemodiálisis y la diálisis peritoneal tienen efectos similares sobre la inflamación sistémica. Sin embargo, varias pruebas sugieren que los factores asociados al proceso de diálisis (expuestos más arriba) podrían contribuir a la respuesta inflamatoria. Inicialmente, Haubitz y cols.⁷⁴ demostraron que las proteínas de fase aguda se activan durante la hemodiálisis, debido probablemente a la liberación de citoquinas como consecuencia del contacto entre el dializado y la sangre. Schindler y cols.¹⁹⁷ sugieren que la membrana del dializador puede desempeñar un papel en la activación de una reacción inflamatoria durante el proceso de diálisis. Además, los resultados de Memoli y cols.¹³⁸ sugieren que la mala biocompatibilidad del cuprofán en la diálisis aumenta los efectos inflamatorios de la IL 6. En los pacientes en hemodiálisis con membranas de

cuprofán, las citoquinas proinflamatorias contenidas en las células mononucleares en sangre periférica, así como la respuesta de estas células estimuladas por endotoxinas, fueron varias veces superiores a las de los pacientes no dializados con IRC, pacientes en diálisis peritoneal o controles sanos.¹⁷⁶ El uso de membranas de diálisis bioincompatibles se asocia a un aumento en la apoptosis de células mononucleares. La uremia por sí misma también provoca la apoptosis de este tipo de células.¹³¹ Esta apoptosis de células mononucleares se asocia a una baja expresión de CD14,³² a la presencia de una disminución de la longitud del telómero, a un aumento del subtipo de monocitos CD14+CD16+ y a un aumento en la producción por parte de estas células de IL 1 e IL 6.¹⁸⁴

Las pruebas disponibles también sugieren que la calidad del agua utilizada para preparar el dializado²²⁵ podría contribuir a la inflamación. La transferencia de productos bacterianos del dializado contaminado a la sangre del paciente depende del tipo (celulósico frente a sintético) y de la permeabilidad (retrofiltración de bajo flujo frente a alto flujo) de la membrana que se utilice en la hemodiálisis.¹²² En algunas circunstancias, las sustancias que activan a las citoquinas pueden atravesar las membranas del dializador y contribuir a la inflamación crónica que se asocia al tratamiento con hemodiálisis a largo plazo. Como ejemplo, los fragmentos bacterianos que se generan a partir de las biopelículas son capaces de cruzar la membrana del dializador y estimular la respuesta inflamatoria del paciente.⁸¹ Fragmentos de DNA bacteriano hacen que las células mononucleares CD14+CD16+ y no las CD14++CD16-, expresen más IL 1 β , que produzcan más citoquinas y que perpetúen su apoptosis.^{142,153}

2.4. CONSECUENCIAS DE LA INFLAMACIÓN

Se ha descrito una asociación entre el aumento de la PCR y el aumento de la morbilidad por parte de Bergström y cols. ¹³ Varios grupos de investigación han comunicado descubrimientos prácticamente idénticos en pacientes tanto en

hemodiálisis²⁵² como en diálisis peritoneal.²⁴² Por consiguiente, el aumento de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias se ha relacionado también con el aumento de la mortalidad en los pacientes que comienzan tratamiento con diálisis.¹⁷⁰ El aumento de la PCR es un fuerte predictor de mortalidad cardiovascular en los pacientes sin IRC (mucho más fuerte que los factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular bien establecidos ya, como el LDL-colesterol).¹⁸⁹ Estos resultados sugieren que la asociación entre inflamación y aterosclerosis es especialmente clara en los pacientes en diálisis.²¹⁴ De hecho, se ha demostrado que la PCR es un predictor independiente del número de placas ateroscleróticas en las arterias carótidas de los pacientes en diálisis²⁵⁶ y que está fuertemente relacionada con la malnutrición, la aterosclerosis²¹⁴ y la calcificación vascular²⁴³ en pacientes con IRC.

Aunque la asociación entre enfermedad cardiovascular e inflamación en la población de pacientes en diálisis está bien documentada, no se ha establecido si la respuesta de la fase aguda refleja simplemente un síntoma simultáneo, que se produce junto con la enfermedad aterosclerótica establecida, o si los diferentes reactantes de fase aguda por sí mismos están envueltos en el inicio o en la progresión de la aterosclerosis. Se debe resaltar el hecho de que las citoquinas proinflamatorias puedan tener un efecto aterogénico directo por sí mismas. Por ejemplo, se ha demostrado que el TNF α es un mediador de la disfunción endotelial,¹⁵ que disminuye la secreción de Apo E²⁵⁸ y promueve la calcificación in vitro de las células vasculares.²²⁶ Huber y cols.⁸³ han propuesto también que la IL 6 puede tener propiedades aterogénicas independientes, como han demostrado sus estudios, según los cuales la inyección de IL 6 recombinante agrava la aterosclerosis precoz en ratones. Otros estudios que demuestran que la elevación de IL 6 es un predictor de infarto de miocardio en hombres sanos¹⁹⁰ que afecta también a la mortalidad cardiovascular a los cinco años en pacientes ancianos,⁷³ apoyan más aún la idea de que la IL 6 puede ser una causa de aterosclerosis.

Además, varias líneas de investigación sugieren que la PCR puede estar directamente implicada en la aterogénesis como factor causante.²²⁸ Recientemente, se ha demostrado que la PCR también tiene unos efectos proinflamatorios sobre las células endoteliales en humanos, bien directamente²⁵⁹ o a través de la inhibición de la angiotensina II y del óxido nítrico.²⁴⁴ Otros reactantes de fase aguda como la lipoproteína A¹⁹⁵ y el fibrinógeno²⁰⁷ también pueden tener propiedades que aceleran la aterogénesis. Sin embargo, la asociación entre inflamación crónica y la enfermedad cardiovascular puede ser también directa, puesto que la inflamación crónica se ha asociado con la disfunción endotelial, la resistencia a la insulina y el aumento del estrés oxidativo, los cuales se cree que están implicados en la aterosclerosis.²¹⁰

Aunque la mayoría de trabajos que investigan los mecanismos que hay detrás del estado inflamatorio urémico se han centrado en los monocitos y en los macrófagos, hay datos recientes que indican que el endotelio vascular tiene un importante papel en la regulación de la inflamación.⁶⁹ Además, desde un punto de vista estratégico, la inflamación vascular puede ser una diana adecuada a la que dirigir las intervenciones terapéuticas.

3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN ERC Y HEMODIÁLISIS

En los pacientes con ERC en estado avanzado tratados con hemodiálisis, es evidente que un número de complicaciones tanto relacionadas con la diálisis (biocompatibilidad de la membrana y calidad del agua de diálisis) como no relacionadas con ella (la uremia, la alta comorbilidad y la alta tasa de infecciones crónicas) pueden contribuir a un estado de inflamación crónica.²¹⁷

Dentro de los factores de riesgo no tradicionales ya comentados, el estado de microinflamación crónica presente en la uremia tiene un papel muy relevante en la aparición de daño endotelial en pacientes con ERC. Se han publicado varios trabajos en los que se describe la asociación del estado de microinflamación con la aparición de disfunción endotelial desde estadios iniciales de la enfermedad renal crónica. Por otra parte, se conoce que la disfunción endotelial es el primer paso para el posterior desarrollo de aterosclerosis, esto puede explicar parcialmente la elevada tasa de enfermedad cardiovascular en este grupo de pacientes.^{48,141,144,194,208}

Los factores de riesgo cardiovascular inciden sobre el endotelio vascular afectando a sus funciones y hacen que diferentes células del árbol vascular asuman un fenotipo proinflamatorio.¹⁶⁷

La comprensión de los mecanismos implicados en los episodios iniciales de la inflamación vascular puede proporcionar nuevas perspectivas en cuanto a los mecanismos efectores de la enfermedad vascular y mantener, además, la esperanza de poder ofrecer varios lugares de actuación para las intervenciones terapéuticas específicas en la ERC relacionada con la enfermedad cardiovascular.

3.1. INFLAMACIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio vascular es un tejido dinámico y activo que controla muchas funciones importantes, entre las que se incluyen la regulación del tono vascular y

el mantenimiento de la circulación sanguínea, la coagulación y las respuestas inflamatorias. La regulación del tono vascular se produce con la liberación de sustancias vasoactivas como el óxido nítrico (NO). Por tanto, el déficit de NO que tienen los pacientes con IRC desde estadios iniciales de la enfermedad,¹⁴⁷ va a hacer que aparezcan datos de disfunción endotelial por alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio, favoreciendo el desarrollo de aterosclerosis y posterior aparición de eventos cardiovasculares.

Uno de los mecanismos que se ha estudiado en mayor profundidad es la producción en las áreas de inflamación, de especies reactivas de oxígeno (ROS), como es el anión superóxido liberado por los fagocitos reclutados en las zonas de inflamación por este aumento del estrés oxidativo.⁴ La liberación de ROS es la consecuencia de un desbalance entre los mecanismos proinflamatorios y antiinflamatorios, a favor de los proinflamatorios; que se sabe tienen los pacientes urémicos.⁸⁰ Las células del endotelio son dañadas por las ROS; a pesar de que el endotelio posee mecanismos antioxidantes para defenderse frente a estos productos lesivos, si el número de ROS es elevado o si la liberación de estas ROS se perpetua 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 la aterosclerosis.²⁵⁴ El aumento de ROS va a dar lugar a una disminución del NO disponible, cuyo principal papel a nivel del endotelio vascular se sabe que es producir una vasodilatación dependiente de endotelio, y por tanto, su disminución contribuye a la aparición de disfunción endotelial.¹⁴⁷

Junto con la producción de ROS, que va a ser determinante en el descenso de los niveles de NO plasmático, otro de los mecanismos que influye en la aparición de daño disfunción endotelial produciendo igualmente un descenso de los niveles de NO plasmático en los pacientes urémicos, es el aumento de dimetilarginina asimétrica (ADMA). ADMA es un inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), por lo que el aumento de ADMA que se ha observado

en los pacientes con IRC por una disminución del aclaramiento renal, hace que disminuyan los niveles de NO plasmáticos y por tanto, el aumento de ADMA observado en la uremia, es otro de los mecanismos que explican la aparición de disfunción endotelial desde estadios iniciales de la IRC, produciendo al igual que las ROS, una alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio por descenso del NO.²²¹

A pesar de que se han publicados varios trabajos en la literatura que relacionan daño endotelial, estrés oxidativo e inflamación en los pacientes con IRC, no está aún totalmente claro cuál es el mecanismo por el que el estado de microinflamación de los pacientes urémicos produce el daño endotelial; se piensa que se trata de una alteración a nivel del sistema inmune, relacionado con la persistencia de la inflamación crónica.^{108,183,209}

Como ya hemos comentado previamente, la respuesta inflamatoria juega un papel muy importante en la defensa del organismo frente a agresiones externas. Su principal objetivo es eliminar los agentes que pueden producir daño tisular. Pero si este estado inflamatorio se perpetúa en el tiempo, como ocurre en la uremia, el estado inflamatorio crónico puede llegar a ser nocivo para el organismo, pasando de ser un mecanismo de defensa a ser un mecanismo de daño.⁸ Por tanto, el estado de microinflamación crónica que hay en la uremia, se ha propuesto como uno de los mecanismos que producen disfunción endotelial, primer paso para el posterior desarrollo de aterosclerosis; aunque la forma en que se produce este daño no es del todo bien conocida.⁴⁸

Basándose en amplios datos clínicos y empíricos, se puede afirmar que la inflamación vascular y la acumulación de monocitos en la pared arterial inician y desempeñan un importante papel en la progresión de la aterosclerosis, lo cual produce la formación de placas y, en última instancia, la rotura de la placa y los subsiguientes trastornos cardiovasculares. La enfermedad cardiovascular

comienza y se perpetúa por la interacción de las células inmunitarias con las células de las paredes vasculares. Las interacciones de los leucocitos con el endotelio vascular durante la inflamación se producen a través de varias etapas que implican al rodamiento leucocitario mediado por selectinas, a la adhesión leve mediada por las moléculas de adhesión VCAM-1 (Molécula de adhesión de la célula vascular-1) e ICAM-1 (Molécula de adhesión intercelular-1) y la firme adhesión posterior mediada por las quimioquinas (en especial la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1)) y la IL 8.¹¹³ Cada vez hay más datos a partir de estudios experimentales y clínicos según los cuales estas etapas iniciales de la aterosclerosis son extremadamente importantes.¹¹⁴ En primer lugar, las moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) se expresan durante la aterogénesis,⁴⁷ observándose un aumento en las concentraciones de moléculas de adhesión en circulación en los paciente con IRC.¹⁹ Para acabar de subrayar el importante papel de las moléculas de adhesión en la patogénesis de la aterosclerosis, los ratones a los que les falta VCAM-1 muestran una disminución de ésta.⁴⁷ Además, los datos prospectivos sugieren con fuerza que la activación e inflamación endotelial se produce en un momento inicial dentro del proceso aterosclerótico y que los altos niveles plasmáticos de las moléculas de adhesión son predictores de futuros episodios cardiovasculares en la población general¹⁸⁸ y en la población con IRC.²¹⁶ También hay que destacar las fuertes asociaciones entre los marcadores secundarios de la inflamación y los niveles plasmáticos de las moléculas de adhesión.¹⁸⁸ Un estudio reciente de nuestro grupo¹³² pone de manifiesto como la administración de diferentes preparados de hierro intravenoso en pacientes en hemodiálisis, induce un aumento en el porcentaje de células mononucleares con un aumento en la producción de ROS, ICAM-1 y apoptosis. En segundo lugar, el papel central de las quimioquinas MCP-1 e IL 8 está muy bien descrito en el estudio de Gerszten y cols. ,⁶⁶ en el que ambas quimioquinas activan la firme adhesión de leucocitos al endotelio. Los ratones a los que les falta

los receptores para MCP-1²⁰ y la IL 8¹⁷ presentan una menor susceptibilidad a la aterosclerosis y tienen menos monocitos en las lesiones vasculares. Desde un punto de vista clínico, se observan altos niveles de MCP-1 en pacientes con infarto agudo de miocardio y angina inestable,⁸⁵ que se asocian a la inflamación, dislipemia y trastornos cardiovasculares en los pacientes en hemodiálisis.¹⁶⁵

Otro de los mecanismos que se han propuesto recientemente para explicar la relación entre microinflamación y aparición de daño endotelial, es la activación del sistema inmune en la IRC. Esta activación en sangre periférica se evidencia por un incremento de una subpoblación de monocitos activados en el suero de los pacientes urémicos, los monocitos CD14+CD16+.¹⁸²

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 un aumento de otros marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva o citoquinas proinflamatorias.¹⁸² Se ha descrito una relación directa entre la subpoblación de monocitos CD14++CD16+ y la aparición de eventos cardiovasculares.²²⁹ Los monocitos CD14+CD16+ son una subpoblación de este grupo celular, que muestran unas características fenotípicas especiales, con un telómero más corto que los monocitos no activados, los CD14++CD16-. Los monocitos CD14+CD16+ muestran un aumento de citoquinas proinflamatorias en su citoplasma, que son liberadas al torrente sanguíneo tras ser estimuladas por una agresión externa.^{10,182,229}

El papel que esta subpoblación de monocitos juegan en la producción de daño endotelial en los pacientes con IRC no está claro. En un trabajo previo de nuestro grupo se desarrolló un modelo experimental en el que se puso en cultivo monocitos con células endoteliales HUVEC (línea de células endoteliales desarrollada a partir de células de cordón umbilical humano). En este trabajo se determinó actividad ROS en tres cocultivos diferentes de HUVEC; con monocitos

totales (CD14⁺⁺CD16⁻ junto con CD14⁺CD16⁺), con monocitos no activados (CD14⁺⁺CD16⁻) y con monocitos activados (CD14⁺CD16⁺). Solo las células HUVEC cocultivadas con este último subgrupo de monocitos, mostró un aumento de actividad ROS. De igual modo se midió apoptosis, y solo se vió un aumento en este último cultivo de HUVEC con monocitos activados, lo que apoya 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 IRC.¹⁴¹ Este trabajo soporta la hipótesis de que, independientemente de la uremia, la microinflamación mediada por monocitos activados, CD14⁺CD16⁺, en los pacientes con IRC, 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 IRC.

En la línea de este mismo trabajo, se ha publicado otro en el que, junto con las células HUVEC y las diferentes subpoblaciones de monocitos, se realizaron cocultivos de ADN bacteriano, y de nuevo se comprueba que solamente en el cocultivo con monocitos activados (CD14⁺CD16⁺) de pacientes urémicos, y no en células mononucleares de sujetos sanos, hay un aumento de la apoptosis de las células endoteliales (HUVEC) y un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias. Además, este subtipo de monocitos presentan un aumento en los receptores de citoquinas así como una mayor expresión de moléculas de adhesión vascular lo que les confiere una mayor interacción con el endotelio vascular.¹⁴⁰ Estos datos apoyan la hipótesis de la aparición de disfunción endotelial en la uremia por aumento de la apoptosis de las células endoteliales, así como por la presencia de una subpoblación de monocitos activados.

Se ha publicado un trabajo en el que se avanza un paso más en el conocimiento de los mecanismos de daño endotelial en la uremia, en el que con proteómica se intenta dilucidar cuáles son las proteínas dañadas en las células endoteliales que

van a favorecer el posterior desarrollo de disfunción endotelial. En este trabajo se miden «in vitro» las proteínas de las células HUVEC, que se dañan cuando se les cultiva en un medio urémico; tomando como controles, la determinación de estas mismas proteínas medidas en células HUVEC tras realizar el mismo experimento en un medio sin uremia. Los resultados de este estudio ayudan a comprender aún mejor los mecanismos de daño endotelial en los pacientes urémicos, al determinar un aumento de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación,²⁹ mecanismos ambos implicados en la aparición de daño endotelial desde estadios iniciales de la IRC.

3.2. MARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL

Los marcadores de inflamación relacionados con el daño vascular más estudiados suelen ser proteínas no relacionadas directamente con la lesión inflamatoria vascular, como la PCR. De hecho, se producen en el hígado como respuesta a las citoquinas, específicamente a TNF- α y IL 1 β , y por ello constituyen una respuesta inespecífica, ya que cualquier proceso inflamatorio eleva estos marcadores.

Como ya se ha comentado anteriormente, la IRC se encuentra asociada a una elevada prevalencia de complicaciones cardiovasculares debidas a la presencia de un proceso inflamatorio crónico.²⁴ Además, en estos pacientes, las toxinas urémicas y la inflamación son factores que producen daño endotelial más potentes que los factores clásicos como la hipertensión y la obesidad.²³³ Existen marcadores de inflamación como la PCR y las citoquinas que predicen la mortalidad cardiovascular,^{98,255} pero no son suficientes para comprender lo que está sucediendo en el endotelio.

En los últimos años, el estudio de la biología del endotelio ha proporcionado nuevos marcadores de daño endotelial como las micropartículas endoteliales (EMPs) y las células progenitoras del endotelio (EPCs). El análisis de estos nuevos marcadores sanguíneos de daño endotelial permite aportar más

información sobre el estado del endotelio vascular.

3.2.1. MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES

La activación o lesión del endotelio vascular da lugar a una gran variedad de desordenes inflamatorios. En caso de lesión, las células endoteliales pueden responder emitiendo EMPs.¹⁸ Las EMPs se definen como vesículas de menos de 1 µm de diámetro, que las células endoteliales emiten en respuesta a una activación, lesión y/o apoptosis.⁸⁴ El mecanismo, in vivo, por el que las células endoteliales emiten las EMP no se conoce. Sin embargo, in vitro, una gran variedad de estímulos, como TNF α , producen vesiculación de estas células.⁴⁶ Estos estímulos no son sólo pro-apoptóticos, sino que pueden ser pro-inflamatorios, pro-trombóticos o pro-oxidantes.¹¹¹ Recientemente, se ha descubierto que la disociación de la NO-sintetasa puede participar, bajo ciertas condiciones, en la producción de EMPs,^{245,246} haciendo hincapié en la posible relación recíproca entre EMPs y disfunción endotelial dependiente de NO.

