

El agua reducida en electrolizado redujo el deterioro eritrocitario inducido por hemodiálisis en pacientes con enfermedad renal terminal

K-C Huang^{1,8}, C-C Yang^{2,3,8}, S-P Hsu⁴, K-T Lee⁵, H-W Liu^{5,6}, S Morisawa⁷, K Otsubo⁷ y C-T Chien⁴

¹ Departamento de Medicina Familiar, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Taiwán y Hospital Universitario Nacional de Taiwán, Taipei,

Taiwán; ²Taipei City United Heping Hospital, Taipei, Taiwán; ³Departamento de Medicina Interna, Universidad Nacional Yang-Ming, Taipei, Taiwán; ⁴Departamento de Investigación Médica, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Taiwán y Hospital Universitario Nacional de Taiwán,

Taipei, Taiwán; ⁵Wan-Hwa Regional Hospital, Taipei, Taiwán; ⁶Departamento de Ingeniería de Polímeros, Universidad Nacional de Taiwán

Ciencia y Tecnología, Taipei, Taiwán y ⁷Nihon Trim Co., Ltd, Osaka, Japón

Los pacientes en hemodiálisis crónica (HD) aumentan la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemólisis y perjudican la supervivencia celular. Se exploró si el agua reducida en electrolitos (REG) podría paliar el deterioro de los eritrocitos evocado por la EH y la anemia. Cuarenta y tres pacientes sometidos a EH crónica se inscribieron y recibieron la administración de REG durante 6 meses. Se evaluó el estrés oxidativo en sangre y plasma, la actividad de la metahemoglobina eritrocitaria (metHb)/ferricianuro reductasa, la metHb plasmática y las citocinas proinflamatorias en los pacientes crónicos en HD sin tratamiento (n1/4 15) o con vitamina C

(VC)- (n1/4 15), dializador recubierto de vitamina E (VE) (n1/4 15) o tratamiento con REG (n1/4 15) durante un curso de HD. Los pacientes mostraron aumentos marcados (15 veces) en las especies de oxígeno reactivo a la sangre, principalmente H_2O_2 , después de HD sin ningún tratamiento. HD resultó en una disminución de VC plasmática, estado antioxidante total y actividad de metHb / ferricianuro reductasa de eritrocitos y aumento de los niveles eritrocitarios de hidróperóxido de fosfatidilcolina (PCOOH) y metHb plasmático. El tratamiento con antioxidantes palió significativamente el estrés oxidativo inducido por un solo curso de HD, el PCOOH plasmático y de glóbulos rojos, y los niveles plasmáticos de metHb y metHb en plasma, y preservó la actividad de metHb / ferricianuro reductasa en un dializador recubierto de orden VC 4ERW4VE. Sin embargo, los REG no tuvieron efectos secundarios de la acumulación de oxalato fácilmente inducida por VC. El tratamiento con REG a seis meses aumentó el hematocrito y atenuó el perfil de citocinas proinflamatorias en los pacientes con EH. En conclusión, la administración del tratamiento con REG es eficaz para paliar el estrés oxidativo evocado por la EH, como lo indica la peroxidación lipídica, la hemólisis y la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias en pacientes con EH.

Kidney International (2006) 70, 391–398. doi:10.1038/sj.ki.5001576; publicado en Internet el 7 de junio de 2006

Correspondencia: C-T Chien, Departamento de Investigación Médica, Hospital Universitario Nacional de Taiwán, 7 Chung-Shan S Road, Taipei, Taiwán. Correo electrónico: ctchien@ha.mc.ntu.edu.tw

⁸Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo

Recibida el 25 de septiembre de 2005; revisada el 8 de diciembre de 2005; aceptado el 3 de enero de 2006; publicado en Internet el 7 de junio de 2006

PALABRAS LLAVE: hemodiálisis; hemólisis; estrés oxidativo; Agua reducida electrolizada

En pacientes sometidos a hemodiálisis (HD), la interacción de la sangre con materiales no biológicos del circuito extracorpóreo puede activar leucocitos polimorfonucleares para producir cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS), que perjudican los tejidos/células vecinas (incluidos los glóbulos rojos) y evocan una respuesta inflamatoria.^{1–4} Los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias (p. ej., interleucina (IL)-1, IL-6, factor de necrosis tumoral- α y proteína C reactiva) están significativamente elevados en pacientes urémicos en diálisis^{3,5} y la expresión puede aumentarse aún más incluso después de una sola sesión de HD.^{3,6} El aumento del estrés oxidativo y las citoquinas proinflamatorias en pacientes con EH están relacionados con la desnutrición⁷, la resistencia al tratamiento con eritropoyetina⁸, los eventos cardiovasculares^{9,10} y la alta mortalidad.¹¹

Cada vez hay más pruebas de que el estrés oxidativo desempeña un papel clave en la génesis y la gravedad de la anemia por diálisis.^{12–14} Reduce la supervivencia de los eritrocitos¹⁵, deteriora el efecto de la eritropoyetina^{16,17} y

aumenta la susceptibilidad a la hemólisis debido a estímulos inflamatorios, infecciosos y mecánicos.^{13,18} Durante el proceso de estrés oxidativo, los glóbulos rojos están sujetos a la peroxidación lipídica de la membrana y son susceptibles a la destrucción.^{19–21} El aumento de ROS puede oxidar la oxihemoglobina para producir H_2O_2 y metahemoglobina (metHb)^{22,23} que, a su vez, conduce a hipoxia tisular,²⁴ detención de células endoteliales G₂/M y apoptosis.²⁵ Aumento de la expresión de H₂O₂ reprimida de metHb reductasa en células HeLa;²⁶ La deficiencia de la enzima, un rasgo autosómico recesivo, resulta en metahemoglobinemia hereditaria (hemólisis).²⁷ Un sistema de transporte de electrones de membrana transplasmática (por ejemplo, nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)-ferricianuro reductasa y NADH-metHb reductasa) está presente en las membranas de glóbulos rojos y desempeña un papel para reducir el ferricianuro/metHb citotóxico a ferrocianuro/oxihemoglobina funcional.^{28,29} El dializador intravenoso recubierto de vitamina C (VC) o vitamina E (EV) puede mejorar la peroxidación lipídica de eritrocitos y la hemólisis potenciadas por la EH mediante la preservación de NADH-ferricianuro reductasa y NADH-metHb reductasa.⁴

El agua reducida en electrolitos (REG) obtenida por electrólisis elimina O_2K , H_2O_2 y $HOCl$,³⁰ y protege el ADN del daño oxidativo.³⁰ El mecanismo de protección de los REG resulta del hidrógeno atómico activo con alta capacidad reductora, que puede contribuir a la actividad de eliminación de ROS, y puede participar en la regulación redox de la función celular.³⁰ El hidrógeno activo en los REG puede ser un eliminador ideal contra las ROS porque no produce moléculas oxidadas después de la reducción como otros antioxidantes orgánicos (VC, VE y polifenoles).³¹ Nuestros datos anteriores informaron que la administración de REG disminuyó la actividad de H_2O_2 y $HOCl$ mejorada con HD, minimizó los marcadores ateroscleróticos, oxidados e inflamatorios, y restauró parcialmente el estado antioxidante total (TAS) durante el tratamiento de 1 mes.³ En este estudio, se utilizaron 6 meses de sesión de HD en este estudio como sistema *in vivo* para evaluar los efectos de los REG en el estrés oxidativo inducido por diálisis según lo indicado por la peroxidación lipídica de eritrocitos, la actividad de la eritrocitos reductasa y los niveles de metHb (hemólisis).

También se examinó el resultado a largo plazo de los REG en los perfiles de hematocrito, dosis de eritropoyetina y citocinas proinflamatorias en pacientes con enfermedad renal terminal (ERT).

RESULTADOS

Formación de ROS mejorada por EG reducida en la EH Se observó un aumento promedio de 15 veces en la actividad de ROS en sangre en pacientes que se sometieron a HD sin tratamiento

con REG. El reemplazo de los REG podría suprimir eficazmente la formación de ROS en un 75714% en pacientes con EH (Figura 1a). El dializador recubierto con VC o VE inhibió las ROS mejoradas con HD en 83711 o 49 79%.

Las muestras de sangre post-HD obtenidas del grupo se utilizaron para examinar los efectos de varios antioxidantes. Los recuentos sanguíneos aumentados de ROS fueron inhibidos en gran medida por un eliminador de H_2O_2 , catalasa (en un 68–78%), y parcialmente deprimidos por la superóxido dismutasa (14–75%) y la epigallocatequina-3-galato (1675%) (Figura 1b), lo que indica que la mayor parte de la actividad de ROS en sangre se derivó de H_2O_2 . Los REG deprimieron la actividad de ROS entre un 60 y un 78%.

TAS plasmático reducido en HD preservado en REG

En el grupo XERW, los niveles plasmáticos de VC y TAS post-HD disminuyeron significativamente (Figura 2). Esto indica que la EH puede causar estrés oxidativo agudo y pérdida aguda de VC plasmática. En el grupo de VC, la VC intravenosa aumentó significativamente ($P<0,05$) los niveles plasmáticos de VC y TAS en pacientes con ESRD que recibieron HD. Los pacientes en los que se utilizó el dializador recubierto con VE no parecían haber restaurado los niveles plasmáticos de VC y TAS. El tratamiento con REG podría restaurar los niveles plasmáticos de VC y TAS. En los cuatro grupos, no hubo cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de EV y oxalato. Sin embargo, se encontró una mayor tendencia de la concentración de oxalato en el grupo de VC, lo que sugiere un posible efecto secundario adverso de VC intravenoso a largo plazo.