En condiciones normales, la activación endotelial es local y reversible. En consecuencia, el número de EMPs circulantes es muy bajo.^{12,110} Las EMPs están involucradas en una gran variedad de condiciones patológicas como en el proceso de aterogénesis^{111,234} y en la disfunción endotelial presente en patologías como el síndrome antifosfolípido,¹⁷⁸ preclampsia¹²¹ y síndrome agudo coronario.¹⁴ En pacientes con IRC se ha visto un número elevado de estas EMPs comparable al de las patologías citadas anteriormente, sugiriendo que la excesiva vesiculación de las células endoteliales puede actuar como un nuevo marcador de disfunción endotelial en la uremia.^{1,21}

Caracterización de las micropartículas endoteliales

La membrana de las EMPs expresan varios fosfolípidos, lípidos oxidados y diversas proteínas de endotelio como VE-cadherina (CD144) y la molécula de

adhesión celular endotelio-plaqueta (PECAM o CD31) entre otros. Su composición lipídica y proteica dependen de si son emitidas debido a una activación celular donde podrían expresar E-selectina (CD62E)⁹² o por un estímulo apoptótico donde expresarían mayoritariamente Anexina V.^{65,249}

Para caracterizar correctamente una EMPs por citometría de flujo se utilizan dos marcadores, uno para verificar que la micropartícula procede del endotelio y otro que nos indique el estado del mismo. Así una EMPs apoptótica sería positiva para CD31 y para Anexina V a la vez (CD31+Anexina V+).

3.2.2. CÉLULAS PROGENITORAS DE ENDOTELIO

La pared vascular y el endotelio se encuentran bajo un constante proceso de daño y reparación en respuesta a estímulos mecánicos y químicos. La regeneración del endotelio dañado se ha explicado por una migración y proliferación de células endoteliales vecinas.²⁰³ Sin embargo, estudios más recientes indican que existen otros mecanismos de reparación adicionales. En adultos sanos se ha identificado una pequeña población de células progenitoras del endotelio (EPCs) circulantes en sangre periférica.⁶ Las EPCs tienen un papel clave en el mantenimiento de la integridad vascular y actúan como células reparadoras en respuesta a un daño en el endotelio¹⁹⁹ por esto se pueden considerar como marcadores del daño endotelial.²⁵¹

Tanto la definición de EPCs, como los métodos para aislarlas son muy diferentes en los numerosos estudios que existen sobre estas células. Los datos sugieren que no se trata de una única población celular con un único origen.²³¹ El número de EPCs en pacientes con patología cardiovasculares es bajo,²⁰⁴ por lo que pueden ser utilizados como marcador pronóstico. Pero en los estudios realizados en pacientes con IRC existe una falta de consenso a la hora de definir y medir estas células. Hay trabajos donde se describe un aumento en el número de EPCs en pacientes en hemodiálisis⁷⁸ y otros donde el número de estas células está disminuido.⁴⁴ A pesar

de la contradicción que existe en cuanto al número y características de estas células en pacientes con IRC, parece claro que en estos pacientes existe una disfunción de las EPCs,¹⁰³ es decir disminuye su capacidad angiogénica y de reendotelización. Las causas que provocan este mal funcionamiento de las EPCs en la IRC son desconocidas, aunque en algunos trabajos se demuestra que la uremia tienen un efecto perjudicial sobre estas células.⁴⁹

Caracterización de las células progenitoras de endotelio

En la gran mayoría de los estudios realizados por citometría de flujo se definen dos tipos de EPCs,^{174,193} que según sus receptores de membrana se podrían clasificar como:

- EPCs I: CD34+/CD133+/VEGFR2+ (receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular).
- EPCs II: VEGFR2+/CD14+ (se puede añadir a esta definición otros marcadores de células endoteliales como CD31 o CD144).

El número de EPCs I que están presentes en la circulación es muy bajo y algunos trabajos las definen como los verdaderos progenitores del endotelio por su capacidad para reendotelizar.¹⁸⁰ Las EPCs II pueden ser obtenidas en sangre en una cantidad relativamente alta y son mayoritariamente células derivadas de monocitos.¹⁸⁷ Se ha demostrado que las EPC II son potentes secretoras de factores angiogénicos, por lo que se les atribuye un papel importante en la angiogénesis y la reparación endotelial vía estimulación paracrina de las células residentes en el endotelio.¹⁸⁷

3.2.3. FACTORES DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

Entre otras sustancias importantes que tienen relación con estos sucesos

biológicos se encuentra el TGF- β (factor transformante del crecimiento beta), con importantes aplicaciones en la génesis de la fibrosis que acompaña a la inflamación vascular y de los órganos diana del proceso patológico cardiovascular.¹⁸⁶ Pero hay que tener en cuenta otros factores de crecimiento secretados por células activadas, como el FGF (factor de crecimiento de los fibroblastos), el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), o el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).²⁴⁰ Existe otro factor de crecimiento que en los últimos años se ha estudiado por su relación con el proceso aterosclerótico y es el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular).

VEGF es una citoquina multifuncional que estimula la migración, diferenciación y regeneración de las células endoteliales.^{60,64} Es esencial para su actividad pro-angiogénica,^{64,191} por eso ha sido utilizado con fines terapéuticos para estimular la angiogénesis.⁸⁹ Estudios previos in vivo han sugerido que el VEGF no sólo aumenta la formación de vasos colaterales sino que también modifica sus respuestas vasomotoras.⁵ Las células endoteliales expresan dos receptores para este factor (VEGF-R1 Y VEGF-R2). Aunque el VEGF ha sido considerado por ser relativamente específico para célula endotelial,²⁰² también se ha demostrado que estos receptores se expresan en monocitos de médula ósea y de sangre periférica induciendo su activación y migración.^{7,45} Es a través de esta vía de activación, de los monocitos, por la que se postula que VEGF actúa como agente pro-aterogénico.^{35,36}

Algunos trabajos han establecido una asociación entre la concentración plasmática/sérica de VEGF y aterosclerosis en enfermedades como la diabetes y la hipertensión.^{87,115,117} Sin embargo, no hay establecida una relación entre VEGF y aterosclerosis en pacientes con IRC.

4. ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO EN LA ERC

A pesar de los avances tecnológicos en los últimos años, actualmente existe una débil esperanza en la mejora de esta situación de elevada morbimortalidad en los pacientes con ERC. Numerosos estudios controlados, prospectivos y randomizados con un elevado número de pacientes no muestran beneficios en cuanto a supervivencia al emplear nuevas estrategias de tratamiento, como son un incremento en la dosis de diálisis,^{55,163} una intensiva nutrición,²⁸ uso de terapia antiinflamatoria,⁹⁰ uso de eritropoyetina para normalizar los valores de hemoglobina^{54,205} descenso de lípidos con estatinas,²⁴⁷ y tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.²⁵³

A pesar de estos datos negativos, por todo lo ya expuesto, el manejo del estado inflamatorio de los pacientes con ERC en hemodiálisis debería centrarse en evitar y tratar precozmente las infecciones, en el uso de fármacos con potencial efecto beneficioso, en el uso de agua ultrapura y en el desarrollo de nuevas técnicas de diálisis.

4.1. RELACIONADAS CON LA TÉCNICA DE DIÁLISIS

Entre las diferentes estrategias relacionadas con la técnica de diálisis propiamente dicha, ensayadas para solventar este problema, se ha propuesto incrementar el tiempo y/o la frecuencia de diálisis. Estas medidas, potencialmente eficaces, generan problemas logísticos y aún no tienen buena aceptación entre los pacientes. Otras alternativas pueden ser incrementar la eficacia depuradora de toxinas urémicas, sin modificar el esquema convencional de diálisis, introduciendo nuevas modalidades terapéuticas en la práctica clínica, que se basan fundamentalmente en incrementar la permeabilidad del dializador y/o aumentar el transporte convectivo.^{118,223,224} Frente a la hemodiálisis de bajo flujo (baja

permeabilidad) se sitúan la hemodiálisis de alto flujo (alta permeabilidad) y las técnicas de hemodiafiltración.

4.1.1. HEMODIÁLISIS ALTO FLUJO (HD-HF)

Los dializadores de alta permeabilidad permiten un aclaramiento de toxinas urémicas de mayor tamaño que los dializadores de baja permeabilidad,¹²⁹ debido a que los primeros poseen un tamaño de poro mayor y se produce dentro de ellos un bajo grado de transporte convectivo debido a retrofiltración, que es inexistente en los dializadores de baja permeabilidad.^{16,109} A pesar de que esta propiedad de los dializadores de alta permeabilidad podría ser una de las piezas clave para una mejora de la morbimortalidad de los pacientes con IRC, existe gran controversia, sobre el potencial coste-beneficio de estos dializadores, con respecto a los de baja permeabilidad. Hay varios estudios controlados, que sugieren posibles ventajas clínicas de las membranas de alto-flujo.^{41,131,132} Se ha descrito un retraso en la aparición y en la severidad de la amiloidosis de la diálisis (probablemente por un mayor grado de eliminación de β_2m), mejor conservación de la función renal residual, un efecto beneficioso sobre la dislipemia, la polineuropatía y las infecciones, sin que existan resultados convincentes sobre anemia y calidad de vida.⁴¹ En lo referente a la mortalidad, hay múltiples estudios que sugieren una mayor tasa de supervivencia cuando se utilizan membranas de alta permeabilidad. Un estudio multicéntrico prospectivo observacional realizado en Francia,⁴⁰ incluyendo un alto número de pacientes y un estudio alemán basado sobre un análisis secundario de los pacientes del 4D,¹⁰² han observado una mayor supervivencia de los pacientes cuando se utilizaban membranas de alta permeabilidad. Un estudio controlado randomizado realizado en USA, el estudio HEMO, no observó ninguna superioridad del alto versus el bajo flujo.⁵⁵ Sin embargo, este trabajo ha sido muy criticado por haberse incluido pacientes prevalentes, previamente dializados en más de un 60% con alto flujo, por la

reutilización de los dializadores, limitación en la duración de la sesión de diálisis y por la potencial selección de los pacientes en lo que respecta a la edad y el índice de masa corporal. Además, en los análisis secundarios de este estudio, se ha objetivado un potencial beneficio del alto flujo, en relación con los eventos cardiovasculares y una mayor supervivencia para los pacientes que llevan más de 3.7 años en diálisis. Curiosamente, si hay datos más positivos derivados de los análisis secundario del estudio HEMO, de que los pacientes dializados con membranas de alto flujo, presentan una menor tasa de mortalidad cardiovascular, de desarrollo de accidentes cerebro-vasculares y de hospitalización.^{42,50}

Un estudio europeo, el MPOstudy (membrane permeability outcome study), realizado en pacientes incidentes, sin reutilización de los dializadores, con un amplio número de sujetos evaluados durante un largo período de tiempo, ha demostrado que el uso de membranas con alta permeabilidad puede reducir la mortalidad en los pacientes con una albúmina inferior a 4 g/dl y en los diabéticos independientemente de los niveles séricos de albúmina.¹¹⁹ Sin embargo, no se han observado efectos beneficiosos en los pacientes incidentes con una albúmina superior a 4 g/dl, lo que parece indicar que en una población de bajo riesgo el efecto aislado de la membrana de diálisis no parece muy relevante. Un meta-análisis que involucra a 33 ensayos controlados randomizados que incluyen 3820 pacientes con IRC, atribuye a las membranas de alto flujo sobre las de bajo flujo una reducción de la mortalidad cardiovascular, pero no en la mortalidad global ni en la mortalidad relacionada con infecciones. Las membranas de alto flujo redujeron los niveles prediálisis de β_2m .¹⁶²

4.1.2. HEMODIAFILTRACIÓN (HDF)

Diferentes avances en los últimos años, sobre todo los relacionados con la pureza del líquido de diálisis y la biocompatibilidad de las membranas, han permitido desarrollar técnicas de hemodiálisis de alta eficacia que aportan un alto transporte

convectivo, que se suma al transporte difusivo propio de las técnicas convencionales.^{59,118,130} Esta nueva modalidad terapéutica, basada en optimizar el proceso convectivo, permite eliminar toxinas urémicas de mayor peso molecular, por lo que pudieran resultar de gran utilidad, ya que su capacidad depuradora se asemeja más a la fisiología renal.^{59,130} El prototipo de este tipo de técnica es la hemodiafiltración en línea. Debido al mayor transporte convectivo de estas técnicas, se consigue un aclaramiento más eficaz de moléculas de mediano y alto peso molecular (ej. β_2m),⁴² que son reconocidos factores de riesgo de las diferentes complicaciones urémicas (inflamación, amiloidosis, hiperparatiroidismo secundario, arteriosclerosis acelerada, mortalidad) que afectan a los pacientes con insuficiencia renal crónica estadio 5 en hemodiálisis.^{30,31,145,183,185,236}

Lo que define a las técnicas de hemodiafiltración en línea, es la infusión dentro del circuito sanguíneo de altas cantidades de líquido de diálisis estéril (SAL \geq 6 (Nivel de garantía de esterilidad) y endotoxinas < 0.03 EU/ml) producido en línea por el monitor de hemodiálisis tras ultrafiltración a través de un filtro, de líquido de diálisis ultrapuro (Bacterias <0.1 CFU/ml y endotoxinas < 0.03 EU/ml).⁸⁸ La infusión de líquido de diálisis estéril se puede realizar previa al dializador (predilución), a su salida (postdilución), en sistemas mixtos (pre y postdilución) o dentro de un dializador especial (mid-dilution).

Las técnicas de hemodiafiltración en línea predilución tienen las ventajas de aportar altos flujos de ultrafiltración, un mayor transporte convectivo y por lo tanto un mayor aclaramiento de mediana molécula, con el inconveniente de que la gran dilución que sufre la sangre antes de entrar en el dializador podría afectar al aclaramiento de moléculas de pequeño peso molecular.^{59,118,130,223} Las técnicas de hemodiafiltración en línea postdilución son las más eficaces y las actualmente más recomendadas.^{130,137} El principal inconveniente de este tipo de técnicas es la hemoconcentración que sufre la sangre dentro del dializador y el aumento de la

presión transmembrana que limita el uso de esta técnica en sujetos con niveles elevados de hemoglobina. Se han desarrollado sistemas que combinan ambos tipos de hemodiafiltración en línea, predilución y postdilución,¹⁷³ en los que el control de la presión transmembrana del sistema a través de sensores, determina que cantidad de volumen de infusión se aplica en predilución o postdilución, con buenos resultados en el aclaramiento de toxinas urémicas cuando las comparamos con hemodiafiltración en línea postdilución (HDF-OL).

Publicaciones recientes han demostrado que las técnicas de hemodiafiltración en línea permiten un mejor control de la anemia incrementando los niveles de hemoglobina y reduciendo la dosis de eritropoyetina, alcanzan niveles de fósforo sérico más bajos disminuyendo los requerimientos de captadores del fósforo y mejoran la estabilidad hemodinámica durante la sesión de hemodiálisis.^{53,145,236} El hallazgo más relevante ha sido la publicación de un artículo (estudio DOPPS) describiendo un descenso en la mortalidad (del 35%) cuando se emplean técnicas de alta eficacia (trasporte convectivo >15 litros por sesión) en comparación con la hemodiálisis convencional.²⁷ Otro estudio observacional prospectivo italiano (RISCAVID),¹⁶⁴ con un total de 757 pacientes, atribuye a las técnicas de hemodiafiltración en línea, una mejora en la mortalidad global y cardiovascular independiente de la dosis de diálisis. Sin embargo, hay que ser cautos al interpretar estos datos, ya que la mayoría de los estudios (DOPPS, RISCAVID, EUCLID) son observacionales, incluyen un escaso número de pacientes o tienen un curso corto de seguimiento. Un meta-análisis de la Cochrane Library,¹⁸¹ de 20 estudios con pacientes en hemodiafiltración en línea, hemofiltración y hemodiálisis, no muestra diferencias en cuanto a mortalidad; pero concluye que para afirmar éste dato se necesitan estudios controlados prospectivos y randomizados.

En un estudio prospectivo randomizado, The Convective Transport Study (CONTRAST),⁷² 714 pacientes fueron asignados en HDF-OL (358 pacientes) o en

hemodiálisis de bajo flujo (356 pacientes). No se encontraron diferencias entre las técnicas en cuanto a mortalidad global y mortalidad cardiovascular. Un subgrupo de pacientes que reciben elevados volúmenes de hemodiafiltración (>21.95 litros) si obtuvieron beneficios en cuanto a mortalidad. Un subanálisis de este estudio,¹³⁴ no encuentra diferencias en cuanto a calidad de vida en los dos grupos de tratamiento. Otro estudio controlado, prospectivo y randomizado (TURKISH HDF STUDY),¹⁵⁹ enrola a 782 pacientes en HDF-OL (391 pacientes) y en HD-HF (391 pacientes). Sólo para volúmenes de sustitución superiores a 17.4 litros se encuentra un beneficio en cuanto a mortalidad de cualquier tipo y mortalidad cardiovascular. Un estudio español prospectivo, controlado y randomizado (ESHOL)¹²⁹ compara 456 pacientes en HDF-OL con 450 pacientes en HD-HF con un seguimiento de tres años, obteniendo para aquellos pacientes asignados a HDF-OL una reducción del riesgo del 30% en cuanto a mortalidad de cualquier tipo, una reducción del riesgo del 33% en cuanto a mortalidad cardiovascular, y una reducción del riesgo del 55% en cuanto a mortalidad de causa infecciosa. Los volúmenes de sustitución durante todos los periodos del estudio fueron superiores a 20 litros.

Parece por tanto que la clave para obtener una mejoría en cuanto a mortalidad con las técnicas de hemodiafiltración en línea puede estar en la aplicación de altos volúmenes de transporte convectivo (por encima de 17-20 litros por sesión) cuando hablamos de HDF-OL, que deberán ser más con hemodiafiltración en línea predilución.¹⁶ Este alto transporte convectivo, junto con el uso de membranas de alto flujo, un líquido de diálisis ultrapuro, el uso de filtros para conseguir líquido de diálisis estéril en línea, una apropiada máquina de diálisis, unos buenos flujos de acceso vascular (por encima al menos de 300 ml/min), un flujo de líquido de diálisis de al menos 500 ml/min y un estricto control microbiológico del líquido de diálisis así como unos planes estrictos en cuanto a

la desinfección de plantas de agua y máquinas de diálisis, se postulan como las condiciones óptimas para llevar a cabo esta técnica de la manera más eficaz.

5. HEMODIAFILTRACION EN LÍNEA POSTDILUCIÓN (HDF-OL), MID-DILUTION (MID), MICROINFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Se ha descrito que la arteriosclerosis y las enfermedades cardiovasculares, la principal causa de mortalidad y morbilidad de los pacientes en hemodiálisis, guardan una estrecha relación con el estado inflamatorio crónico y el daño endotelial que presentan este tipo de pacientes.^{31,192,255} Estudios previos, han puesto de manifiesto que las técnicas de HDF-OL con un alto transporte convectivo, disminuyen el estrés oxidativo,²⁶ tienen un mejor perfil antiinflamatorio que repercute positivamente sobre los niveles de PCR, IL 6 y TNF α ²³⁵ y además se ha demostrado que reducen el porcentaje de monocitos CD14+CD16+ derivados de células dendríticas (monocitos activados), disminuyen los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias, disminuyen la senescencia celular y mejoran los mecanismos de lesión/repación endotelial (micropartículas endoteliales y células progenitoras endoteliales), en comparación con la técnica más eficaz de hemodiálisis, la diálisis con membranas de alta permeabilidad y biocompatibilidad.^{30,99,183,185} Sin embargo, estos parámetros no alcanzaban los valores observados en una población de sujetos sanos de similares características demográficas utilizada como grupo control.

A lo largo del texto se han comentado las características principales del subtipo de monocitos CD14+CD16+. En resumen, este subtipo de monocitos activados está incrementado en sangre de pacientes con IRC en hemodiálisis (además de en otros procesos inflamatorios)¹⁵⁷ incluso en pacientes con marcadores clásicos de inflamación como la PCR en rango normal. Son células proinflamatorias que presentan acortamiento en su telómero, son células apoptóticas con una mayor producción y secreción de citoquinas inflamatorias y menor de antiinflamatorias, con una mayor expresión de receptores de citoquinas y una mayor expresión de

moléculas de adhesión vascular, lo que les confiere una mayor interacción con el endotelio vascular. Se han relacionado con la elevada tasa de eventos cardiovasculares en estos pacientes¹⁹⁸ y su porcentaje se reduce con el uso de membranas biocompatibles y con un alto transporte convectivo en HDF-OL. Un estudio relaciona la expresión de la enzima convertidora de angiotensina en la superficie de estas células con aterosclerosis y no con arteriosclerosis en pacientes en hemodiálisis.²³⁰ Recientemente¹³⁹ se ha descrito que el uso de losartán en pacientes en hemodiálisis reduce el porcentaje de este tipo de células.

Niveles elevados de este subtipo de monocitos en pacientes con IRC, se correlacionan con la elevación en los marcadores de daño y/o reparación endotelial,^{143,183} como son las células progenitoras de endotelio (EPCs) y las micropartículas endoteliales apoptóticas (EMPs). EMPs y EPCs constituyen los principales mecanismos celulares de reparación del endotelio vascular.²⁵⁰

Resumiendo un apartado ya comentado en el texto, cualquier circunstancia que incida sobre el endotelio vascular provocando un daño, hace que las células de éste emitan al torrente sanguíneo unas microvesículas, denominadas EMPs. Las EMPs actuarán como transductores de señal desde el endotelio vascular dañado a la médula ósea, con el fin de movilizar desde esta última a las EPCs. Las EMPs poseen en su superficie marcadores de célula endotelial y marcadores de un estado de activación y apoptosis.⁹¹ En la literatura se encuentra discordancia a la hora de determinar los marcadores de superficie de estas EMPs derivadas de células endoteliales, en la mayoría de los artículos la anexina V como marcador de apoptosis y el CD31 como marcador de célula endotelial las definen.²⁰⁶ Las EMPs se han asociado con disfunción endotelial en varias enfermedades como el síndrome antifosfolípido,¹⁷⁸ preeclampsia¹²¹ y en síndrome coronario agudo.¹⁴ En pacientes con IRC en estadio 5, también se han reportado niveles elevados de EMPs. Existe una asociación entre las EMPs, disfunción endotelial y disfunción arterial en pacientes con IRC.^{4,58} Parece clara la relación entre el estado

microinflamatorio y la disfunción endotelial en este tipo de pacientes, pero también la uremia por sí misma juega un importante papel. Faure y cols. ,⁵⁸ evaluaron el efecto in vitro de varias toxinas urémicas como el p-cresol o el indoxil sulfato sobre la producción de EMPs de células endoteliales en cultivo, estimulando esta exposición la formación de EMPs.

La movilización de EPCs desde la médula ósea es esencial para la preservación de la integridad del endotelio.¹³³ La reparación del endotelio requiere de la presencia de EPCs, que expresan CD34 (marcador de superficie de células madre hematopoyéticas y de células endoteliales maduras) y el receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR2 o receptor relacionado con el dominio de kinasa (KDR receptor)).⁸⁶ Diferentes estudios en la literatura han observado que en pacientes con IRC en estadio 4-5 los niveles de EPCs circulantes pueden estar descendidos,⁷⁸ en rango normal,⁴⁴ o elevados,³⁸ no habiendo unanimidad entre los diferentes estudios. Para pacientes sin IRC si está demostrado que el número de EPCs circulantes puede servir como un método no invasivo para evaluar la función endotelial, y modificaciones en su número se considera un factor de riesgo cardiovascular en individuos con y sin enfermedad cardiovascular.¹⁰⁷ Hill y cols. ,⁷⁹ encontraron una correlación negativa entre el número de EPCs y el score de Framingham. En pacientes con IRC, su supervivencia, que depende en gran medida de las complicaciones cardiovasculares que presenten, podría estar influenciada por una reparación vascular deficiente como resultado del descenso en número y/o función de EPCs.^{78,123}

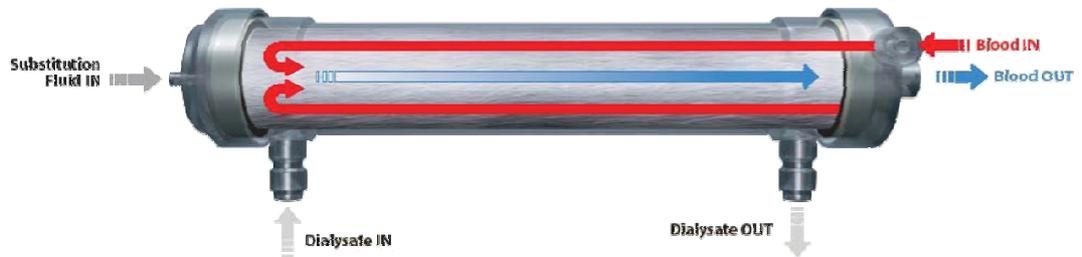
Recientemente, se ha diseñado un nuevo dializador, que teóricamente optimiza la eliminación de toxinas urémicas de un amplio espectro de tamaño molecular.^{105,106} Este nuevo dializador, integra una avanzada tecnología de hemodiafiltración en línea intermedia, dentro de un simple dializador capilar, con un asequible coste

económico. Cambios estructurales en las cabeceras del dializador, dividen a las fibras de este en dos anillos concéntricos, permitiendo la infusión de gran cantidad de líquido de reposición después de una primera fase de postdilución en que la sangre circula por las fibras del anillo periférico y antes de una segunda fase de predilución en que la sangre circula por las fibras del anillo central. A este nuevo concepto se le denomina Mid-dilution (MID) o hemodiafiltración intermedia. Un estudio preliminar ha demostrado, tanto in vitro como in vivo, que MID presentaba un mayor aclaramiento de sustancias de mediano y alto peso molecular (beta-2-microglobulina, Cistatina C, retinol unido a proteínas) manteniendo una eficacia similar en el aclaramiento de moléculas de pequeño peso molecular que la HDF-OL.^{105,106} Existía una limitación importante con esta técnica, que son las elevadas presiones (sobre todo presión transmembrana) que se producen en todos los puntos del dializador. Santoro y cols.,¹⁹⁶ con un cambio en los puertos de entrada y salida de sangre del dializador (primera fase de postdilución por el anillo central y segunda fase de predilución por el anillo periférico) consiguieron un similar aclaramiento de sustancias de mediano y alto peso molecular que con la técnica standard, con unas presiones transmembrana menores. A esta modificación se le denominó Mid-dilution reverse (Figura 2). El volumen de líquido de sustitución óptimo para esta técnica se sitúa entre 150 ml/min y 250 ml/min (el doble de la tasa que permite la técnica de HDF-OL).¹²⁸

Obviamente estos resultados son muy preliminares y necesitan ser confirmados con estudios prospectivos randomizados. Incluso existe un estudio,⁵⁶ que no corrobora los datos previos de eficacia depuradora al comparar MID con HDF-OL. Siempre hay que balancear el potencial efecto beneficioso (menor mortalidad, reducción de la tasa de hospitalización, menor uso de eritropoyetina y captos del fósforo, etc) derivado de estas técnicas con el mayor coste económico inicial. En cualquier caso, únicamente se han realizado estudios de eficacia depuradora, pero no hay hasta el momento presente ningún estudio que demuestre el potencial

efecto beneficioso de MID sobre la inflamación y lesión endotelial. El principal objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un alto transporte convectivo sobre estos parámetros.

- **MID DILUTION *standard***



- **MID DILUTION *reverse***

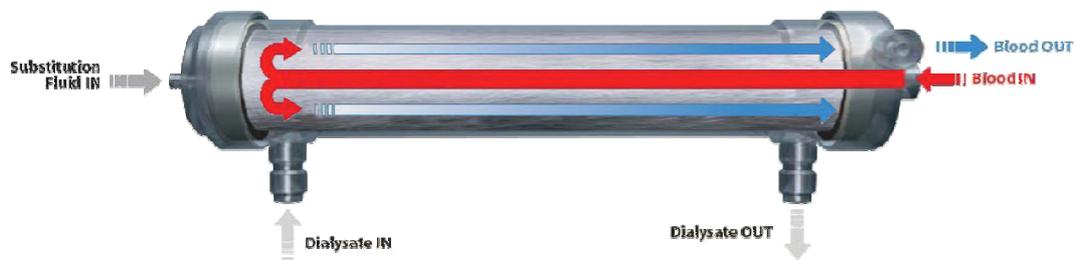
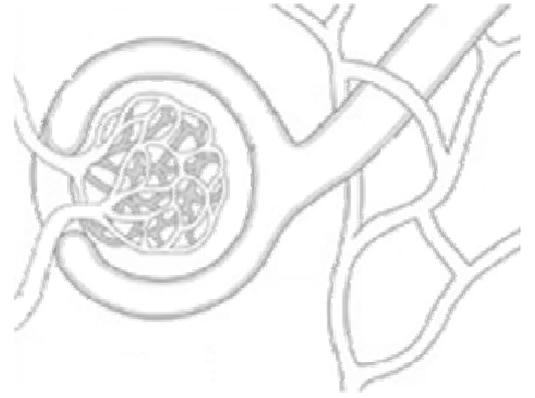


Figura 2. Diseño del dializador para Mid-dilution. (Modalidad standard y modalidad reverse).



METODOLOGÍA

1. PACIENTES

En función de las variables a considerar en el estudio, de un total de 79 pacientes de la unidad de hemodiálisis periférica del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España), se seleccionaron 16 pacientes que cumplieran los siguientes criterios de inclusión y de exclusión.

Los criterios de inclusión fueron: pacientes prevalentes en hemodiálisis desde hacía al menos 6 meses, con una edad comprendida entre los 18 y los 75 años, que recibían una adecuada dosis de diálisis ($eKt/V > 1.3$). Todos se dializaban con una membrana de alta permeabilidad previamente, dializados con agua ultrapura (Bacterias < 0.1 CFU/ml y endotoxinas < 0.03 EU/ml) y a través de una fístula arteriovenosa que permitiera flujos sanguíneos por encima de los 350 ml/min. Debían estar tratados con agentes estimulantes de la eritropoyesis manteniendo unos niveles de hemoglobina estables entre 11.5 y 12.5 g/dl.

Los criterios de exclusión fueron: pacientes con neoplasia, diabetes mellitus, hiperparatiroidismo severo ($PTH > 400$ pg/ml), marcadores virales positivos (HBsAg, anti-VHC y anti-VIH), enfermedades inflamatorias, infecciones activas, enfermedades autoinmunes, niveles de albúmina menores de 3.8 g/dl, niveles de PCR por encima de rango (por encima de 5 mg/l), función renal residual mayor de 200 ml/24h, en tratamiento con inmunosupresores, estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y/o antagonistas del receptor de la angiotensina II.

Todos los pacientes recibieron tres sesiones de diálisis a la semana. Las características de las sesiones de hemodiálisis de cada paciente no se modificaron a lo largo del estudio. Se firmó consentimiento informado de entrada en el estudio.

2. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio se diseñó como un estudio prospectivo y cruzado, tal y como se muestra en la Figura 3.



Figura 3. Diseño del estudio. Un total de 16 pacientes fueron divididos en dos grupos de 8 pacientes cada uno. Se dializaron en periodos consecutivos de 8 semanas cada uno alternando diferentes técnicas de hemodiálisis de la siguiente manera: Grupo 1: basalmente (HD-HF), periodo convectivo 1 (MID), periodo convectivo 2 (HDF-OL), periodo convectivo 3 (MID), periodo convectivo 4 (HDF-OL) y finalmente (HD-HF). Grupo 2: basalmente (HD-HF), periodo convectivo 1 (HDF-OL), periodo convectivo 2 (MID), periodo convectivo 3 (HDF-OL), periodo convectivo 4 (MID) y finalmente (HD-HF).

Los 16 pacientes fueron asignados en dos grupos de 8 pacientes cada uno. Los pacientes fueron numerados según el orden de entrada en el estudio, y alternativamente se iban asignando al grupo 1 o al grupo 2. Todos los periodos del estudio tuvieron una duración de 8 semanas cada uno, para cada paciente. Basalmente, todos los pacientes de ambos grupos recibieron diálisis (HD-HF) con el mismo dializador de alta permeabilidad (Phylther HF22SD (Bellco, Sorin

Group, Mirandola, Italy)), membrana de polyphenilene de 2.2 m² de superficie, con un flujo de líquido de diálisis de 800ml/min.

Cuatro pacientes se perdieron durante el seguimiento. En el grupo 1, un paciente se trasplantó cuando llevaba cuatro periodos completados del estudio y otro falleció cuando llevaba completado un periodo. En el grupo 2, un paciente se trasplantó y otro falleció, llevando respectivamente dos y dos periodos completados del estudio. Ambos exitus no se relacionaron con la técnica de diálisis. Al final del estudio permanecieron 12 pacientes, 6 en cada uno de los grupos.

Seguidamente, se inició otro periodo de 8 semanas en el cual, los pacientes del grupo 1 se dializaron en mid-dilution (MID) usando el dializador Olpur md 220 (Nephros Inc., NY, USA)) con el mismo tipo de membrana ya citada, y con una superficie de 2.2 m², flujo de líquido de diálisis de 800 ml/min y flujo de líquido de infusión de 12 litros a la hora (200 ml/min). Los pacientes del grupo 2 se dializaron en hemodiafiltración en línea postdilución (HDF-OL) usando el mismo dializador de alta permeabilidad (Phylther HF22SD), flujo de líquido de diálisis de 800 ml/min y flujo de líquido de infusión de 6 litros a la hora (100 ml/min). La media del volumen de infusión para los periodos de MID fue de 48.08 litros y para los periodos de HDF-OL fue de 23.7 litros.

En el siguiente periodo de 8 semanas los pacientes previamente asignados a HDF-OL cambiaron a MID y viceversa. Tras este periodo hubo otros dos periodos de 8 semanas cada uno, en los que se fue alternando la técnica convectiva en cada grupo. En total en ambos grupos, 4 periodos de terapia convectiva de 8 semanas cada uno (32 semanas en total).

Finalmente, durante las últimas 8 semanas, los pacientes de ambos grupos se dializaron en HD-HF, de la misma forma que lo hicieron basalmente.

Los pacientes fueron su propio control y siempre recibieron diálisis en la misma unidad.

Se obtuvieron muestras de sangre prediálisis, en la sesión de mitad de semana (miércoles o jueves), para cada paciente al finalizar cada periodo de 8 semanas.

Diez voluntarios sanos, similares en edad (64.1 ± 7.8 años) y género (6 mujeres y 4 hombres) a los pacientes del estudio, se usaron como controles (HS).

3. PARÁMETROS ANALIZADOS

Para analizar el estado microinflamatorio de los pacientes se midieron niveles de citoquinas en plasma (IL 6 y TNF α) y niveles de monocitos proinflamatorios CD14+CD16+ en sangre periférica. Para analizar el daño reparación endotelial se midieron niveles de micropartículas endoteliales en plasma (EMPs) y niveles de células progenitoras endoteliales (EPCs) en sangre periférica.

3.1. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS PLASMÁTICAS

Las concentraciones plasmáticas de IL 6 y TNF α fueron analizadas a través de una técnica específica de ELISA tipo sándwich (R&D system, Minneapolis, MN, USA).

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tenga actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de espectrofotómetro.

Estos ensayos emplean anticuerpos específicos humanos adheridos en una placa de 96 pocillos. La placa fue medida a 450 nm utilizando un lector de microplacas Power Wave XS (Biotek, VT, USA). La sensibilidad del ensayo es menor de 2 pg/ml, con una reproducibilidad intraensayo e interensayo menor del 10% y 12% respectivamente.

3.2. DETERMINACIÓN DE MONOCITOS CD14+CD16+ EN SANGRE PERIFÉRICA

Una muestra de 10 ml de sangre venosa periférica se obtuvo tanto de pacientes como de controles sanos, en tubos con heparina lito. Para identificar monocitos CD14+CD16+, la sangre fue incubada con un anticuerpo monoclonal M5E2 contra la molécula CD14 conjugada con la proteína peridina-clorofila (PerCP), y 3G8 contra la molécula CD16 conjugada con fluoresceína isotiocianato (FITC). Ambos anticuerpos y sus correspondientes isotipos fueron adquiridos de Becton Dickinson (San José, CA, USA). El análisis por citometría de flujo fue realizado usando un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). Los monocitos fueron aislados según su tamaño-complejidad y posteriormente se midieron los canales de fluorescencia (PerCP y FITC).

El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Se utilizan 2 tubos de citometría por muestra (tubos Facs de BD Falcon N°Cat. 352052). Uno para el control isotópico y otro para el marcaje de la muestra con los anticuerpos monoclonales.
2. Se añade 100 µl de sangre total a cada tubo. La sangre debe ser recogida en tubos con anticoagulante.
3. Marcaje:
 - a) Tubo para el control isotipo:
 - 5 µl de IgG2a/ratón en TC (Caltag N°Cat: MG2a06)
 - 5 µl de IgG1/ratón en FITC (Caltag N°Cat: GM4992)
 - b) Tubo para los anticuerpos:
 - 5 µl de anti-CD14 conjugado en TRI-COLOR (Caltag Laboratorios N° Cat. MHCD1406)
 - 5 µl anti-CD16 conjugado en FITC (Caltag Laboratorios N° Cat. MHCD1601)

4. Se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos.
5. Se lisan los eritrocitos utilizando 2 ml de Facs Lising (BD Biosciences N°Cat. 349202) preparado a (1:10) con agua desionizada.
6. Se incuba 10 minutos la solución lisante en oscuridad.
7. Se centrifugan los tubos a 1500 R.P.M. durante 5 minutos y se decantan las muestras.
8. Se añade 2 ml de PBS (Gibco N° Cat 18912-014). Para preparar el PBS se diluye una de las pastillas en 500 ml de agua desionizada.
9. Se repite el paso 7.
10. Se añade 500 µl de Cell-Fix (BD Biosciences N°Cat. 340181) preparado a (1:10) con agua desionizada.

3.3. DETERMINACIÓN DE MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES (CD31+ / ANEXINA V+) EN PLASMA

Cada muestra de sangre obtenida se centrifugó a 3500 R.P.M. durante 20 minutos para obtener plasma pobre en plaquetas. 100 µl de este plasma fueron incubados con 5 µl de anticuerpo monoclonal anti-CD31 conjugado con ficoeritrina (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA). Seguidamente se incubó con Anexina V conjugada con FITC (Bender MedSystem, Vienna, Austria). El control negativo fue obtenido usando el isotipo correspondiente. Un volumen igual de Flow Count Calibrator beads (Beckman Coulter, Marseille, France) fue añadido. El análisis fue realizado en un citómetro de flujo Coulter Cytomic FC 500 (Beckman Coulter) con un software CXP (Beckman Coulter). Cada resultado fue la media de tres determinaciones independientes de la misma muestra.

El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Se utilizan 100 µl de plasma para el control negativo de la técnica y otros 100 µl para el marcaje de las EMPs.
2. Se añade al tubo positivo el anticuerpo CD31 en FITC para marcar las EMP endoteliales y su control isotipo al tubo negativo.
3. Se incuba 20 minutos en oscuridad.
4. Se añade 2 ml de PBS, se centrifuga a 1500 R.P.M. 5 minutos y se decantan los tubos.
5. Se añade 195 µl de buffer Anexina V a los dos tubos y 5 µl de Anexina V al tubo positivo.
6. Se incuba 15 minutos en oscuridad.
7. Se añade 2 ml de PBS, se centrifuga a 1500 R.P.M. 5 minutos y se decantan los tubos.
8. Se añade 500 µl de cell-fix y 100 µl de Flow-Count a los dos tubos.
9. Se adquieren las muestras en el citómetro FC-500 de Beckman Coulter.