Los REG disminuyeron las ROS y PCOOH mejoradas con HD en el plasma y la membrana de glóbulos rojos

En nuestros estudios previos,^{3,4} una sola sesión de HD no afectó a los niveles de perfiles lipídicos en los pacientes con ERT. El nivel basal de hidroperóxido de fosfatidilcolina plasmática (PCOOH) pre-HD y PCOOH de membrana eritrocitaria fue similar entre los cuatro grupos de pacientes. Sin embargo, en el grupo XERW, los niveles plasmáticos de PCOOH post-HD (205 724 pmol/ml) y PCOOH de membrana eritrocitaria post-HD (310 739 pmol/ml) aumentaron significativamente ($P<0,05$) después de HD (Figura 3). La VC intravenosa previno significativamente ($P<0,05$) los aumentos en la PCOOH plasmática post-HD (1107 15 pmol/ml) y en los niveles de PCOOH de membrana RBC post-HD (168 725 pmol/ml). En el grupo VE, el dializador recubierto con EV también disminuyó el aumento en el nivel de PCOOH plasmático post-HD (145721 pmol/ml, $P<0,05$). Por otro lado, el dializador VEcoated también previno el aumento de los niveles de PCOOH de membrana RBC post-HD (178729 pmol/ml, $P<0,05$). En el grupo de REG, el tratamiento con REG redujo significativamente el tratamiento después de la

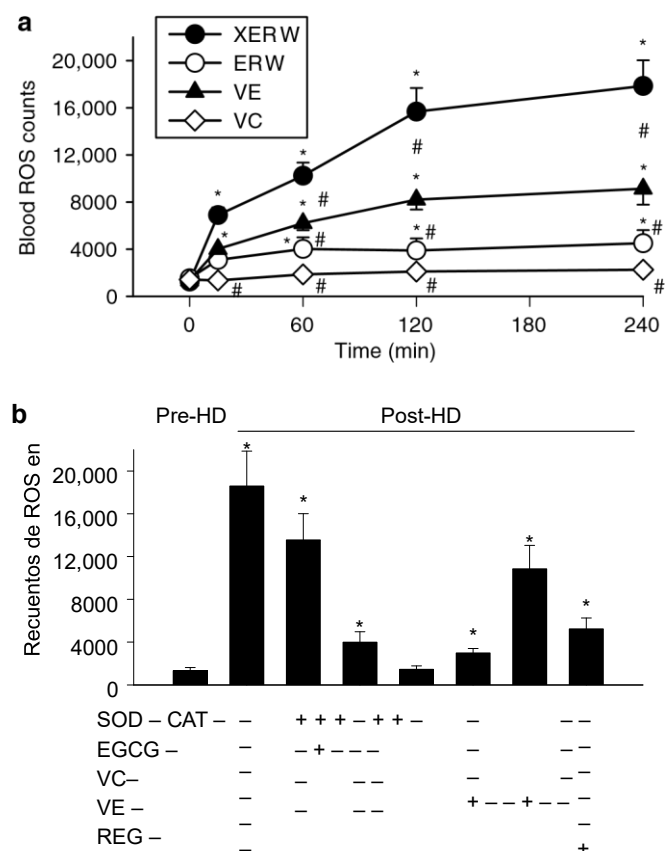


Figura 1 | a) En la formación paliante de ROS en sangre activada por HD, se aclaran los efectos de la VC intravenosa, un dializador recubierto de VE y REG. (b) Se muestran para la comparación los efectos de la superóxido dismutasa, catalasa (CAT), epigallocatequina-3-galato (EGCG), VC, VE o REG sobre la actividad de ROS sanguíneas post-HD mejorada in vitro. Grupo VC (n 1/4 15), pacientes en HD con VC intravenosa; Grupo EV (n 1/4 15), pacientes en HD con dializador recubierto de EV; Grupo REG (n 1/4 15), pacientes en HD con tratamiento con REG; y grupo XERW (n 1/4 15), pacientes en HD sin VC, dializador recubierto de EV o tratamiento con REG. Pre-HD 1/4 antes de una sesión de HD; post-HD 1/4 después de la sesión de HD (corregido por hemoconcentración). *Po0.05 vs valor pre-HD; *Po0.05 vs grupo XERW.

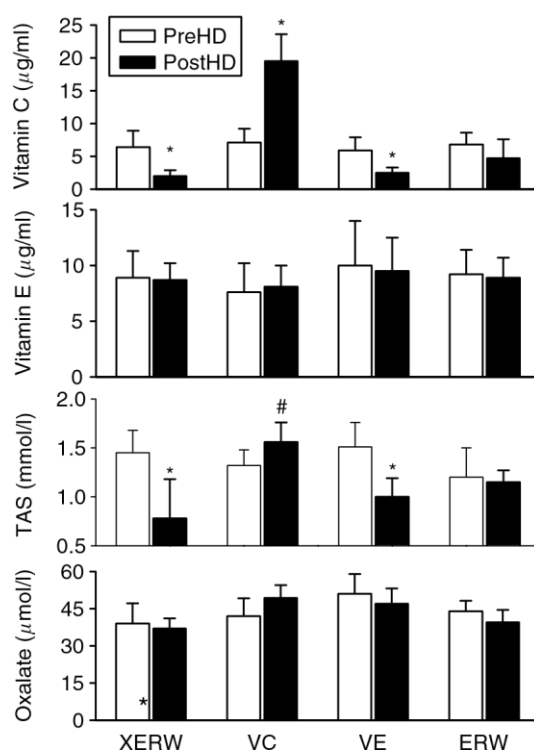


Figura 2 | Efectos de la infusión intravenosa de VC, VE-coated dializador VE o ERW sobre los niveles plasmáticos de VC, EV, TAS y oxalato plasmático (oxalato) durante una sesión de hemodiálisis. Grupo VC (n 1/4 15), pacientes en HD con VC intravenosa; Grupo EV (n 1/4 15), pacientes en HD con dializador recubierto de EV; Grupo REG (n 1/4 15), pacientes en HD con tratamiento con REG; y grupo XERW (n 1/4 15), pacientes en HD sin VC, dializador recubierto de EV o tratamiento con REG. Pre-HD 1/4 antes de una sesión de HD; post-HD 1/4 después de la sesión de HD (corregido por hemoconcentración). *Po0.05 vs valor pre-HD; *Po0.05 vs grupo XERW.