3.4. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS DE ENDOTELIO (CD34+ / CD133+ / VEGFR2+) EN SANGRE PERIFÉRICA

Una muestra de 10 ml de sangre venosa periférica se obtuvo tanto de pacientes como de controles sanos, en tubos con heparina lito. Para identificar las EPCs, la sangre fue incubada con un anticuerpo anti-CD133 conjugado con ficoeritrina, anti-CD34 conjugado con PerCP y anti VEGFR2 conjugado con FITC. Todos los anticuerpos y sus respectivos isotipos fueron adquiridos de Becton Dickinson (San José, CA, USA). El análisis de citometría de flujo fue realizado utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson).

El protocolo de determinación de este parámetro fue:

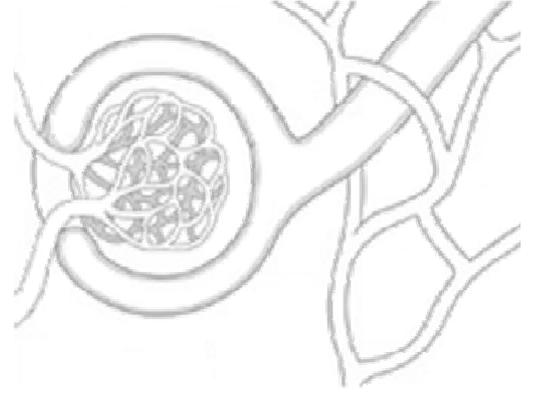
1. Extraer la sangre en tubos de heparina litio.
2. Se utilizan dos tubos de citometría por muestra, uno para el control isotipo y otro para la muestra.
3. Se añade 100 μ l de sangre por tubo.
4. Se añade los anticuerpos (CD34, CD133, VEGFR2) o los isotipos. Según la casa comercial la cantidad de anticuerpo oscila entre 10-20 μ l. Se incuba 20 minutos en oscuridad.
5. Se lisan los eritrocitos utilizando 2 ml de Facs Lising (BD Biosciences N°Cat. 349202) preparado a (1:10) con agua desionizada.
6. Se incuba 10 minutos la solución lisante (en oscuridad) y se centrifugan los tubos a 1500 R.P.M. durante 5 minutos.
7. Se decantan las muestras y se le añade 2 ml de PBS, se centrifugan a 1500 R.P.M durante 5 minutos.
8. Se decantan y se añade 500 μ l de una solución fijadora o si lo vas a adquirir inmediatamente 500 μ l de PBS.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico de los datos obtenidos en este trabajo se realizó con el programa informático SPSS versión 15.0 (Microsoft Corporation, EE. UU.).

Para la comparación de medias se utilizó el test de Kruskal Wallis para datos no paramétricos. El test de Mann-Whitney fue utilizado para datos independientes y el test de Wilcoxon para datos pareados. Para comparar los diferentes periodos se usó el análisis de varianza ANOVA seguido por la corrección de Bonferroni. El coeficiente de correlación de Spearman se empleó para analizar correlación lineal. Se consideraron significativos aquellos valores de $p < 0.05$.

Todos los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.



RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y PARÁMETROS DE LABORATORIO

El diseño del estudio se realizó de acuerdo al esquema representado en la Figura 3, que ya ha sido expuesto en el apartado de material y métodos.

Las características y parámetros de laboratorio basales (HD-HF) de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 4. No se observan diferencias significativas entre los dos grupos. Estos parámetros permanecieron sin cambios significativos a lo largo de los diferentes periodos del estudio (Tablas 5 y 6).

En cuanto a la estabilidad hemodinámica, los valores medios de tensión arterial sistólica y diastólica fueron inferiores a 140 mm/Hg y 90 mm/Hg respectivamente, permaneciendo estables y sin modificación significativa con las diferentes técnicas. Tampoco existieron diferencias significativas en el número de episodios de hipotensión intradiálisis.

El valor del Kt/Ve fue superior a 1.4 a lo largo de todo el estudio.

Se mantuvieron estables y sin diferencias significativas las cifras de hemoglobina, ferritina, IST, dosis de darbepoetina e hierro intravenoso.

Las cifras de PTH no mostraron diferencias y se mantuvieron en valores entre los 150 y 400 pg/ml.

Las cifras de beta 2 microglobulina prediálisis no sufrieron modificación significativa con las diferentes técnicas.

Parámetros de inflamación como leucocitos, albúmina y PCR no se modificaron, manteniéndose en todo momento en rango normal (albúmina \geq 3.8 g/dl, PCR entre 1 y 5 mg/l).

Los niveles de IL 6 y TNF α en sangre periférica tampoco se modificaron en los diferentes periodos.

	GRUPO 1	GRUPO 2	p
Edad (años)	70.3 ± 7.2	63.6 ± 15.2	0.75
Sexo (M/F)	50% / 50%	66.7% / 33.3%	0.35
Tiempo en hemodiálisis (meses)	60.3 ± 8.9	64.6 ± 59.1	0.09
Kt/Ve	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.1	0.48
Leucocitos (células/mm³)	7620 ± 2380	7514 ± 1969	0.45
Hemoglobina (g/dl)	12.5 ± 0.3	11.9 ± 0.5	0.39
Dosis darbepoetina (µg/semana)	23.3 ± 19.1	29.8 ± 17.7	0.77
Ferritina (µg/l)	560 ± 365	646 ± 330	0.78
IST (%)	29.1 ± 10.2	29.2 ± 11.2	0.74
Dosis hierro (mg/semana)	58.2 ± 46.8	44.2 ± 40.5	0.50
Beta 2 microglobulina (mg/l)	26.3 ± 7	31.1 ± 2.2	0.13
Albumina (g/dl)	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	0.96
Proteína C reactiva (mg/l)	2.71 ± 1.33	3.24 ± 1.67	0.23
IL 6 (pg/ml)	23.0 ± 6.6	18.1 ± 8.2	0.17
TNFα (pg/ml)	53.9 ± 13.1	59.4 ± 13.1	0.63

Tabla 4. Características y parámetros de laboratorio basales de los pacientes incluidos en el estudio (media ± desviación estándar).

Tabla 5. Características y parámetros de laboratorio de los pacientes del Grupo 1 a lo largo del estudio (media \pm desviación estándar).

	HD-HF	MID	HDF-OL	MID	HDF-OL	HD-HF
Kt/Ve	1.7 \pm 0.2	1.8 \pm 0.3	1.9 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2	1.9 \pm 0.3	1.8 \pm 0.2
Leucocitos (células/mm³)	7620 \pm 2380	7650 \pm 1708	7935 \pm 1363	7557 \pm 2260	8075 \pm 1633	7833 \pm 2540
Hemoglobina (g/dl)	12.5 \pm 0.3	11.9 \pm 0.4	11.8 \pm 0.5	12.2 \pm 0.4	12.4 \pm 0.3	12.5 \pm 0.3
Darbepoetina (μg/semana)	23.3 \pm 19.1	27.1 \pm 18.3	26.5 \pm 17.1	29.4 \pm 14.3	28.5 \pm 16.3	27.3 \pm 15.9
Ferritina (μg/l)	560 \pm 365	661 \pm 330	654 \pm 284	656 \pm 309	640 \pm 255	569 \pm 399
IST (%)	29.1 \pm 10.2	32.1 \pm 14	21.5 \pm 10.5	22.6 \pm 14.6	27.3 \pm 16.1	30.1 \pm 16.5
Dosis hierro (mg/semana)	58.2 \pm 46.8	50.3 \pm 40.5	55.4 \pm 43.3	63.3 \pm 39.9	57.3 \pm 42.2	59.1 \pm 45
Beta 2 microglobulina (mg/l)	26.3 \pm 7	24.2 \pm 6.3	24.8 \pm 4.3	26.1 \pm 3.4	26.0 \pm 5.7	26.7 \pm 2
Albumina (g/dl)	4.2 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2	4.3 \pm 0.1	4.3 \pm 0.2	4.1 \pm 0.1	4.2 \pm 0.2
Proteína C reactiva (mg/l)	2.71 \pm 1.33	1.91 \pm 0.53	1.93 \pm 0.78	1.95 \pm 0.33	2.25 \pm 1.15	2.10 \pm 0.63
IL 6 (pg/ml)	23.0 \pm 6.6	15.3 \pm 5.7	15.0 \pm 5.1	16.9 \pm 5.7	15.7 \pm 5	17.2 \pm 5.3
TNFα (pg/ml)	53.9 \pm 13.1	47.3 \pm 12.9	45.2 \pm 6.6	52.9 \pm 9.3	43.1 \pm 8.6	46.3 \pm 9.2

Tabla 6. Características y parámetros de laboratorio de los pacientes del Grupo 2 a lo largo del estudio (media \pm desviación estándar)

	HD-HF	HDF-OL	MID	HDF-OL	MID	HD-HF
Kt/Ve	1.6 \pm 0.1	1.8 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
Leucocitos (células/mm³)	7514 \pm 1969	7620 \pm 2380	7070 \pm 2292	7137 \pm 2427	8011 \pm 1697	7950 \pm 1740
Hemoglobina (g/dl)	11.9 \pm 0.5	12.2 \pm 0.5	12.3 \pm 0.4	12.1 \pm 0.3	11.9 \pm 0.4	12.4 \pm 0.2
Darbepoetina (μg/semana)	29.8 \pm 17.7	33.0 \pm 15.3	31.1 \pm 16.2	29.5 \pm 20.1	32.3 \pm 18.5	30.7 \pm 16.7
Ferritina (μg/l)	646 \pm 330	659 \pm 300	560 \pm 360	593 \pm 317	569 \pm 340	558 \pm 355
IST (%)	29.2 \pm 11.2	24.8 \pm 11.3	30.2 \pm 9.5	24.0 \pm 13.3	24.0 \pm 11.2	24.2 \pm 10.5
Dosis hierro (mg/semana)	44.2 \pm 40.5	50.1 \pm 43.3	51.5 \pm 39.9	55.3 \pm 40	57.4 \pm 41.1	50.3 \pm 38.8
Beta 2 microglobulina (mg/l)	31.1 \pm 2.2	31.9 \pm 4.1	29.3 \pm 2	29.3 \pm 2	29.8 \pm 3.2	30.8 \pm 2.3
Albumina (g/dl)	4.2 \pm 0.2	4.3 \pm 0.1	4.3 \pm 0.2	4.2 \pm 0.1	4.4 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2
Proteína C reactiva (mg/l)	3.24 \pm 1.67	3.03 \pm 1.25	2.91 \pm 1.35	2.83 \pm 0.81	2.99 \pm 1.15	2.85 \pm 0.72
IL 6 (pg/ml)	18.1 \pm 8.2	15.1 \pm 8.7	11.8 \pm 3	11.4 \pm 4.4	12.9 \pm 4.7	16 \pm 6.5
TNFα (pg/ml)	59.4 \pm 13.1	60.2 \pm 19.5	49.6 \pm 12.8	43.3 \pm 19	51.7 \pm 11.7	63.0 \pm 17

2. DETERMINACIÓN DE MONOCITOS CD14+CD16+

El porcentaje de monocitos CD14+CD16+ en ambos grupos durante los diferentes periodos del estudio se muestra en la Figura 4. Basalmente, los pacientes de ambos grupos dializados con membrana de alta permeabilidad presentaron un porcentaje de monocitos CD14+CD16+ que fue de 11 ± 2 para el grupo 1 y de 11.9 ± 2.3 para el grupo 2, valores significativamente superiores a los que presentan sujetos controles sanos (HS) (3.9 ± 2.3 ; $p < 0.05$). Cuando a esta misma membrana de alta permeabilidad le añadimos un alto transporte convectivo, observamos para ambos grupos un descenso no significativo en el porcentaje de monocitos CD14+CD16+ en las primeras 8 semanas de terapia convectiva (grupo 1. MID: 6.5 ± 3.4 ; grupo 2. HDF-OL: 7.3 ± 2.1), sin influir que cada uno de ellos (grupo 1 y grupo 2), comienza y alterna los periodos de terapia convectiva con técnicas diferentes en cada momento (Figura 3). Este descenso continúa y se hace significativo a las 16 semanas de terapia y a partir de aquí el descenso se mantiene estable todo el tiempo en que los pacientes se dializan con terapia convectiva (32 semanas) (grupo 1. HDF-OL: 4.2 ± 2.2 , MID: 4.8 ± 2.2 , HDF-OL: 4.6 ± 4.5) (grupo 2. MID: 5.6 ± 2.1 , HDF-OL: 4.1 ± 2.5 , MID: 4.8 ± 4.1) ($p < 0.05$ versus HD-HF). El descenso obtenido con este tipo de terapia se acerca a los valores de monocitos CD14+CD16+ de HS pero sin llegar a normalizarse ($p < 0.05$). Al comparar los periodos de terapia convectiva entre sí para ambos grupos, no se encontraron diferencias significativas. Finalmente, cuando los pacientes cambian a hemodiálisis de alto flujo (HD-HF), los valores de CD14+CD16+ ascienden y a las 8 semanas estos valores son similares a los que se obtuvieron basalmente (Grupo 1: 12.1 ± 3.4 ; Grupo 2: 12.9 ± 4.6).

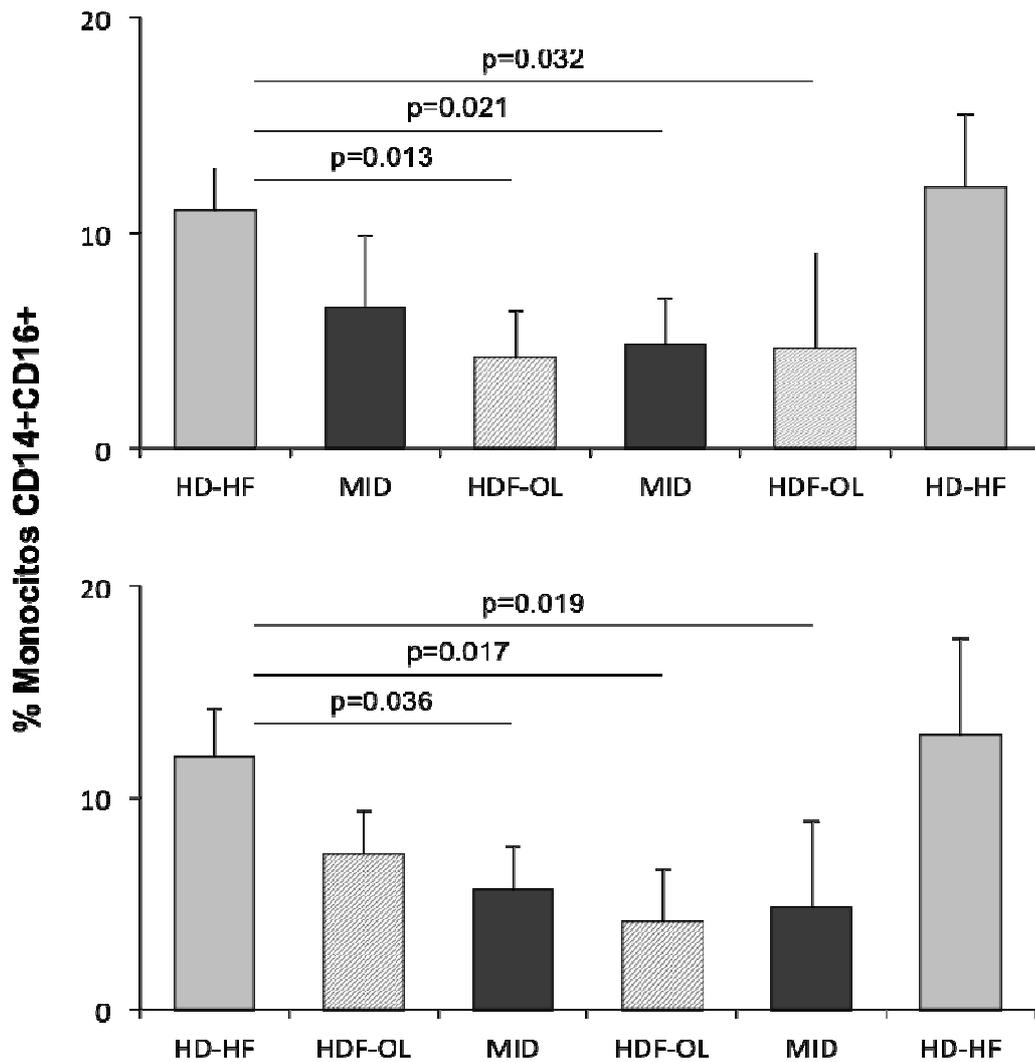


Figura 4. Porcentaje de monocitos CD14+CD16+ en ambos grupos durante los diferentes periodos del estudio. Basalmente (HD-HF) los pacientes de ambos grupos presentan altos niveles de monocitos CD14+CD16+. El uso de terapia convectiva produce un descenso significativo en estos niveles a las 16 semanas, descenso que se mantiene mientras permanece la terapia convectiva (32 semanas). Finalmente cuando los pacientes cambian a HD-HF los niveles de CD14+CD16+ ascienden a los niveles obtenidos basalmente. No hubo diferencias significativas entre los diferentes periodos de terapia convectiva.

3. DETERMINACION DE EPCs (CD34+/CD133+/VEGFR2+)

Los resultados obtenidos para este marcador de reparación endotelial en ambos grupos durante los diferentes periodos del estudio se muestra en la Figura 5. Al inicio, los pacientes de ambos grupos dializados con membrana de alta permeabilidad presentaron unos niveles de EPCs que fue de 0.3 ± 0.2 para el grupo 1 y de 0.4 ± 0.1 para el grupo 2, valores significativamente inferiores a los que presentan HS (1.6 ± 0.4 ; $p < 0.05$). Al ser tratados con un alto transporte convectivo, observamos para ambos grupos un aumento significativo en los niveles de EPCs ya desde las primeras 8 semanas de terapia convectiva, aumento que se mantiene durante las 32 semanas de terapia convectiva (grupo 1. MID: 0.6 ± 0.2 , HDF-OL: 0.6 ± 0.1 , MID: 0.7 ± 0.1 , HDF-OL: 0.6 ± 0.1) (grupo 2. HDF-OL: 0.7 ± 0.2 , MID: 0.7 ± 0.2 , HDF-OL: 0.7 ± 0.1 , MID: 0.7 ± 0.1) ($p < 0.05$ versus HD-HF). El aumento obtenido con este tipo de terapia se acerca a los valores de EPCs de HS pero sin llegar a normalizarse ($p < 0.05$). Al comparar los periodos de terapia convectiva entre sí, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Cuando los pacientes cambian a hemodiálisis de alto flujo (HD-HF), los valores de EPCs descienden y a las 8 semanas estos valores son similares a los que se obtuvieron al inicio del estudio (Grupo 1: 0.4 ± 0.1 ; Grupo 2: 0.4 ± 0.2).