Niveles plasmáticos de PCOOH HD (134718 pmol/ml, Po0.05) y niveles de PCOOH de membrana RBC postHD (163719 pmol/ml), Po0.05).

Los REG reducen la formación de methHb activada por la EH. Una sola sesión de HD inhibió las actividades de la NADHmetHb reductasa y la NADH-ferricianuro reductasa en eritrocitos, y aumentó los niveles plasmáticos de methHb (Figura 4). El tratamiento intravenoso con VC, EV o REG preservó significativamente las actividades de la ferricianuro reductasa eritrocitaria y la methHb reductasa de eritrocitos, y disminuyó el nivel de methHb aumentada con HD. Estos hallazgos implican que el tratamiento con REG fue eficaz para prevenir el estrés oxidativo en los eritrocitos.

Efecto a largo plazo de los REG sobre el estrés oxidativo inducido por la EH y los marcadores inflamatorios

Para determinar los efectos a largo plazo de los REG en los pacientes con ERT sometidos a HD crónica, registramos las ROS sanguíneas post-HD, los niveles post-HD de las actividades de NADH-metHb reductasa y NADH-ferricianuro reductasa en la membrana de los eritrocitos, y el nivel plasmático de metHb post-HD en el REG-

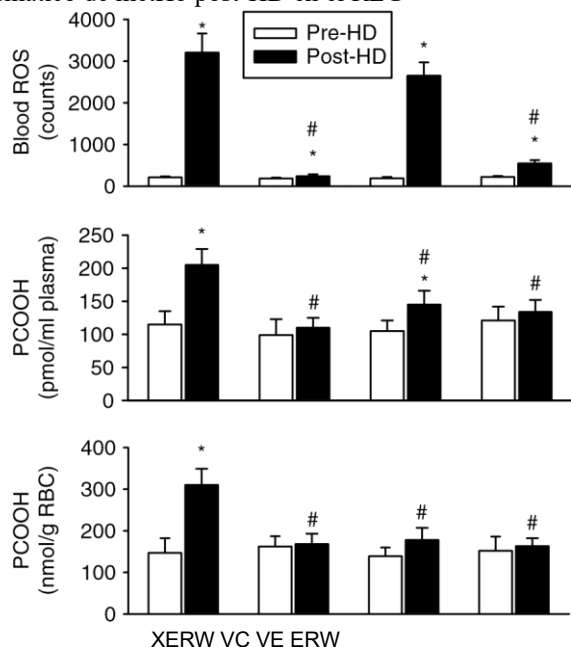


Figura 3 | Se muestran los valores medios de los recuentos de H₂O₂-luminol en sangre pre/post-HD y el nivel de PCOOH en plasma y en membrana de glóbulos rojos. Grupo VC (n 1/4 15), pacientes en HD con VC intravenosa; Grupo EV (n 1/4 15), pacientes en HD con dializador recubierto de EV; Grupo REG (n 1/4 15), pacientes en HD con dializado de REG; y grupo XERW (n 1/4 15), pacientes en HD sin VC, dializador recubierto de EV o tratamiento con REG. Pre-HD 1/4 antes de una sesión de HD; post-HD 1/4 después de la sesión HD (corregido por hemoconcentración). *Po0.05 vs valor pre-HD; #Po0.05 vs grupo XERW.

y pacientes tratados con XERW durante 6 meses. Como se muestra en la Figura 5, después de 6 meses de tratamiento con REG en los pacientes con ERT crónica en HD, el aumento de ROS sanguínea post-HD disminuyó (*Po0.05*) en comparación con el grupo XERW, mientras que los niveles post-HD de actividades de NADH-metHb reductasa y NADH-ferricianuro reductasa aumentaron (*Po0.05*) en comparación con el grupo XERW. El nivel plasmático de metHb post-HD también disminuyó significativamente (*Po0.05*) en el grupo de REG en comparación con el grupo XERW. El resultado a largo plazo mostró que el tratamiento con REG a 6 meses aumentó significativamente el hematocrito (de 28,970,7 a 31,570,6%) a una dosis similar de administración de eritropoyetina en los 43 pacientes con EH crónica (Figura 6). Sin embargo, las diferencias del cambio hematocrito no fueron

estadísticamente significativas en el grupo XERW (de 31,0 71,0 a 30,7 7 0,4%) incluso a una dosis similar de eritropoyetina. Además, después de 6 meses de tratamiento con REG, 26 citocinas plasmáticas críticas para la respuesta inflamatoria también se regulan a la baja (Figura 7).