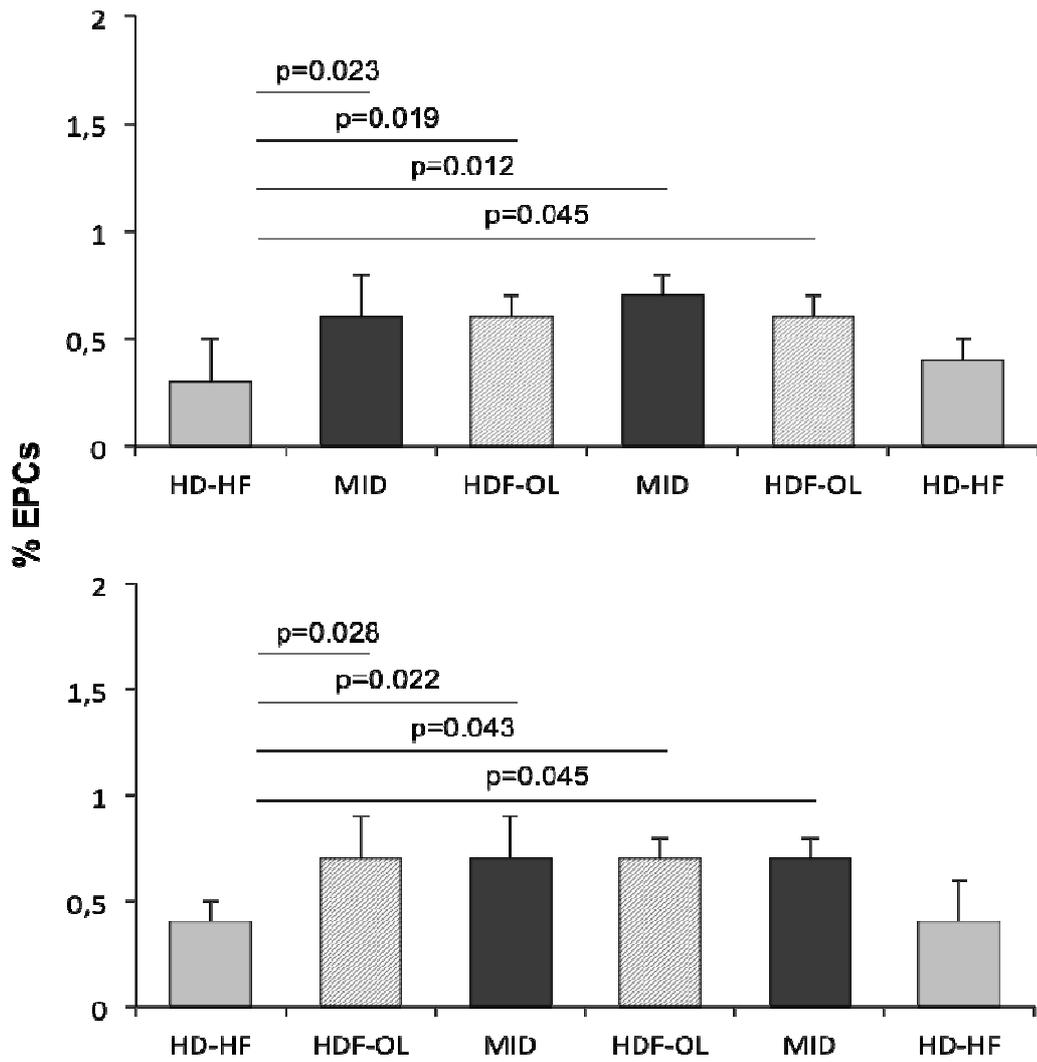


Figura 5. Porcentaje de EPCs en ambos grupos durante los diferentes periodos del estudio. Basalmente ambos grupos mostraron un porcentaje similar de EPCs. Los valores obtenidos durante los diferentes periodos de terapia convectiva fueron significativamente mayores comparados con los basales para todos los periodos. No hubo diferencias significativas entre los diferentes periodos de terapia convectiva. El ascenso obtenido no alcanzó los valores de EPCs presentes en sujetos sanos.

4. DETERMINACIÓN DE EMPs (CD31+/ANEXINA V+)

Los pacientes de ambos grupos dializados con membrana de alta permeabilidad presentaron unos niveles de EMPs de 293.5 ± 19.1 para el grupo 1 y de 275 ± 27.1 para el grupo 2. Los valores que presentan HS (49.1 ± 25 ; $p < 0.05$) son significativamente inferiores. El alto transporte convectivo induce un descenso significativo en los niveles de EMPs ya desde las primeras 8 semanas de terapia, descenso que se mantiene durante las 32 semanas en las que los pacientes se dializan con las técnicas de hemodiafiltración en línea (grupo 1. MID: 195 ± 14.3 , HDF-OL: 186.5 ± 24.2 , MID: 181.8 ± 32 , HDF-OL: 168.6 ± 25.8) (grupo 2. HDF-OL: 194.3 ± 15.6 , MID: 184.6 ± 16.8 , HDF-OL: 188.2 ± 11.5 , MID: 178.6 ± 8.4) ($p < 0.05$ versus HD-HF). El descenso obtenido con esta terapia convectiva no normaliza estos valores ($p < 0.05$ vs HS). Al comparar los periodos de terapia convectiva entre sí para ambos grupos, no se encontraron diferencias significativas. Cuando los pacientes en el periodo final, cambian a hemodiálisis de alto flujo (HD-HF), los valores de EMPs ascienden y a las 8 semanas estos valores son similares a los que se obtuvieron en el primer periodo de HD-HF (Grupo 1: 294.3 ± 45.4 ; Grupo 2: 269.4 ± 19.9). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.

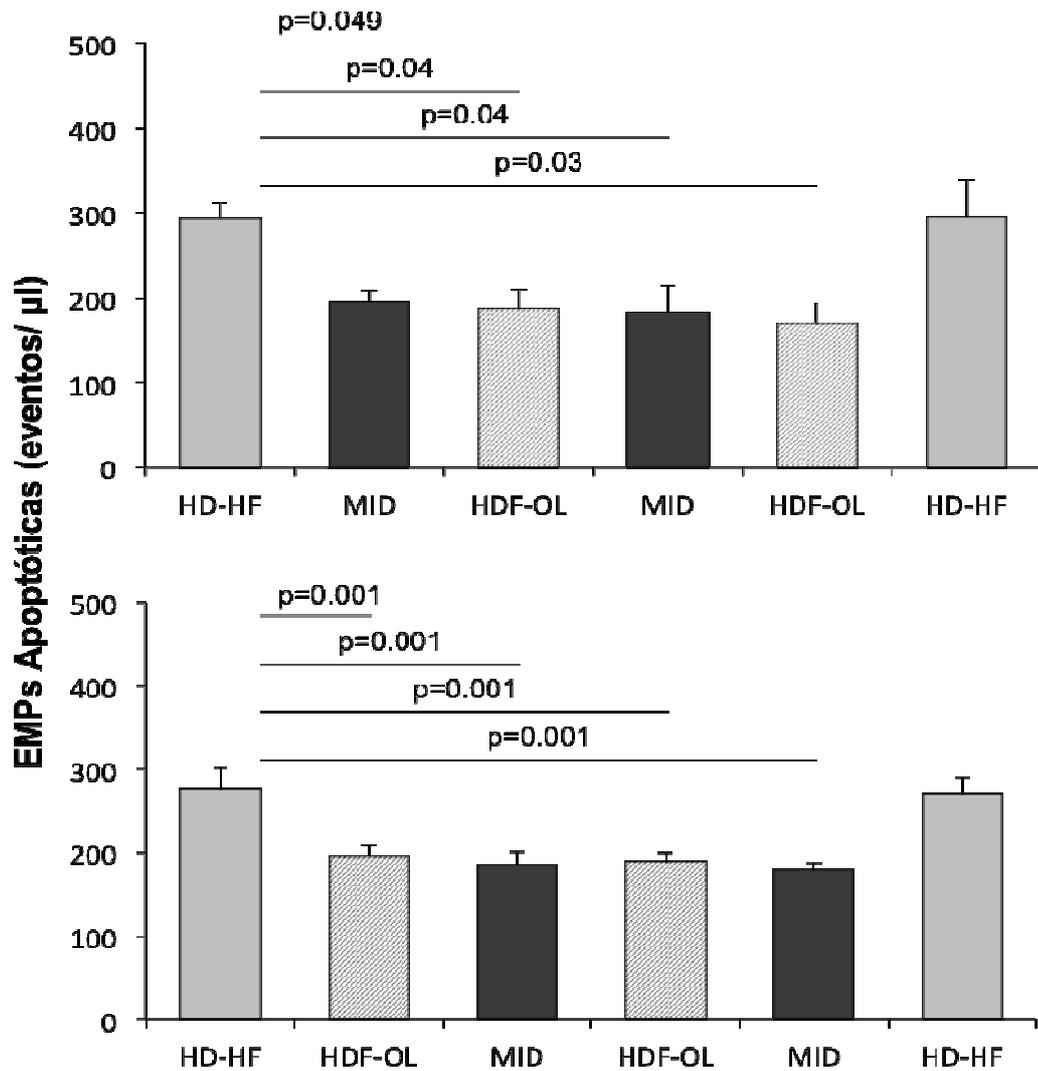


Figura 6. Niveles plasmáticos de EMPs en pacientes durante los diferentes periodos del estudio. Los niveles de EMPs apoptóticas son expresados como eventos por microlitro (eventos/ μ l). Basalmente, ambos grupos tienen niveles similares de EMPs. La terapia convectiva disminuye el número de EMPs apoptóticas al compararla con HD-HF, pero estos valores son significativamente mayores que el nivel de EMPs de sujetos sanos. No hubo diferencias entre los diferentes periodos de terapia convectiva.

5. CORRELACIÓN ENTRE MICROINFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Se analizó la correlación existente entre los diferentes parámetros de microinflamación y disfunción endotelial, teniendo en cuenta las determinaciones de todos los pacientes en todos los periodos. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Encontramos correlación entre los niveles de CD14+CD16+ y EMPs ($R= 0.63$ $p= 0.003$), y entre los niveles de EPCs y EMPs ($R= -0.53$ $p= 0.005$).

No hubo correlación entre los niveles de CD14+CD16+ y EPCs.

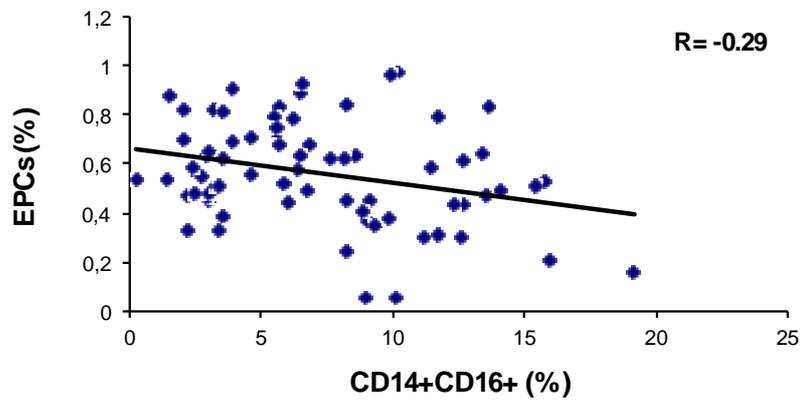
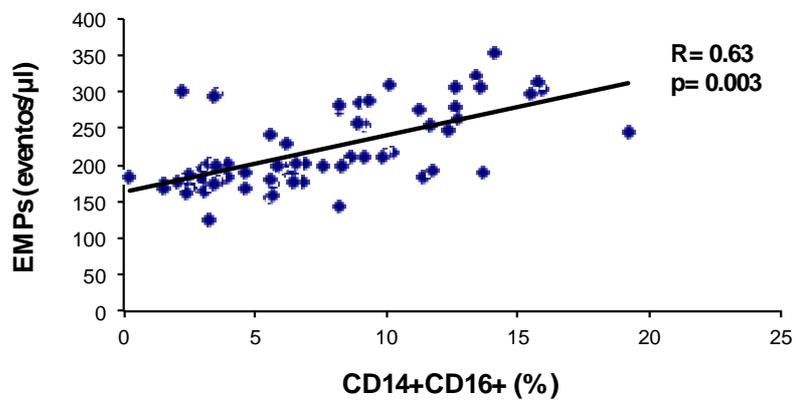
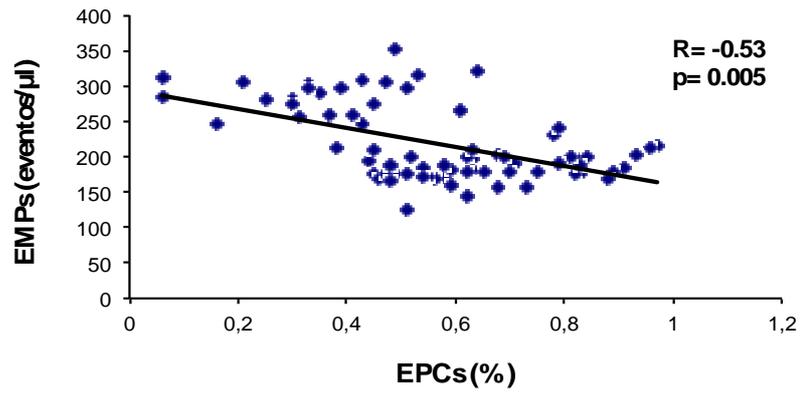
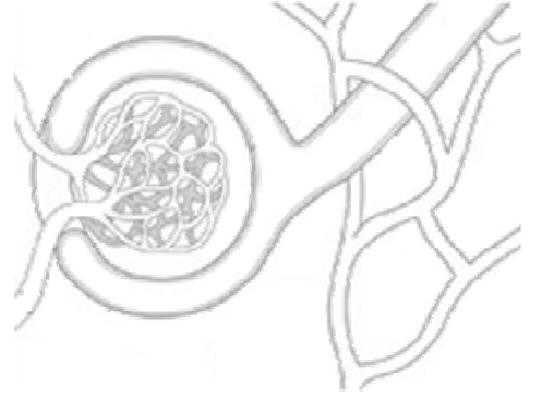


Figura 7. Correlaciones microinflamación-disfunción endotelial.



DISCUSIÓN

Este estudio analizó el efecto de dos técnicas de diálisis diferentes con alto transporte convectivo (HDF-OL y MID), sobre el estado microinflamatorio y el balance daño reparación endotelial en una población de pacientes en hemodiálisis. Se llevó a cabo un estudio prospectivo y cruzado para evaluar la respuesta celular de cada paciente en cada una de las técnicas usadas en el estudio. Nuestros resultados mostraron que ambas técnicas de hemodiálisis con alto transporte convectivo, HDF-OL y MID, redujeron el porcentaje de monocitos proinflamatorios CD14+CD16+ al compararlas con HD-HF. Además, el daño endotelial, medido como el número de EMPs apoptóticas, fue menor en MID y HDF-OL que en HD-HF. Respecto al número de EPCs, observamos un incremento en el número de estas células con capacidad de reparación endotelial cuando los pacientes fueron tratados con técnicas de alto transporte convectivo al compararlos con HD-HF, aunque los valores no alcanzaron niveles normales. Existió una correlación entre los niveles de CD14+CD16+ y EMPs, y entre los niveles de EPCs y EMPs. Sin embargo no hubo correlación entre los niveles de CD14+CD16+ y EPCs.

Se ha descrito una estrecha relación entre inflamación y enfermedad cardiovascular en pacientes con IRC en hemodiálisis.²²⁰ La mejora del estado inflamatorio en este tipo de pacientes podría tener un impacto positivo a la hora de disminuir el número de eventos cardiovasculares y por consiguiente los altos índices de mortalidad cardiovascular presente en esta población.¹⁸³ Las técnicas convectivas de diálisis son superiores a la hora de eliminar toxinas urémicas de mediano y alto peso molecular.^{105,106,130,196} La mayor capacidad depuradora de este tipo de técnicas se ha postulado como una posibilidad para mejorar el estado inflamatorio crónico presente en pacientes con IRC.¹⁴⁸

En este estudio, se usaron dos técnicas convectivas de diálisis diferentes, una (MID) con el doble de flujo de sustitución que la otra (HDF-OL). Varios estudios han mostrado un mayor aclaramiento tanto in vivo como in vitro de toxinas de alto peso molecular de MID al compararla con HDF-OL.^{105,106,196} Teniendo en cuenta la relación existente entre la eliminación de toxinas de mediano y alto peso molecular y la mejora del estado inflamatorio, se podía pensar que el uso de MID mejoraría en mayor medida este estado que HDF-OL. Sin embargo, las dos técnicas fueron igual de eficaces a la hora de mejorar el estado inflamatorio en los pacientes. Un estudio reciente prospectivo y cruzado con 14 pacientes en hemodiálisis⁵⁶ apoya nuestros resultados. Estos autores compararon la cantidad total de solutos eliminados, tanto para sustancias de bajo peso molecular (small water-soluble substances) como de alto peso molecular (protein-bound compounds), para mid-dilution y hemodiafiltración en línea postdilución sin encontrar diferencias entre ambas técnicas. Quizás, la clave sea que aunque con MID infundimos el doble de volumen de sustitución que con HDF-OL, el volumen total infundido en postdilución no es diferente entre ambas técnicas, y por eso en nuestro estudio no encontramos diferencias entre ambas. Estudios futuros son necesarios para entender como un incremento del transporte convectivo pueden mejorar la microinflamación y la disfunción endotelial en pacientes en hemodiálisis. Sin embargo, este potencial efecto beneficioso probablemente relacionado con una mayor eliminación de toxinas urémicas podría estar asociado con una incontrolada eliminación de otros compuestos como hormonas y albúmina, hecho que debe ser tenido muy en cuenta por los efectos no deseables que puede llevar asociado. Este estudio sugiere que un alto transporte convectivo en postdilución es crucial para mejorar la microinflamación y la disfunción endotelial. Desafortunadamente no existen datos en hemodiafiltración en línea predilución.

Estudios controlados, prospectivos y randomizados con un importante número de pacientes,^{72,129,159} atribuyen a altas tasas de transporte convectivo en postdilución una mejora en la mortalidad de estos pacientes al compararlas con técnicas de diálisis de bajo flujo y alto flujo.

El estudio CONTRAST (The Convective Transport Study), es un estudio prospectivo y randomizado,⁷² en el que 714 pacientes fueron asignados en HDF-OL (358 pacientes) o en hemodiálisis de bajo flujo (356 pacientes). El objetivo primario del estudio fue evaluar mortalidad global y el objetivo secundario fue evaluar mortalidad cardiovascular. No se encontraron diferencias entre las técnicas en cuanto a mortalidad global y mortalidad cardiovascular en una media de seguimiento de tres años. Un subgrupo de pacientes que recibían elevados volúmenes de hemodiafiltración (>21.95 litros) si obtuvieron beneficios en cuanto a mortalidad global. Otro estudio controlado, prospectivo y randomizado (TURKISH HDF STUDY),¹⁵⁹ enrola a 782 pacientes en HDF-OL (391 pacientes) y en HD-HF (391 pacientes) con un seguimiento de dos años. El objetivo primario del estudio fue evaluar mortalidad global y el índice de eventos cardiovasculares no fatales. El objetivo secundario fue valorar mortalidad cardiovascular, complicaciones intradiálisis, índices de hospitalización, cambios en parámetros de laboratorio y medicación empleada. No hubo diferencias en cuanto a mortalidad global entre los dos grupos de pacientes. Sólo para volúmenes de sustitución superiores a 17.4 litros se encuentra un beneficio en cuanto a mortalidad de cualquier tipo y mortalidad cardiovascular. Un estudio español, prospectivo, controlado y randomizado (ESHOL),¹²⁹ compara 456 pacientes en HDF-OL con 450 pacientes en HD-HF con un seguimiento de tres años. El objetivo primario fue valorar la mortalidad global. Los objetivos secundarios incluyeron mortalidad cardiovascular, cualquier causa de hospitalización, tolerabilidad al tratamiento y el análisis de los datos de laboratorio. Aquellos pacientes asignados a HDF-OL obtuvieron una reducción del riesgo del 30% en cuanto a mortalidad de cualquier

tipo, una reducción del riesgo del 33% en cuanto a mortalidad cardiovascular, y una reducción del riesgo del 55% en cuanto a mortalidad de causa infecciosa. Se estimó que el paso de 8 pacientes de la técnica convencional a HDF-OL prevenía una muerte al año. El grupo de HDF-OL presentó menor número de episodios de hipotensión y menor tasa de hospitalización. Los volúmenes de sustitución durante todos los periodos del estudio fueron superiores a 20 litros.