DISCUSIÓN

Nuestro estudio indica que la HD activó leucocitos polimorfonucleares y monocitos para liberar ROS, principalmente H₂O₂, y se acompañó de eventos adversos en pacientes con ESRD, incluyendo (1) aumento de la cantidad de ROS en la sangre;

(2) peroxidación de lípidos plasmáticos y lípidos de membrana de glóbulos rojos;

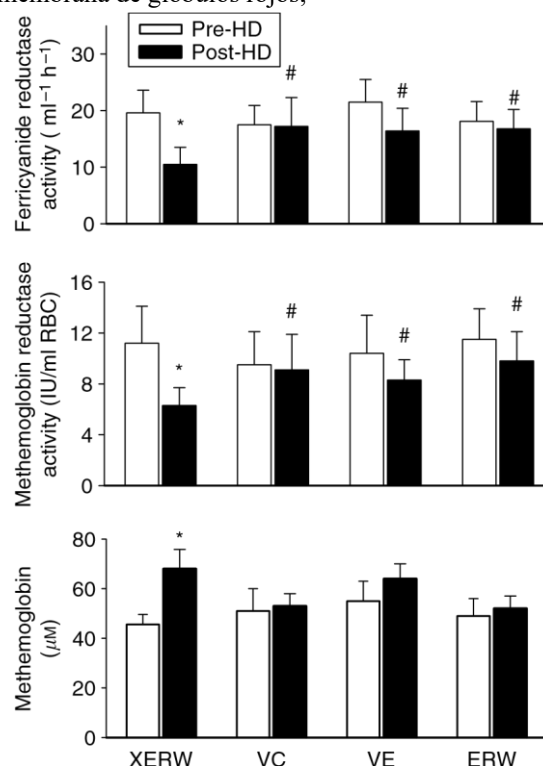
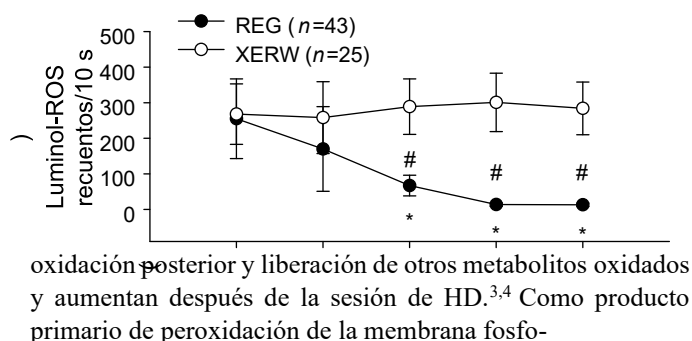


Figura 4 | Efectos de la infusión intravenosa de VC, dializador recubierto de EV o tratamiento con REG sobre la actividad de la ferricianuro reductasa eritrocitaria afectada por la HD, la actividad de la metHb reductasa y el nivel plasmático de metHb. Grupo VC (n 1/4 15), pacientes en HD con VC intravenosa; Grupo EV (n 1/4 15), pacientes en HD con dializador recubierto de EV; Grupo REG (n 1/4 15), pacientes en HD con tratamiento con dializado de REG; y grupo XERW (n 1/4 15), pacientes en HD sin VC, dializador recubierto de EV o tratamiento con REG. Pre-HD 1/4 antes de una sesión de HD; post-HD 1/4 después de la sesión de HD (corregido por hemoconcentración). *Po0.05 vs valor pre-HD; #Po0.05 vs grupo XERW.

(3) Inhibición de la actividad de las reductasas eritrocitarias, lo que lleva a la hemólisis. La aplicación de REG puede disminuir la producción de ROS en sangre mejorada por

la EH, la peroxidación lipídica de glóbulos rojos y la hemólisis a través de la preservación de la actividad de la NADH-ferricianuro reductasa y la -metHb reductasa. Este resultado beneficioso a largo plazo del tratamiento con REG de 6 meses puede mejorar el hematocrito sin el aumento de la dosis de eritropoyetina.

El estrés oxidativo asociado con la uremia se ve exacerbado por la hemodiálisis, ya que los neutrófilos y monocitos, activados por el contacto con las membranas de diálisis, liberan grandes cantidades de ROS.¹⁻⁴ Los efectos nocivos de las ROS sobre los carbohidratos, lípidos y proteínas tienen un papel patológico en muchas enfermedades inflamatorias, la mayoría de las cuales son frecuentes en pacientes con EH.^{5,12} En particular, la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados sobre la membrana de los glóbulos rojos^{3,4,12} aumenta la rigidez de los glóbulos rojos y reduce su deformabilidad^{32,33}, lo que conduce a una mayor susceptibilidad a la hemólisis⁴ y a una menor supervivencia.¹⁵ Las ROS pueden causar



oxidación posterior y liberación de otros metabolitos oxidados y aumentan después de la sesión de HD.^{3,4} Como producto primario de peroxidación de la membrana fosfo-