En este estudio, no encontramos diferencias en los parámetros analizados durante los diferentes periodos del estudio (HD-HF, MID, HDF-OL), tanto en el grupo 1 como en el grupo 2. De esta forma, los valores de Kt/Ve, β_2m prediálisis, leucocitos, PCR, albúmina, IL 6, TNF α , hemoglobina, dosis de darbepoetina, ferritina, IST, dosis de hierro intravenoso y PTH, permanecieron estables y sin diferencias significativas a lo largo del estudio. Podemos afirmar que la técnica de diálisis empleada en cada momento no modificó de manera significativa estos parámetros.

Como ya se ha comentado, el aclaramiento de sustancias de mediano y alto peso molecular como β_2m , esta incrementado cuando usamos técnicas de hemodiafiltración en línea.¹³⁰ Los niveles prediálisis de β_2m son predictores de mortalidad en estos pacientes,⁴³ y algunos estudios, tanto observacionales como controlados muestran que los niveles de β_2m prediálisis descienden al cambiar a los pacientes de técnica convencional a hemodiafiltración en línea.^{116,124,248} Que los niveles de β_2m prediálisis en este estudio no se modificaran con la técnica, están en consonancia con los resultados de otro trabajo publicado por nuestro grupo.³⁰ Que en estos estudios, la β_2m prediálisis no descendiera, se podría deber a que el tiempo en terapia convectiva no fue lo suficientemente prolongado, ya que por ejemplo, en el último estudio controlado,¹²⁹ con un largo seguimiento, hay una tendencia a una menor acumulación con HDF-OL pero no fue significativa.

Se ha publicado que las técnicas de hemodiafiltración en línea son más efectivas en el aclaramiento de biomarcadores de inflamación.⁶⁷ Aunque existe gran controversia con respecto a los niveles de PCR, ya que existen trabajos que observan un descenso en este parámetro²³⁸ y otros en los que permanece estable.^{129,236} Los niveles de PCR no se modificaron en nuestro trabajo. Tanto en este estudio, como en el ya citado previamente de Carracedo y cols. , los niveles sanguíneos de TNF α e IL 6 no se modificaron con las diferentes técnicas.

Comparando nuestros datos con los obtenidos por el estudio ESHOL de Maduell y cols. , coincidimos en no encontrar diferencias en parámetros de nutrición como la albúmina, en los diferentes parámetros relacionados con la anemia (hemoglobina, ferritina, IST, dosis de darbepoetina y dosis de hierro intravenoso) y del metabolismo mineral como la PTH. Sin embargo no coincidimos en la dosis de diálisis medida por Kt/Ve, en la que para ellos existen diferencias significativas al usar terapia convectiva (cifras mayores que en HD-HF).

Al analizar la estabilidad hemodinámica, observamos que no hay diferencias ni en las cifras de tensión arterial, ni en el número de episodios de hipotensión intradiálisis. Existen estudios que sugieren que las técnicas de hemodiafiltración en línea la mejoran,^{53,129} y otros que no confirman estos datos.²³⁶

Quizás, el haber seleccionado pacientes con unos criterios de inclusión menos estrictos, nos habría permitido obtener diferencias en estos parámetros de laboratorio y de estabilidad hemodinámica al aplicar HDF-OL y/o MID frente a HD-HF.

Que un alto transporte convectivo en postdilución mejore el estado inflamatorio crónico de los pacientes, podría ser una de las razones que explicarían este descenso en la mortalidad atribuida a este tipo de técnicas.

Observamos que tanto MID como HDF-OL reducen el porcentaje de monocitos CD14+CD16+ en los pacientes al compararlos con el tratamiento en HD-HF. Este

resultado se refuerza con el diseño cruzado del estudio, garantizando de esta manera que los resultados no se ven afectados por la técnica previa. En el periodo final, todos los pacientes son tratados con la técnica que se trataron basalmente, HD-HF, ascendiendo el porcentaje de monocitos CD14+CD16+ al nivel que tenían inicialmente.

Como ya se ha mencionado previamente, los pacientes en hemodiálisis con mayor grado de proceso inflamatorio crónico asociado tienen una mayor probabilidad de sufrir un evento cardiovascular.²²⁰ El daño endotelial es el primer paso en el desarrollo de enfermedad vascular como aterosclerosis.⁹⁷ Ante este daño las células endoteliales emiten vesículas al torrente sanguíneo denominadas EMPs. Las EMPs expresan en su superficie marcadores de célula endotelial reflejando de esta manera su origen.²⁰⁶ Las EMPs apoptóticas se han descrito en varias enfermedades asociadas a disfunción endotelial, como el síndrome antifosfolípido,¹⁷⁸ preeclampsia¹²¹ y síndrome coronario agudo.¹⁴ En pacientes urémicos, el grado de elevación de EMPs es comparable con el observado en estas patologías, sugiriendo que este aumento de vesiculación endotelial podría actuar como un marcador de disfunción endotelial en la uremia.^{1,95} Además, las EMPs circulantes se han relacionado con una función vascular dañada en pacientes en hemodiálisis.²⁵⁰ En un estudio previo de este grupo de investigación, se observó que el nivel de EMPs apoptóticas en HDF-OL fue menor al compararla con HD-HF.¹⁸³ Este estudio pone de manifiesto que el uso de técnicas con un alto transporte convectivo reduce el número de EMPs apoptóticas comparadas con HD-HF, mientras que no hay diferencias entre ambas técnicas convectivas (MID y HDF-OL).

Encontramos que el porcentaje de EPCs fue mayor en MID y HDF-OL que en HD-HF, sin que existieran diferencias entre las dos modalidades con alto

transporte convectivo. Las EPCs constituyen el principal mecanismo de reparación del endotelio vascular.^{133,250} Se ha demostrado que el número de EPCs circulantes puede servir como un método no invasivo para evaluar la función endotelial y que un descenso en su número puede ser considerado como un factor de riesgo cardiovascular en individuos con o sin enfermedad cardiovascular manifiesta.¹⁰⁷ Hill y cols.,⁷⁹ encontraron una correlación negativa entre el número de EPCs y el score de Framingham. Dado que los pacientes con ERC se caracterizan por su alta mortalidad y morbilidad debida principalmente a complicaciones cardiovasculares,²²⁰ su supervivencia podría verse influenciada, al menos en parte, por una reparación vascular deficiente como resultado de una reducción en el número o función de las EPCs.^{44,78,123}

En este estudio, encontramos correlación entre CD14+CD16+ y EMPs, entre EMPs y EPCs, pero no entre CD14+CD16+ y EPCs. Estos resultados sugieren que la microinflamación esta asociada a disfunción endotelial, y que la mejora del estado microinflamatorio con un alto transporte convectivo podría reducir el daño endotelial.

Podemos observar que la evolución de los parámetros de microinflamación y de disfunción endotelial analizados en el estudio, tiene un comportamiento similar. Niveles basales que mejoran y se mantienen con la aplicación de terapia convectiva, y que vuelven a empeorar cuando se suprime la técnica convectiva y se retorna a la técnica inicial con membranas de alta permeabilidad. Parece evidente por tanto, que la mejora en estos parámetros no solo depende de la aplicación de una técnica de alto transporte convectivo, si no también de la permanencia de esta en el tiempo.

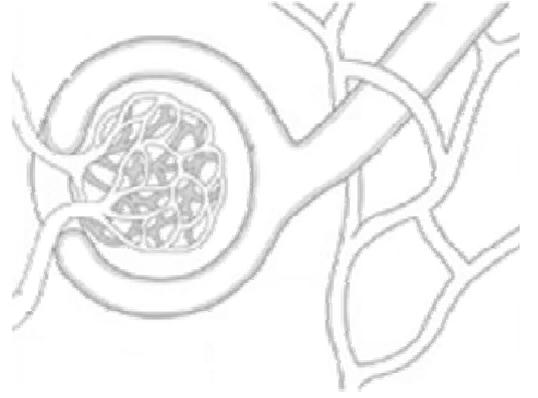
Otro dato a tener en cuenta, es que la mejora obtenida con el alto transporte convectivo no llega a normalizar los valores de los parámetros analizados cuando se compara con una población de sujetos sanos. Se necesitan estudios que nos permitan un completo conocimiento de los mecanismos por los que se produce el daño endotelial en los pacientes con IRC para poder plantear diferentes estrategias terapéuticas con el fin de evitar la aparición de daño disfunción endotelial, y una vez que han aparecido, enlentecer la progresión para evitar el posterior desarrollo de aterosclerosis y la aparición de eventos cardiovasculares. Las técnicas con un alto transporte convectivo en postdilución son sin duda una de estas estrategias, tanto por la mejora en el estado inflamatorio como por la mejora en la mortalidad y mortalidad cardiovascular. A pesar de este importante avance, el camino para acercarnos lo más posible a la normalidad es aún largo y desconocido. En el momento presente, se está planteando que la introducción de técnicas de diálisis que combinen la difusión y adsorción, pueden incrementar la capacidad depuradora de toxinas urémicas de mayor peso molecular y de solutos ligados a las proteínas. Por tanto, el uso de esta modalidad de diálisis puede constituir una nueva alternativa terapéutica de depuración renal. Es un reto de la Ciencia en general y de la Nefrología en particular descubrir y recorrer este apasionante camino.

LIMITACIONES

Este estudio tiene varias limitaciones. El número de pacientes fue más bien pequeño, y por esta razón se diseñó un estudio cruzado, en el que cada paciente fue su propio control, aportando esto consistencia y reproductibilidad a los resultados. El diseño del estudio, en el cual los pacientes cambiaban de una técnica convectiva a otra podría resultar en un efecto potenciador. Para minimizar este posible efecto, dividimos a los pacientes en dos grupos, en el que cada grupo comenzaba con una técnica convectiva diferente. Se encontraron resultados

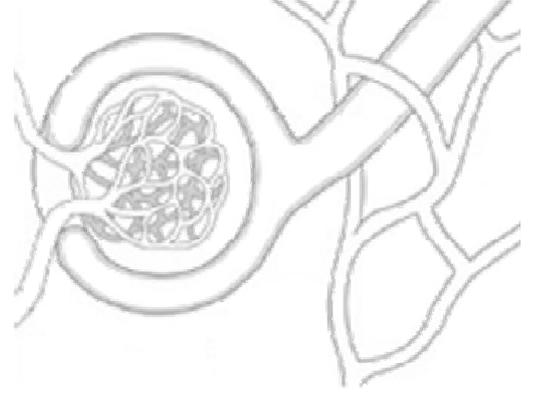
similares para ambos grupos. Además, se añadió un periodo final de HD-HF para ver como variaban los diferentes marcadores.

Para minimizar lo más posible los factores de confusión, se establecieron unos criterios muy restrictivos de inclusión y de exclusión. De hecho, los pacientes incluidos en este estudio presentaban un excelente perfil inflamatorio con niveles de proteína C reactiva en rango normal, niveles de albúmina mayores de 3.8 g/dl, todos se dializaron a través de una fístula arteriovenosa, usando agua estéril y en un solo centro de hemodiálisis. Como la eritropoyetina es un importante estimulador de la producción de EPCs en médula ósea,¹⁴⁹ las dosis se mantuvieron estables y sin variación significativa a lo largo del estudio, por lo que parece poco probable que en nuestro estudio el uso de eritropoyetina actuara como un factor de confusión.



CONCLUSIONES

- 1.- Los pacientes con insuficiencia renal crónica dializados con membranas de alta permeabilidad, presentan un elevado estado microinflamatorio y de disfunción endotelial, en comparación con una población de sujetos sanos.
- 2.- El uso de terapias convectivas de alta eficacia (Hemodiafiltración en línea postdilución o mid-dilution) mejora el perfil microinflamatorio al compararlas con hemodiálisis de alto flujo, sin que existan diferencias entre ambas técnicas.
- 3.- El uso de terapias convectivas de alta eficacia (Hemodiafiltración en línea postdilución o mid-dilution), mejora los parámetros de daño reparación endotelial al compararlas con hemodiálisis de alto flujo, sin que existan diferencias entre ambas modalidades terapéuticas.
- 4.- La microinflamación esta asociada a disfunción endotelial. El uso de hemodiafiltración en línea postdilución y mid-dilution, reduce el estado microinflamatorio y esto probablemente conduce a una mejora de la disfunción endotelial.
- 5.- La mejora obtenida en los parámetros de microinflamación y de daño reparación endotelial con ambas técnicas convectivas, se aproxima a los valores presentes en la población de sujetos sanos pero sin llegar a normalizarse.
- 6.- La mejora en el perfil microinflamatorio y de daño reparación endotelial obtenida con las técnicas con alto transporte convectivo podría estar relacionado con la menor tasa de mortalidad global y cardiovascular recientemente atribuida a este tipo de técnicas.



BIBLIOGRAFÍA

1. Amabile, N., Guérin, A., Leroyer, A., Mallat, Z., Nguyen, C., Boddaert, J., et al . (2005). Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *Journal American Society of Nephrology* , 16, 3381-3388.
2. Amann, K., Tornig, J., Buzello, M., Kuhlmann, A., Gross, M., & Adamczak, M. (2002). Effect of antioxidant therapy with d1-alpha-tocopherol on cardiovascular structure in experimental renal failure. *Kidney International* , 62, 877-884.
3. Anker, S., & Coats, A. (1999). Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest* , 115, 836-847.
4. Annuk, M., Zilmer, M., Lind, L., Linde, T., & Fellstro, T. (2001). Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *Journal American Society of Nephrology* , 12, 2747-2752.
5. Asahara, T., Chen, D., Tsurumi, Y., et al. (1996). Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation* , 94, 3291-3302.
6. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., et al . (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* , 275, 964-967.
7. Barleon, B. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the receptor Flt-1. *Blood* , 87, 3336-3343.
8. Barton, G. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *Journal of Clinical Investigation* , 118, 413-420.
9. Bazzoni, F., & Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New England Journal of Medicine* , 334, 1717-1725.
10. Belge, K., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., et al . (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *Journal of Immunology* , 168, 3536-3542.
11. Bemelmans, M., Gouma, D., & Buurman, W. (1993). Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in murine model. *Journal of Immunology* , 150, 2007-2017.
12. Berckmans, R., Neuwland, R., Böing, A., Romijn, F., Hack, C., & Sturk, A. (2001). Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thrombosis and Haemostasis* , 85, 639-646.
13. Bergström, J., Heimbürger, O., Lindholm, B., & Qureshi, A. (1995). Elevated serum C-reactive protein is a strong predictor of increased mortality and low serum albumin in hemodialysis patients. *Journal American Society of Nephrology* , 6, 573.
14. Bernal-Mizrachi, L., Jy, W., Jiménez, J., Pastor, J., Mauro, L., Horstman, L., et al . (2003). High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *American Heart Journal* , 145, 962-970.
15. Bhagat, K., & Vallance, P. (1997). Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* , 96, 3042-3047.
16. Blankestijn, P., Ledebó, I., & Canaud, B. (2010). Hemodiafiltration: clinical evidence and remaining questions. *Kidney International* , 77, 581-587.

-
17. Boisvert, W., Santiago, R., Curtiss, L., & Terkeltaub, R. (1998). A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* , 101, 353-363.
 18. Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J., & Harlan, J. (1997). Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* , 89, 2429-2442.
 19. Bonomini, M., Reale, M., Santarelli, P., Stuard, S., Settefrati, N., & Albertazzi, A. (1998). Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron* , 79, 399-407.
 20. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., & Charo, I. (1998). Decrease lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* , 394, 894-897.
 21. Boulanger, C., Amabile, N., Guèrin, A., Pannier, B., Leroyer, A., Mallat, C., et al . (2007). In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* , 49, 902-908.
 22. Bradley, J. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology* , 214, 149-160.
 23. Bruun, J., Lihn, A., Verdich, C., Pedersen, S., Toubro, S., Astup, A., et al . (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue-derive cytokines: In vivo and in vitro investigations in humans. . *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* , 285, E527-E533.

 24. Cachofeiro, V., Goicochea, M., de Vinuesa, S., Oubiña, P., Lahera, V., & Luño, J. (2008). Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney International Suppl* , S4-9.
 25. Cairns, A., Crockard, A., & Bell, A. (2002). The CD14⁺ CD16⁺ monocyte subset in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International* , 21, 189-192.
 26. Caló, L., Naso, A., Carraro, G., Wratten, M., Pagnin, E., Bertipaglia, L., et al . (2007). Effect of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate on oxidative stress in dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 22, 1413-1419.
 27. Canaud, B., Bragg-Greshan, J., Marshall, M., Desmeules, S., Gillespie, B., Depner, T., et al . (2006). Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS. *Kidney International* , 69, 2087-2093.
 28. Cano, N., Fouque, D., Roth, H., Aparicio, M., Azar, R., Canaud, B., et al . (2007). Intradialytic parenteral nutrition does not improve survival in malnourished hemodialysis patients: A 2-year multicenter, prospective, randomized study. *Journal American Society of Nephrology* , 18, 2583-2591.
 29. Carbó, C., Arderiu, G., Escolar, G., Fusté, B., Cases, A., Carrascal, M., et al . (2008). Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. *American Journal of Kidney Diseases* , 51, 603-612.
 30. Carracedo, J., Merino, A., Nogueras, S., Carretero, D., Berdud, I., Ramírez, R., et al . (2006). On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14⁺CD16⁺

- monocyte-derived dendritic cells: A prospective crossover study. *Journal American Society of Nephrology* , 17, 2315-2321.
31. Carracedo, J., Ramírez, R., Madueño, J., Soriano, S., Rodríguez-Benot, A., Rodríguez, M., et al . (2002). Cell apoptosis and hemodialysis-induced inflammation. *Kidney International* , 80, 89-93.
 32. Carracedo, J., Ramírez, R., Martín-Malo, A., Rodríguez, 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* , 17, 428-434.
 33. Carswell, E., Old, L., Kassel, R., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* , 72, 3666-3670.
 34. Cecka, J. (2001). The UNOS scientific renal transplant registry. *Clinical Transplantation* , 1-18.
 35. Celletti, F., Hilfiker, P., Ghafouri, P., et al. (2001). Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor 165 on progression of atherosclerotic plaque. *Journal American Collegue of Cardiology* , 7, 425-429.
 36. Celletti, F., Waugh, J., Amabile, P., et al. (2001). Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature Medicine* , 7, 425-429.
 37. Chade, A., Lerman, A., & Lerman, L. (2005). Kidney in early atherosclerosis. *Hypertension* , 45, 1042-1049.
 38. Chan, C., Li, S., & Verma, S. (2005). Nocturnal hemodialysis is associated with restoration of impaired endothelial progenitor cell biology in end-stage renal disease. *American Journal of Physiology Renal Physiology* , 289, F679-F684.
 39. Charo, I., & Ransohoff, R. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine* , 354, 610-621.
 40. Chauveau, P., Nguyen, H., Combe, C., Chene, G., Azar, R., Cano, N., et al . (2005). Dialyzer membrane permeability and survival in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases* , 45, 565-571.
 41. Cheung, A., & Greene, T. (2009). Effect of membrane permeability on survival. *Journal American Society of Nephrology* , 20, 506-512.
 42. Cheung, A., Levin, N., Greene, T., Agodoa, L., Bailey, J., Beck, G., et al . (2003). Effects of high-flux hemodialysis on clinical outcomes: Results of the HEMO Study. *Journal American Society of Nephrology* , 14, 3251-3263.
 43. Cheung, A., Rocco, M., Yan, G., Leypoldt, J., Levin, N., Greene, T., et al . (2006). Serun B2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients: Results of the HEMO Study. *Journal American Society of Nephrology* , 17, 546-555.
 44. Choi, J., Kim, K., Huh, W., Kim, B., Byun, J., Suh, W., et al . (2004). Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* , 24, 1246-1252.
 45. Claus, M., & al, e. (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cells and monocytes procoagulant activity, and promotes monocytes migration. *Journal of Experimental Medicine* , 172, 1535-1545.

-
46. Combes, V., Simon, A., Grau, G., Arnoux, D., Camoin, L., Sabatier, F., et al . (1999). In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *Journal Clinical Investigation* , 104, 93-102.
 47. Cybulsky, M., & Gimbrone, M. (1991). Endothelial expression of a mononuclear leucocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* , 251, 788-791.

 48. Davignon, J., & Ganz, P. (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* , 109 (Supl. III), III-27-III-32.
 49. De Groot, K., Bahlmann, F., Sowa, J., Koenig, J., Menne, J., Haller, H., et al . (2004). Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney International* , 66, 641-646.
 50. Delmez, J., Yan, G., Bailey, J., Beck, G. B., Cheung, A., Haysen, G., et al . (2006). Cerebrovascular disease in maintenance hemodialysis patients: results of the HEMO Study. *American Journal of Kidney Diseases* , 47, 131-138.
 51. Depner, T., Radeva, M., Bailey, J., Beddhu, S., Butterly, D., Coyne, D., et al . (2003). Impact of dialysis dose and membrane on infection-related hospitalization and death: Results of the HEMO Study. *Journal American Society of Nephrology* , 14, 1863-1870.
 52. Descamps-Latscha, B., Herbelin, A., Nguyen, A., Roux-Lombard, P., Zingraff, J., Moynot, A., et al . (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* , 154, 882-892.
 53. Donauer, J., Schweiger, C., Rumberger, B., Krumme, B., & Böhrer, J. (2003). Reduction of hypotensive side effects during online-haemodiafiltration and low temperature haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 18, 1616-1622.
 54. Drueke, T., Locatelli, F., Clyne, N., Eckardt, K., Macdougall, I., Tsakiris, D., et al . (2006). Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *New England Journal of Medicine* , 355, 2071-2084.

 55. Eknoyan, G., Beck, G., Cheung, A., Daurgidas, J., Greene, T., Kusek, J., et al . (2002). Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *New England Journal of Medicine* , 347, 2010-2019.
 56. Eloit, S., Dhondt, A., Van Landschoot, M., Waterloos, M., & Vanholder, R. (2012). Removal of water-soluble and protein-bound solutes with reversed mid-dilution versus post-dilution haemodiafiltration. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 27, 3278-3283.
 57. Elsayed, E., Tighiouart, H., Griffith, J., Kurth, T., Levey, A., Salem, D., et al . (2007). Cardiovascular disease and subsequent kidney disease. *Archives of Internal Medicine* , 167, 1130-1136.

 58. Faure, V., Dou, L., Sabatier, F., Cerini, C., Sampol, J., Berland, Y., et al . (2006). Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 4, 566-573.

59. Feliciani, A., Riva, M., Zerbi, S., Ruggiero, P., Plati, A., Cozzi, G., et al . (2007). New strategies in haemodiafiltration (HDF): prospective comparative analysis between on-line mixed HDF and mid-dilution HDF. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 22, 1672-1679.
60. Ferrara, N. (1999). Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International* , 56, 794-814.
61. Fichtlscherer, S., Rosenberger, G., Walter, D., Breuer, S., Dimmeler, S., & Zeiher, A. (2000). Elevates C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* , 102, 1000-1006.
62. Fischer-Smith, T., Croul, S., & Sverstiuk, A. (2001). CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. *Journal Neurovirology* , 7, 528-541.
63. Foley, R., Parfrey, P., & Sarnak, M. (1998). Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chonic renal failure. *American Journal of Kidney Diseases* , 32 [Suppl 5], S112-S119.
64. Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* , 1, 27-31.
65. Garcia, S., Chirinos, J., Jimenez, J., Del Carpio Muñoz, F., Canoniero, M., Jy, W., et al . (2005). Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. *Journal of heart and lung transplantation* , 24, 2184-2189.
66. Gerszten, R., García-Zepeda, E., Lim, Y., Yoshida, M., Ding, H., & Gimbrone, M. j. (1990). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* , 398, 718-723.
67. Gil, C., Lucas, C., Possante, C., et al . (2003). On-line haemodiafiltration decreases serum serum TNFalpha levels in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 18, 447-448.
68. Go, A., Chertow, G., M.P.H, Fan, D., M.S.P.H., McCulloch, C., et al . (2004). Chronic kidney disease and the risk of death, cardiovascular events, and hospitalization. *New England Journal of Medicine* , 351, 1296-1305.
69. González, M., & Selwyn, A. (2003). Endothelial function, inflammation and prognosis in cardiovascular disease. *American Journal of Medicine* , suppl. 8A, 99S-106S.
70. Goyert, S., Ferrero, E., Rettig, W., Yenamandra, A., Obata, F., & Le Beau, M. (1988). The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* , 239, 497-500.
71. Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., et al . (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* , 83, 793-802.
72. Grooteman, M., van den Dorpel, M., Bots, M., Penne, E., van der Weerd, N., Mazairac, A., et al . (2012). Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes. *Journal American Society of Nephrology* , 23, 1087-1096.

-
73. Harris, T., Ferruci, L., Tracy, R., Corti, M., Wacholder, S., & WH, E. (1999). Association of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *American Journal of Medicine* , 106, 506-512.
 74. Haubitz, M., Schulze, M., & Koch, K. (1990). Increase of C-reactive protein serum values following haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 5, 500-503.
 75. Heberlin, A., Urena, P., Nguyen, A., Zingraff, J., & Descamps-Latscha, B. (1991). Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure. *Kidney International* , 39, 954-960.
 76. Heine, G., Ulrich, C., Seibert, E. S., Marell, J., Reichart, B., Krause, M., et al . (2008). CD14(++)CD16 monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney International* , 73, 622-629.
 77. Henrich, W. (2009). Optimal cardiovascular therapy for patients with ESRD over the next several years. *Clinical Journal American Society of Nephrology* , 4, S106-S109.
 78. Herbrig, K., Pistrosch, F., Oelschlaegel, U., Wichmann, G., Wagner, A., Foerster, S., et al . (2004). Increased total number but impaired migratory activity and adhesion of endothelial progenitor cells in patients on long-term hemodialysis. *American Journal of Kidney Diseases* , 44, 840-849.
 79. Hill, J., Zalos, G., Halcox, J., Schenke, B., Waclawiw, M., Quyyumi, A., et al . (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk . *New England Journal of Medicine* , 348, 593-600.
 80. Himmelfarb, J., Stenvinkel, P., Ikizler, T., & Hakim, R. (2002). The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney International* , 62, 1524-1538.
 81. Hoenich, N., & Levin, R. (2003). The implications of water quality in hemodialysis. *Seminars in Dialysis* , 16, 492-497.
 82. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF-alpha: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* , 49, 1215-1228.
 83. Huber, S., Sakkinen, P., Conze, D., Hardin, N., & Tracy, R. (1999). Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* , 19, 2364-2367.
 84. Hugel, B., Martínez, M., Kunzelmann, C., & Freyssinet, J. (2005). Membrane microparticles: Two sides of the coin. *Physiology* , 20, 22-27.
 85. Ikeda, U., Matsui, K., Murakami, Y., & Shimada, K. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clinical Cardiology* , 25, 143-147.
 86. Indram, D., Caplice, N., & Yoder, M. (2005). Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* , 106, 1525-1531.
 87. Inoue, M., Itoh, H., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., Komatsu, R., et al . (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* , 98, 2108-2116.

88. International Organization for Standardization. Quality of dialysis fluid for haemodialysis and related therapies ISO 11663. (2009).
89. Isner, J., & Losordo, D. (1999). Therapeutic angiogenesis for heart failure. *Nature Medicine* , 5, 491-492.
90. Jamison, R., Hartigan, P., Kaufman, J., Goldfarb, D., Warren, S., Guarino, P., et al . (2007). Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease. *JAMA* , 10, 1163-1170.
91. Jimenez, J., Jy, W., Mauro, L., Horstman, L., Bidot, C., & Ahn, Y. (2005). Endothelial microparticles (EMP) as vascular disease markers. *Advances in Clinical Chemistry* , 39, 131-157.
92. Jimenez, J., Jy, W., Mauro, L., Soderland, C., Horstman, L., & Ahn, Y. (2003). Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis Research* , 109, 175-180.
93. Jolly, S., & Chatatalsingh C, B. J. (2001). Excessive weight gain during peritoneal dialysis. *The International Journal of Artificial Organs* , 24, 197-202.
94. Jones, S., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., & Fuller, G. (2001). The soluble interleukin 6 receptor: Mechanisms of production and implications in disease. *The FASEB Journal* , 15, 43-58.
95. Jourde-Chiche, N., Dou, L., Sabatier, F., Calaf, R., Cerini, C., Robert, S., et al . (2009). Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 7, 1576-1584.
96. Kato, A., Takita, T., Maruyama, Y., & Hishida, A. (2004). Chlamydial infection and progression of carotid atherosclerosis in patients on regular hemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 19, 2539-2546.
97. Kaya, Y., Ari, E., Demir, H., Soylemez, N., Cebi, A., Alp, H., et al . (2012). Accelerated atherosclerosis in haemodialysis patients; correlation of endothelial function with oxidative DNA damage. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 27, 1164-1169.
98. Kaysen, G., Dubin, J., Müller, H., Rosales, L., & Levin, N. (2000). The acute phase response varies with time and predicts serum albumin levels in hemodialysis patients. The HEMO Study Group. *Kidney International* , 58, 346-352.
99. Kim, H., Yang, H., Kim, M., Choi, H., Jo, S., Cho, W., et al . (2011). Microinflammation in hemodialysis patients is associated with increased CD14+ CD16+ pro-inflammatory monocytes: possible modification by on-line hemodiafiltration. *Blood Purification* , 31, 281-288.
100. Koc, M., Toprak, A., Tezcan, H., Bihorac, A., Akoglu, E., & Ozener, I. (2002). Uncontrolled hypertension due to volume overload contributes to higher left ventricular mass index in CAPD patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 17, 1661-1666.
101. Konings, C., Kooman, J., Schonck, M., Dammers, R., Cheriex, E., & Palmans Meulemans, A. (2002). Fluid status, blood pressure, and cardiovascular abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis International* , 22, 477-487.

-
102. Krane, V., Krieter, D., Olschewski, M., März, W., Mann, J., Ritz, E., et al . (2007). Dialyzer membrane characteristics and outcome of patients with type 2 diabetes on maintenance hemodialysis. *American Journal of Kidney Diseases* , 49, 267-275.
 103. Krenning, G., Dankers, P., Drouven, J., Waanders, F., Franssen, C., van Luyn, M., et al . (2009). Endothelial progenitor cell dysfunction in patients with progressive chronic kidney disease. *American Journal Physiology Renal Physiology* , 296, F1314-1322.
 104. Kriegler, M., Pérez, C., DeFay, K., Albert, I., & Lu, S. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic. *Cell* , 53, 45-53.
 105. Krieter, D., Collins, G., Summerton, J., Spence, E., Moragues, H., & Canaud, B. (2005). Mid-dilution on-line haemodiafiltration in a standard dialyser configuration. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 20, 155-160.
 106. Krieter, D., Falkenhain, S., Chalabi, L., Collins, G., Lemke, H., & Canaud, B. (2005). Clinical cross-over comparison of mid-dilution hemodiafiltration using a novel dialyzer concept and post-dilution hemodiafiltration. *Kidney International* , 67, 349-356.
 107. Kuczmariski, J., Darocki, M., Dupont, J., Sikes, R., Cooper, C., Farquhar, W., et al . (2011). Effect of moderate to severe chronic kidney disease on flow-mediated dilation and progenitor cells. *Experimental Biology and Medicine* , 236, 1085-1092.

 108. Landray, M., Wheeler, D., Lip, G., Newman, D., Blann, A., McGlynn, F., et al . (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* , 43, 244-253.
 109. Ledebro, I., & Blankestijn, P. (2010). Haemodiafiltration - optimal efficiency and safety. *Nephrology Dialysis Transplantation Plus* , 3, 8-16.
 110. Leroyer, A., Isobe, H., Lesèche, G., Castier, Y., Wassef, M., Mallat, Z., et al . (2007). Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *Journal American Colleague Cardiology* , 49, 772-777.
 111. Leroyer, A., Tedgui, A., & Boulanger, C. (2008). Role of microparticles in atherothrombosis. *Journal of Internal Medicine* , 263, 528-537.
 112. Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H., & Packer, M. (1990). Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *New England Journal of Medicine* , 323, 236-241.
 113. Li, A., & Glass, C. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Medicine* , 8, 1235-1242.
 114. Libby, P. (1995). Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* , 91, 2844-2850.
 115. Lim, H., Lip, G., & Blann, A. (2005). Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic controls, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis. *Atherosclerosis* , 180, 113-118.
 116. Lin, C., Yang, C., Chiang, C., et al . (2001). Long-term on-line hemodiafiltration reduces predialysis beta-2-microglobulin levels in chronic hemodialysis patients. *Blood Purification* , 19, 301-307.

117. Locatelli, F., Canaud, B., Eckardt, K., Stenvinkel, P., Wanner, C., & Zoccali, C. (2003). Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 18, 1272-1280.
118. Locatelli, F., Manzoni, C., & Di Filippo, S. (2002). The importance of convective transport. *Kidney International* , 80, 115-120.
119. Locatelli, F., Martín-Malo, A., Hannedouche, T., Loureiro, A., Papadimitriou, M., Wizemann, V., et al . (2009). Effect of membrane permeability on survival of hemodialysis patients. *Journal American Society of Nephrology* , 20, 645-654.
120. Locksley, R., Killeen, N., & Lenardo, M. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* , 104, 487-501.
121. Lok, C., Van der Post, J., Sargent, I., Hau, C., Sturk, A., Boer, K., et al . (2008). Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* , 27, 344-360.
122. Lonnemann, G. (2004). When good water goes bad: how it happens, clinical consequences and possible solutions. *Blood purification* , 22, 124-129.
123. Lorenzen, J., David, S., Bahlmann, F., de Groot, K., Bahlmann, E., Kielstein, J., et al . (2010). Endothelial progenitor cells and cardiovascular events in patients with chronic kidney disease - a prospective follow-up study. *PLoS ONE* , 5, e11477.
124. Lornoy, W., Becaus, I., Billioux, J., et al . (2000). On-line haemodiafiltration. Remarkable removal of beta-2-microglobulin. Long-term clinical observations. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 15 (Suppl 1), 49-54.
125. Luetiq, B., Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. (1989). Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: An integral protein and a molecule attached to its receptor. *Journal Immunology* , 143, 4034-4038.
126. Lyon, C., Law, R., & Hsueh, W. (2003). Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* , 144, 2195-2200.

127. MacEwan, D. (2002). TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *British Journal of Pharmacology* , 135, 855-875.
128. Maduell, F., Arias, M., Fontseré, N., Vera, M., Masso, E., Garro, J., et al . (2010). What infusion flow should be used for mid-dilution hemodiafiltration? *Blood Purification* , 30, 25-33.
129. Maduell, F., Moreso, F., Pons, M., Ramos, R., Mora, J., Carreras, J., et al . (2013). High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *Journal American Society of Nephrology* , 24, 487-497.
130. Maduell, F., Navarro, V., Carmen, M., Torregrosa, E., Garcia, D., Simon, V., et al . (2002). Osteocalcin and myoglobin removal in on-line hemodiafiltration versus low and high-flux hemodialysis. *American Journal of Kidney Diseases* , 40, 582-589.
131. Martín-Malo, A., Carracedo, J., Ramírez, R., Rodríguez-Benot, A., Soriano, S., Rodríguez, M., et al . (2000). Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis. *Journal American Society of Nephrology* , 11, 936-942.
132. Martín-Malo, A., Merino, A., Carracedo, J., Alvarez-Lara, M., Ojeda, R., Soriano, S., et al . (2012). Effects of intravenous iron on mononuclear cells during the haemodialysis session. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 27, 2465-2471.

-
133. Masuda, H., Kalka, C., & Asahara, T. (2000). Endothelial progenitor cells for regeneration. *Human Cell*, *13*, 153-160.
 134. Mazairac, A., de Wit, G., Grooteman, M., Penne, E., van der Weerd, N., den Hoedt, C., et al . (2013). Effect of Hemodiafiltration on Quality of Life over Time. *Clinical Journal American Society of Nephrology*, *8*, 82-89.
 135. Mease, P. (2002). Tumor necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: Pathophysiology and treatment with TNF inhibitors. *Annals of the Rheumatic Diseases* (61), 298-304.
 136. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*, 428-435.
 137. Meert, N., Eloit, S., Waterloos, M., Van Landschoot, M., Dhondt, A., Glorieux, G., et al . (2009). Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *24*, 562-570.
 138. Memoli, B., Postiglione, L., Cianciaruso, B., Bisesti, V., Cimmaruta, C., & Marzano, L. (2000). Role of different dialysis membranes in the release of interleukin-6 soluble receptor in uremic patients. *Kidney International*, *58*, 417-424.
 139. Merino, A., Alvarez-Lara, M., Ramirez, R., Carracedo, J., Matin-Malo, A., & Aljama, P. (2012). Losartan prevents the development of the proinflammatory monocytes CD14+CD16+ in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *27*, 2907-2912.
 140. Merino, A., Buendía, P., Martín-Malo, A., Aljama, P., Ramírez, R., & Carracedo, J. (2011). Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *The Journal of Immunology*, *186*, 1809-1815.
 141. Merino, A., Nogueras, S., Buendía, P., Ojeda, R., Carracedo, J., Ramírez-Chamond, R., et al . (2008). Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. *Contributions to Nephrology*, *161*, 83-88.
 142. Merino, A., Nogueras, S., García-Maceira, T., Rodríguez, M., Martín-Malo, A., Ramírez, R., et al . (2008). Bacterial DNA and endothelial damage in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *23*, 3635-3642.
 143. Merino, A., Portolés, J., Selgas, R., Ojeda, R., Buendía, P., Ocaña, J., et al . (2010). Effect of different dialysis modalities on microinflammatory status and endothelial damage. *Clinical Journal American Society of Nephrology*, *5*, 227-234.
 144. Methé, H., & Weis, M. (2007). Atherogenesis and inflammation - was Virchow right? *Nephrology Dialysis Transplantation*, *22*, 1823-1827.
 145. Minutolo, R., Bellizzi, V., Cioffi, M., Iodice, C., Giannattasio, P., Andreucci, M., et al . (2002). Postdialytic rebound of serum phosphorus: pathogenetic and clinical insights. *Journal American Society of Nephrology*, *13*, 1046-1054.
 146. Miyata, T., Ishiguro, N., Yasuda, Y., Ito, T., Nangaku, M., & Iwata, H. (1998). Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *244*, 45-49.
 147. Morena, M., Delosc, S., Dupuy, A., Canaud, B., & Cristol, J. (2005). Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodialysis International*, *9*, 37-46.
 148. Morgera, S., Slowinski, T., Melzer, C., Sobottke, V., Vargas-Hein, O., Volk, T., et al . (2004). Renal replacement therapy with high-cutoff hemofilters: Impact of

- convection and diffusion on cytokine clearances and protein status. *American Journal of Kidney Diseases* , 43, 444-453.
149. Mueller, C., Wodack, K., Twelker, K., Werner, N., Custodis, F., & Nickenig, G. (2011). Darbepoetin improves endothelial function and increases circulating endothelial progenitor cell number in patients with coronary artery disease. *Heart* , 97, 1474-1478.
150. Nadra, I., Mason, J., Philippidis, P., Florey, O., Smythe, C., McCarthy, G., et al . (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* , 96, 1248-1256.
151. Nakanishi, I., Moutabarrak, A., Okada, N., Kitamura, E., Hayashi, A., Syouji, T., et al . (1994). Interleukin-8 in chronic failure and dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 9, 1434-1442.
152. Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* , 420, 846-852.
153. Navarro, M., Carracedo, J., Ramírez, R., Madueño, J., Merino, A., Rodríguez, M., et al . (2007). Bacterial DNA prolongs the survival of inflamed mononuclear cells in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 22, 3580-3585.
154. Nguyen-Khoa, T., Massy, Z., De Bandt, J., Kebede, M., Salama, L., & Lambrey, G. (2001). Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 16, 335-340.
155. Niebauer, J., Volk, H., Kemp, M., Dominguez, M., Schumann, R., & Rauchhaus, M. (1999). Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet* , 353, 1838-1842.
156. Niessner, A., Kaun, C., Zorn, G., Speidi, W., Turel, Z., Christiansen, G., et al . (2003). Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of Chlamydia pneumoniae induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear factor-kappa B pathway. *The Journal of Infectious Diseases* , 188, 108-113.
157. Nockher, W., & Scherberich, J. (1998). Expanded CD14+CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infection and Immunity* , 66, 2782-2790.
158. Nordfors, L., Heimbürger, O., Lonnqvist, F., Lindholm, B., Helmrich, J., & Schaling, M. (2000). Fat tissue accumulation during peritoneal dialysis is associated with a polymorphism in an uncoupling protein 2. *Kidney International* , 57, 1713-1719.
159. OK, E., Asci, G., Toz, H., Ok, E., Kircelli, F., Yilmaz, M., et al . (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* , 28, 192-202.
160. Olson, T., & Ley, K. (2002). Chemokines and chemokines receptors in leukocyte trafficking. *American Journal of Physiology* , 283, R7-R28.
161. Owen, W., & Lowrie, E. (1998). C-reactive protein as an outcome predictor for maintenance hemodialysis patients. *Kidney International* , 54, 627-636.