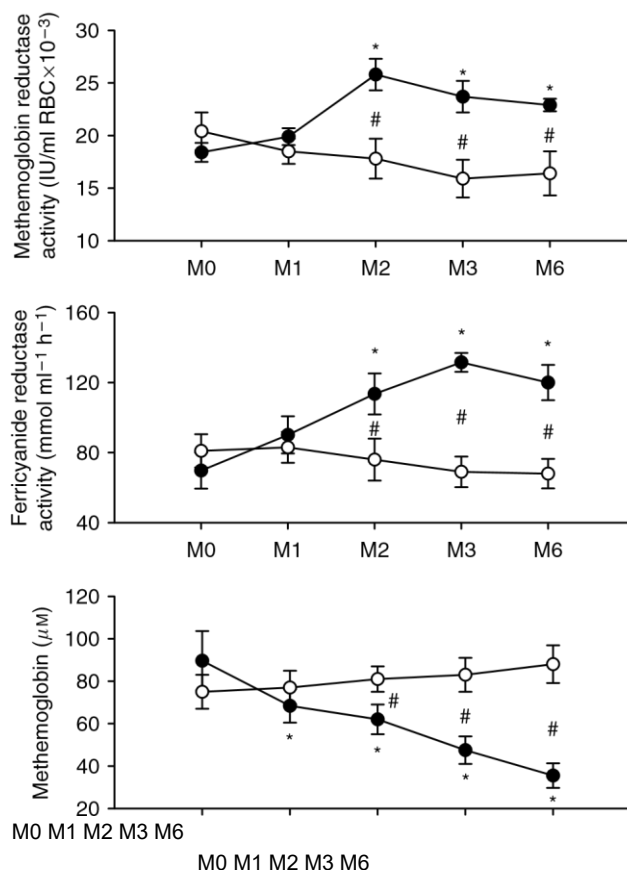


Figura 5 | Efectos del tratamiento con REG de 6 meses sobre la actividad de la ferricianuro reductasa de eritrocitos afectada después de la HD, la actividad de la metHb reductasa y el nivel plasmático de metHb en 43 pacientes con ESRD. Veinticinco pacientes con ESRD sin tratamiento con REG (XERW) se utilizaron como grupo control. M0, antes del tratamiento de los REG; M1, tratamiento con REG durante 1 mes; M2, tratamiento con REG durante 2 meses; M3, tratamiento con REG durante 3 meses; y M6, tratamiento de REG durante 6 meses. *Valor $P < 0.05$ vs M0. lípidos, el nivel de PCOOH en el plasma y la membrana de eritrocitos aumentó por HD.^{3,4} Además, los aumentos significativos de metHb y la disminución de la actividad de dos reductasas de glóbulos rojos (NADH-ferricianuro reductasa y -metHb reductasa) en plasma post-HD y eritrocitos implican un daño potencial de glóbulos rojos secundario a la peroxidación lipídica. La oxihemoglobina humana reacciona con $\text{Fe(II)(CN)}_{5\text{H}_2\text{O}_3}$ para producir H_2O_2 y metHb.²² Además, la producción de metHb puede acelerarse en H_2O_2 .³⁴ En nuestro estudio anterior, la formación de H_2O_2 desencadenada por la EH se correlacionó positivamente con el grado de hemólisis y con los niveles de metHb.⁴

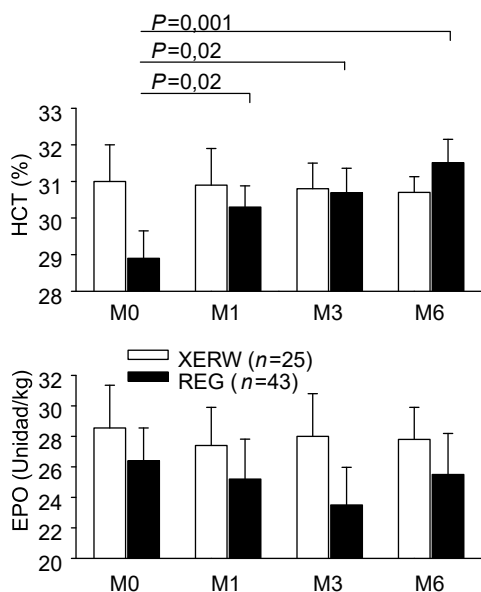


Figura 6 | Efectos del tratamiento con REG de 6 meses sobre la dosis de hematocrito (Hct) y eritropoyetina (EPO) afectados por la EH en 43 pacientes con ESRD. Veinticinco pacientes con ESRD sin tratamiento con REG (XERW) se utilizaron en el grupo control. M0, antes del tratamiento de los REG; M1, tratamiento con REG durante 1 mes; M3, tratamiento con REG durante 3 meses; y M6, tratamiento de REG durante 6 meses.