-
162. Palmer, S., Rabindranath, K., Craig, J., Roderick, P., Locatelli, F., & Strippoli, G. (2012). High-flux versus low-flux membranes for end-stage kidney disease (Review). *The Cochrane Library* , 9.
 163. Paniagua, R., Amato, D., Vonesh, E., Correa-Rotter, R., Ramos, A., Moran, J., et al . (2002). Effects of increased peritoneal clearances on mortality rates in peritoneal dialysis: ADEMEX, a prospective, randomized, controlled trial. *Journal American Society of Nephrology* , 13, 1307-1320.
 164. Panichi, V., Rizza, G., Paoletti, S., Bigazzi, R., Aloisi, M., Barsotti, G., et al . (2008). Chronic inflammation and mortality in haemodialysis: effect of different renal replacement therapies. Results from the RISCAVID study. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 23, 2337-2343.
 165. Papayianni, A., Alexopoulos, E., Giamalis, P., Gionanlis, L., Belechri, A., Koukoudis, P., et al . (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* , 17, 435-441.
 166. Park, C., Shin, Y., Kim, C., Lee, S., Yu, S., & Kim, S. (2002). Increased C-reactive protein following hemodialysis predicts cardiac hypertrophy in chronic hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases* , 240, 1230-1239.
 167. Passerini, A., Polacek, D., Chi, C., Francesco, N., Manduchi, E., & Grant, G. (2004). Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profile in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* , 101, 2482-2487.
 168. Passlick, B., Fliieger, D., & HW, Z.-H. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* , 74, 2527-2534.
 169. Pecoits-Filho, R., & Stenvinkel, P. (2006). Estado inflamatorio de los pacientes en hemodiálisis: causas y consecuencias. En R. Jofré, *Tratado de hemodiálisis* (págs. 605-617). Barcelona: Editorial médica JIMS.
 170. 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* , 17, 1684-1688.
 171. Pecoits-Filho, R., Heimbürger, O., Barany, P., Suliman, M., Fehrman-Ekholm, I., Lindholm, B., et al . (2003). Association between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *American Journal of Kidney Diseases* , 41, 1212-1218.
 172. Pecoits-Filho, R., Lindholm, B., & Stenvinkel, P. (2003). End-stage renal disease: a state of chronic inflammation and hyperleptinemia. *European Journal of Clinical Investigation* , 33, 527-528.
 173. Pedrini, L., & De Cristofaro, V. (2003). On-line mixed hemodiafiltration with a feedback for ultrafiltration control: effect on middle-molecule removal. *Kidney International* , 64, 1505-1513.
 174. Peichev, M., Naiyer, A., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W., Williams, M., et al . (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* , 95, 952-958.
 175. Pennica, D., Nedwin, G., Hayflick, J., Seeburg, P., Derynck, R., Palladino, M., et al . (1984). Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* , 312, 724-729.

176. Pereira, B., Shapiro, L., King, A., Falagas, M., Strom, J., & Dinarello, C. (1994). Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney International* , 45, 890-896.
177. Pérez, C., Albert, I., Defary, K., Zachariades, N., Gooding, L., & Kriegler, M. (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* , 63, 251-258.
178. Pericleous, C., Giles, I., & Rahman, A. (2009). Are endothelial microparticles potencial markers of vascular dysfunction in the antiphospholipid syndrome? *Lupus* , 18, 671-675.
179. Poole, S., Bird, T., Selkirk, S., Gaines-Das, R., Choudry, Y., & Stephenson, S. (1990). Fate of injected interleukin 1 in rats: sequestration and degradation in the kidney. *Cytokine* , 2, 416-422.
180. Rabelink, T., de Boer, H., de Koning, E., & van Zonneveld, A. (2004). Endothelial progenitor cells: more than an inflammatory response? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* , 24, 834-838.
181. Rabindranath, K., Strippoli, G., Roderick, P., et al. (2006). Haemodiafiltration, hemofiltration and hemodialysis for end stage kidney disease. *Cochrane Database* , 18, CD006258.
182. Ramírez, R., Carracedo, J., Berdud, I., Carretero, D., Merino, A., Rodríguez, M., et al . (2006). Microinflammation in hemodialysis is related to a preactivated subset of monocytes. *Hemodialysis international* , 10 (Supl. 1), S24-27.
183. Ramírez, R., Carracedo, J., Merino, A., Nogueras, S., Álvarez-Lara, M., Rodríguez, M., et al . (2007). Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney International* , 72, 108-113.
184. Ramírez, R., Carracedo, J., Soriano, S., Jiménez, R., Martín-Malo, A., Rodríguez, M., et al . (2005). Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis. *American Journal of Kidney Diseases* , 45, 353-359.
185. Ramírez, R., Martín-Malo, A., & Aljama, P. (2007). Inflammation and hemodiafiltration. *Contributions to Nephrology* , 58, 210-215.
186. Redondo, S., Santos-Gallego, C., & Tejerina, T. (2007). TGF-beta1: a novel target for cardiovascular pharmacology. *Cytokine Growth Factor Reviews* , 18, 279-286.
187. Rehman, J., Li, J., Orschell, C., & March, K. (2003). Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* , 107, 1164-1169.
188. Ridker, P., Hennekens, C., Roitman-Johnson, B., Stampfer, P., & Allen, J. (1998). Plasma concentrations of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risk of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* , 351, 88-92.
189. Ridker, P., Rifai, N., Rose, L., Buring, J., & Cook, N. (2002). Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *New England Journal of Medicine* , 347, 1557-1565.

-
190. Ridker, P., Rifai, N., Stampfer, M., & Hennekens, C. (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* , 101, 1767-1772.
191. Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* , 386, 671-674.
192. Roberts, M., Hare, D., Ratnaik, S., & Lerino, F. (2006). Cardiovascular biomarkers in CKD: pathophysiology and implications for clinical management of cardiac disease. *American Journal of Kidney Diseases* , 48, 341-360.
193. Rookmaaker, M., Vergeer, M., van Zonneveld, A., Rabelink, T., & Verhaar, M. (2003). Endothelial progenitor cells: mainly derived from the monocyte/macrophage-containing CD34- mononuclear cell population and only in part from the hematopoietic stem cell-containing CD34+ mononuclear cell population. *Circulation* , 108, 150.
194. Ross, R. (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* , 340, 115-126.
195. Sandkamp, M., Funke, H., Schulte, H., & Köhler E, A. G. (1990). Lipoprotein(a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age. *Clinical Chemistry* , 36, 20-23.
196. Santoro, A., Ferramosca, E., Mancini, E., Morani, C., Varasani, M., Sereni, L., et al . (2007). Reverse mid-dilution: new way to remove small and middle molecules as well as phosphate with high intrafilter convective clearance. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 22, 2000-2005.
197. Schindler, R., Boenisch, O., Fisher, C., & Frei, U. (2000). Effect of the hemodialysis membrane on the inflammatory reaction in vivo. *Clinical Nephrology* , 53, 452-459.
198. Schlitt, A., Heine, G., Blankenberg, S., et al. (2004). CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thrombosis and Haemostasis* , 92, 419-424.
199. Schmid, M., & Varner, J. (2009). Circulating endothelial progenitor cells. *Methods in Molecular Biology* , 467, 139-155.
200. 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* , Suppl. 78, S32-S36.
201. Sharma, R., Bolger, A., Li, W., Daviourous, P., Volk, H., Poole-Wilson, P., et al . (2003). Elevated circulating levels of inflammatory cytokines and bacterial endotoxin in adults with congenital heart disease. *American Journal of Cardiology* , 92, 188-193.
202. Shen, H., & al, e. (1993). Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood* , 81, 2767-2773.
203. Shi, Q., Wu, H., Sauvage, L., Durante, K., Patel, M., Wechezak, A., et al . (1990). Re-endothelialization of isolated segments of the canine carotid artery with reference to the possible role of the adventitial vasa vasorum. *Journal Vascular Surgery* , 12, 476-485.
204. Simper, D., Wang, S., Deb, A., Holmes, D., McGregor, C., Frantz, R., et al . (2003). Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with

- vasculopathy and endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. *Circulation* , 108, 143-149.
205. Singh, A., Szczech, L., Tang, K., Barnhart , H., Sapp, S., Wolfson, M., et al . (2006). Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *New England Journal of Medicine* , 355, 2085-2098.
206. Sinning, J., Losch, J., Walenta, K., Böhm, N. G., & Werner, N. (2011). Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *European Heart Journal* , 32, 2034-2041.
207. Smith, E., & Thompson, W. (1994). Fibrin as a factor in atherogenesis. *Thrombosis Research* , 73, 1-19.
208. Stenvinkel, P. (2001). Endothelial dysfunction and inflammation - is there a link? *Nephrology Dialysis Transplantation* , 16, 1968-1971.
209. Stenvinkel, P. (2003). Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. *Journal of Renal Nutrition* , 13, 144-148.
210. Stenvinkel, P. (2001). Malnutrition and chronic inflammation as risk factors for cardiovascular disease in chronic renal failure. *Blood Purification* , 19, 143-151.
211. Stenvinkel, P., Barany, P., Heimbürger, O., Pecoits-Filho, R., & Lindholm, B. (2002). Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of Interleukin-6? *Kidney International Supplement* , 80, 103-108.
212. Stenvinkel, P., Carrero, J., Axelsson, J., Lindholm, B., Heimbürger, O., & Massy, Z. (2008). Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: How do new pieces fit into the uremic Puzzle? *Clinical Journal American Society of Nephrology* , 3, 505-521.
213. Stenvinkel, P., Heimbürger, O., & Jogestrand, T. (2002). Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid atherosclerosis in dialysis patients: Association to chlamydia pneumoniae seropositivity. *American Journal of Kidney Diseases* , 39, 274-282.
214. Stenvinkel, P., Heimbürger, O., Paultre, F., Diczfalusy, U., Wang, T., & Berglund, L. (1999). Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney International* , 55, 1899-1911.
215. Stenvinkel, P., Ketteler, M., Johnson, R., Lindholm, B., Pecoits-Filho, R., Riella, M., et al . (2005). IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. *Kidney International* , 67, 1216-1233.
216. Stenvinkel, P., Lindholm, B., Heimbürger, M., & Heimbürger, O. (2000). Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in predialysis patients: association with malnutrition, inflammation and cardiovascular disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 15, 1624-1630.
217. Stenvinkel, P., Pecoits-Filho, R., & Lindholm, B. (2003). Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *Journal American Society of Nephrology* , 14, 1927-1939.
218. Suliman, M., Axelsson, J., Heimbürger, O., Quershi, A., Barany, P., & Pecoits-Filho, R. (2003). Relationship between circulating levels of interleukin-6 and fat mass in patients with end-stage renal disease. *Journal American Society of Nephrology* .
219. Suliman, M., Heimbürger, O., Barany, P., Anderstam, B., Pecoits-Filho, R., & Rodríguez Ayala, E. (2002). Plasma pentosidine is associated with inflammation and

-
- malnutrition in end-stage renal disease patients starting on dialysis therapy. *Journal American Society of Nephrology* , 14, 1614-1622.
220. Swaminathan, S., & Shah, S. (2011). Novel inflammatory mechanisms of accelerated atherosclerosis in kidney disease. *Kidney International* , 80, 453-463.
221. Sydow, K., & Münzel, T. (2003). ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis Supplements* , 4, 41-51.
222. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., et al . (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp 130. *Cell* , 58, 573-581.
223. Tattersall, J., & Ward, R. (2013). Online haemodiafiltration: definition, dose quantification and safety revisited. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 22, 542-550.
224. Tattersall, J., Martín-Malo, A., Pedrini, L., Basci, A., Canaud, B., Fouque, D., et al . (2007). EBPG guideline on dialysis strategies. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 22 (Suppl 2), ii5-ii21.
225. Tielemans, C., Husson, C., Schurmans, T., Gastaldello, K., Madhoun, P., & Delville, J. (1996). Effects of ultrapure and non-sterile dialysate on the inflammatory response during in vitro hemodialysis. *Kidney International* , 49, 236-243.
226. Tintut, Y., Patel, J., Parhami, F., & Demer, L. (2000). Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* , 102, 2636-2642.
227. Tintut, Y., Patel, J., Territo, M., Saini, T., Parhami, F., & Demer, L. (2002). Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro. *Circulation* , 105, 650-655.
228. Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D., Fröhlich, M., Koenig, W., & Waltenberger, J. (1998). C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima or early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* , 18, 1386-1392.
229. Ulrich, C., Heine, G., Gerhart, M., Köhler, H., & Girndt M. (2008). Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients. *American Journal of Transplantation* , 8, 103-110.
230. Ulrich, C., Seibert, E., Heine, G., Fliser, D., & Girndt, M. (2011). Monocyte angiotensin converting enzyme expression may be associated with atherosclerosis rather than arteriosclerosis in hemodialysis patients. *Clinical Journal American Society of Nephrology* , 6, 505-511.
231. Urbich, C., & Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation Research* , 95, 343-353.
232. Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., & Fiers, W. (1995). Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends in Cell Biology* , 5, 392-399.
233. Vanholder, R., De Smet, R., Glorieux, G., et al. (2003). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney International* , 63, 1934-1943.

234. VanWijk, M., VanBavel, E., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2003). Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* , 59, 277-287.
235. Vaslaki, L., Berta, K., Major, L., Webwe, V., Weber, C., Wojke, R., et al . (2005). On-line hemodiafiltration does not induce inflammatory response in end-stage renal disease patients: results from a multicenter cross-over study. *Artificial Organs* , 29, 406-412.
236. Vaslaki, L., Major, L., Berta, K., Karatson, A., Misz, M., Pethoe, F., et al . (2006). On-line haemodiafiltration versus haemodialysis: Stable haematocrit with less erythropoietin and improvement of other relevant blood parameters. *Blood Purification* , 24, 163-173.
237. Vaziri, N., Dicus, M., Ho, N., Boroujerdi-Rad, L., & Sindhu, R. (2003). Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney International* , 63, 179-185.
238. Vilar, E., Fry, A., Wellsted, D., et al . (2009). Long-term outcomes in online hemodiafiltration and high-flux hemodialysis: a comparative analysis. *Clinical Journal American Society of Nephrology* , 4, 1944-1953.
239. Villa-Bellosta, R., Bogaert, Y., Levi, M., & Sorribas, V. (2007). Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells. Implications for vascular calcification. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* , 27, 1030-1036.
240. Volger, O., Fledderus, J., Kisters, N., Fontijn, R., Moerland, P., Kuiper, J., et al . (2007). Distinctive expression of chemokines and transforming growth factor-beta signaling in human arterial endothelium during atherosclerosis. *American Journal Pathology* , 171, 326-337.
241. Wang, A., Wang, M., Woo, J., Law, M., Chow, K., & Li, P. (2002). A novel association between residual renal function and left ventricular hypertrophy in peritoneal dialysis patients. *Kidney International* , 62, 639-647.
242. Wang, A., Woo, J., Lam, C., Wang, M., Sea, M., & Lui, S. (2003). Is a single time point C-reactive protein predictive of outcome in peritoneal dialysis patients? *Journal American Society of Nephrology* , 14, 1871-1879.
243. Wang, A., Woo, J., Wang, M., Sea, M., Ip, P., & Li, P. (2001). Association of inflammation and malnutrition with cardiac valve calcification in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Journal American Society of Nephrology* , 12, 1927-1936.
244. Wang, C., Li, S., Weisel, R., Fedak, P. D., & Szmitko, P. (2003). C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* , 107, 1783-1790.
245. Wang, J., Huang, Y., Wang, Y., Xu, M., Wang, L., Wang, S., et al . (2007). Increased circulating CD31+/CD42- microparticles are associated with impaired systemic artery elasticity in healthy subjects. *American Journal of Hypertension* , 20, 957-964.
246. Wang, J., Wang, Y., Huang, J., Yang, Z., Chen, L., Wang, L., et al . (2007). C-Reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH4-dependent NO formation. *Journal of Vascular Research* , 44, 241-248.

-
247. Wanner, C., Krane, V., Marz, W., Olschewski, M., Mann, J., Ruf, G., et al . (2005). Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *New England Journal of Medicine* , 353, 238-248.
248. Ward, R., Schmidt, B., Hullin, J., et al . (2000). A comparison of on-line hemodiafiltration and high-flux hemodialysis: a prospective clinical study. *Journal American Society of Nephrology* , 11, 2344-2350.
249. Werner, N., Wassmann, S., Ahlers, P., Kosiol, S., & Nickenig, G. (2006). Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* , 26, 112-116.
250. Wojakowski, W., Landmesser, U., Bachowski, R., Jadczyk, T., & Tendera, M. (2012). Mobilization of stem and progenitor cells in cardiovascular diseases. *Leukemia* , 26, 23-33.
251. Wu, H., Chen, H., & Hu, P. (2007). Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as surrogate biomarkers in vascular dysfunction. *Clinical Laboratory* , 53, 285-295.
252. Yeun, J., Levine, R., Mantadilok, V., & Kaysen, G. (2000). C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases* , 35, 469-476.
253. Zannad, F., Kessler, M., Lehert, P., Grünfeld, J., Thuilliez, C., Leizorovicz, A., et al . (2006). Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: Results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney International* , 70, 1318-1324.
254. Zhang, D., & Gutterman, D. (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology* , 292, H2023-2031.
255. Zoccali, C. (2006). Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: an epidemiologic perspective. *Kidney International* , 70, 26-33.
256. Zoccali, C., Benedetto, F., Mallamaci, F., Tripepi, G., Fermo, I., & Foca, A. (2000). Inflammation is associated with carotid atherosclerosis in dialysis patients. Creed Investigators. Cardiovascular Risk Extended Evaluation in Dialysis Patients. *Journal Hypertension* , 18, 1207-1213.
257. Zoccali, C., Mallamaci, F., Tripepi, G., Parlongo, S., Cultrupi, S., Benedetto, F., et al . (2003). Chlamydia Pneumoniae, overall and cardiovascular mortality in end-stage renal disease (ESRD). *Kidney International* , 64, 579-584.
258. Zuckerman, S., & O'Neal, L. (1994). Endotoxin and GM-CSF-mediated down-regulation of macrophage apo E secretion is inhibited by a TNF-specific monoclonal antibody. *Journal of Leukocyte Biology* , 55, 743-748.
259. Zwaka, P., Hombach, V., & Torzewski, J. (2001). C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages. *Circulation* , 103, 1194-1202.