Basándose en la interesante mejora clínica de una variedad de enfermedades por la ingesta de agua reducida desde 1985, Hayashi 35 propuso la hipótesis 'Teoría de la Regulación del Agua'. El eliminador ideal para ROS debe ser el hidrógeno atómico activo. El hidrógeno atómico activo puede producirse en REG cerca del cátodo durante la electrólisis del agua. Los REG exhiben un pH alto, oxígeno disuelto bajo, hidrógeno molecular disuelto extremadamente alto y valores de potencial redox extremadamente negativos.³⁰ Shirahata *et al.*³⁰ sugieren que la actividad similar a la superóxido dismutasa y catalasa de los REG no se debe al hidrógeno molecular disuelto sino al hidrógeno atómico activo con una mayor capacidad reductora que puede participar en la actividad de eliminación de ROS. Happe *et al.*³⁶ indican que las hidrogenasas, que se encuentran entre las enzimas más antiguas (3,8 mil millones de años), pueden dividir reversiblemente el hidrógeno molecular para producir hidrógeno atómico activo, que participa en la regulación redox de la función celular. La actividad de eliminación de ROS de los REG es estable a 41°C durante más de un mes y no se perdió incluso después de la neutralización, la congelación y fusión repetidas, la deflación con sonicación, la mezcla vigorosa, la ebullición, la filtración repetida o el autoclave cerrado, sino que se perdió por autoclave abierto o por autoclave cerrado en presencia de trióxido de tungsteno que adsorbe eficientemente el hidrógeno atómico activo.³⁰ El hidrógeno activo en los REG también puede ser un eliminador ideal contra las ROS porque no produce moléculas oxidadas después de la reducción como otros antioxidantes orgánicos

(VC, VE y polifenoles).^{3,31} REG, VC y catequinas eliminaron completamente el O_{2K} producido por el sistema hipoxantina-xantina oxidasa en tampón fosfato de sodio.³⁰ Además, los REG, la catalasa y el VC podían eliminar directamente

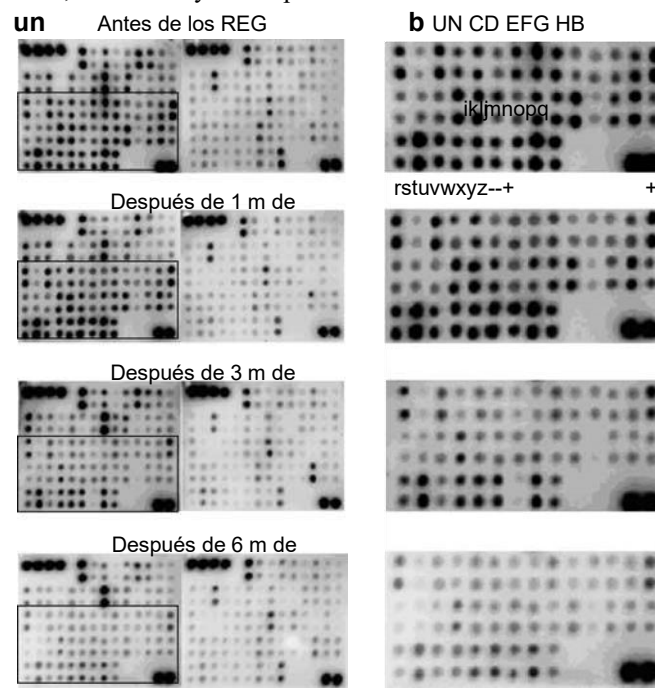


Figura 7 | Determinación de la determinación de múltiples citocinas mediante matriz de anticuerpos contra citoquinas en el plasma pre-HD de un paciente con ESRD antes y durante el tratamiento con REG de 6 meses. (a) Se muestran los perfiles de citoquinas plasmáticas pre-HD y (b) diagrama de puntos amplificados de citoquinas antes, después de 1 mes (1 M), 3 meses (3 M) y 6 meses (6 M) de tratamiento con REG. Obsérvese que el tratamiento con REG redujo significativamente la intensidad de puntos de las citoquinas proinflamatorias (a-z) después de 6 M de tratamiento con REG. a: factor de crecimiento de insulina-1; b, IL-13; c, IL-15; d, IL-16; e, IL-1 b; f: IL-1ra; g, IL-2; h: IL-6; i: proteína 2 del cofactor de membrana; j: proteína 3 del cofactor de membrana; k: proteína 4 del cofactor de membrana; l: factor estimulante de colonias de macrófagos; m, MDC; n, MIG; o: proteína inflamatoria de macrófagos-1d; p, NAP-2; q, NT-3; r: factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB; s, RANTES; t: factor de células madre; u, SDF-1; v, TARC; w: factor de crecimiento tumoral-b1; x, factor de crecimiento tumoral-b3; y, factor de necrosis tumoral-a; z, factor de necrosis tumoral-b; , punto negativo; p , punto positivo.

H₂O₂.^{3,30} Encontramos que los REG y la epigallocatequina-3-galato pueden eliminar tanto el H₂O₂ como el HOCl, pero el VC solo elimina el H₂O₂. El mecanismo de eliminación de ROS por REG puede deberse a la adsorción directa de ROS por hidrógeno atómico activo, porque no se detectó producción de antioxidantes por ensayo TAS en nuestro experimento anterior 3 y en el presente. Además, a pesar de la presencia de REG, nuestro informe anterior mostró un aumento significativo de la PCOOH plasmática y una disminución de la TAS de antes a después de la diálisis en los pacientes con ERT, mientras que el presente estudio no mostró diferencias en la PCOOH y la TAS de antes

a después de la diálisis en los pacientes con ESRD. Esta discrepancia puede deberse a un control de la dieta en el presente estudio, porque un factor dietético aumentó los niveles de triglicéridos plasmáticos y lipoproteínas de muy baja densidad, lo que podría conducir a un aumento en el nivel de PCOOH y una reducción en el TAS desde antes hasta después de la diálisis incluso en presencia de REG en nuestro estudio anterior.³ Este resultado indica que los REG con una mayor capacidad reductora y/o actividad directa de eliminación de ROS podrían utilizarse en pacientes con EH por sus características estables, gastos más baratos y fuerte actividad antioxidante para aliviar el estrés oxidativo evocado por la EH, preservar la actividad de las reductasas de eritrocitos y aumentar el hematocrito durante seis meses de tratamiento. Además, es bien sabido que las sobredosis de VC o el uso a largo plazo pueden causar oxalosis secundaria a través de un aumento en los niveles plasmáticos de oxalato y la deposición de oxalato de calcio en varios tejidos.^{4,37} Por lo tanto, la aplicación del tratamiento con REG podría prevenir el aumento del nivel plasmático de oxalato durante una sola sesión de HD o después de un tratamiento de seis meses.

Los pacientes con ERT en HD de mantenimiento muestran inflamación sistémica debido a uremia y diálisis y sufren eventos cardiovasculares⁷⁻¹¹ y anemia severa.³⁸ La hemólisis aumentada en la EH se ha propuesto como un factor significativo con respecto a la supervivencia globular acortada relacionada con la EH.^{La} suplementación con 28 EV para pacientes con EH dio lugar a una reducción de los requisitos de dosis de eritropoyetina.¹⁶ pacientes con EH con niveles estables de hemoglobina y que no recibieron tratamiento con eritropoyetina mostraron una mayor actividad de eliminación de OH en comparación con aquellos que necesitaban eritropoyetina:³⁹ se puede argumentar que los incrementos asociados a la eritropoyetina o anemia en la carga oxidante pueden ser contrarrestados por un mayor consumo de antioxidantes como VC. Tarng *et al.*⁴⁰ informó que se encontró que la dosis de eritropoyetina, así como la proporción de eritropoyetina/hemoglobina, se correlacionaban positivamente con las concentraciones séricas de 8-hidroxi-2'-O-desoxiguanosina, un producto de oxidación del ADN. VC influyó en la síntesis renal de eritropoyetina en los riñones, y la producción de eritropoyetina se incrementó en presencia de cóctel antioxidante que comprende vitaminas A, E y C. Además, los prooxidantes redujeron la síntesis de eritropoyetina en las células de hepatoma humano.⁴¹

Nuestros datos mostraron que 6 meses de tratamiento con REG antioxidantes aumentaron significativamente el hematocrito pero no aumentaron la dosis de eritropoyetina en los 43 pacientes con ESRD. Los antioxidantes como la EV y los medicamentos antiinflamatorios pueden atenuar los eventos cardiovasculares crónicos evocados por la EH y la apoptosis de neutrófilos y células endoteliales.⁴¹⁻⁴⁴ Los resultados actuales mostraron que 26 citocinas

proinflamatorias se regulan a la baja después de 6 meses de tratamiento con REG. Estos hallazgos proporcionan una nueva visión de los eventos moleculares que resuelven la anemia y la inflamación en pacientes crónicos con EH mediante el tratamiento de REG. Es necesario determinar un nuevo estudio para aclarar los REG sobre la inmunidad.

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento con REG es eficaz para paliar el estrés oxidativo evocado por la EH, como lo indican la hemólisis y la peroxidación lipídica, en pacientes con EH. Los beneficios a largo plazo de esta nueva terapia se asocian con un aumento del nivel de hematocrito, una mejora de la capacidad de respuesta de la eritropoyetina y una regulación negativa de las citoquinas proinflamatorias en pacientes con EH crónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Para evaluar el grado de estrés oxidativo en sangre de pacientes con ERT, 25 pacientes (14 hombres y 11 mujeres) sin ningún tratamiento (grupo XERW), 15 pacientes (siete hombres y ocho mujeres) con grupo VC intravenoso (1g en 250 ml de solución salina infundida durante 4 h de HD), 15 pacientes (ocho hombres y siete mujeres) con dializador recubierto con EV (grupo EV). En el estudio de REG se inscribieron 43 pacientes (28 hombres y 15 mujeres) sometidos a tratamiento con REG (grupo REG) con 10,870,5 mg/dl de creatinina, sometidos a HD de mantenimiento en el Hospital Wan-Hwa durante un período de 12 a 72 meses después de la obtención del consentimiento informado. Los criterios para la selección de pacientes incluyeron la ausencia de hábito de fumar, neoplasia maligna, trastornos inflamatorios, infecciones crónicas o agudas, suplementación de VC o EV, y tratamiento con hierro oral o intravenoso, o medicamentos antiinflamatorios 3 meses antes de la inscripción. La edad media fue de 58 a 73 años (media 7s.e.m., rango 42-82 años). Como los sujetos para el estudio de 6 meses fueron reclutados en los grupos REG y XERW, encontramos que al ingresar al estudio, el grupo XERW tenía un nivel de hematocrito basal alto, pero no significativo, que el grupo REG (31.071.0 vs 28.970.7%, $P1/40.097$). Un nivel similar en nitrógeno ureico en sangre (63.5 72.7 vs 71.473.3 mg/dl, $P1/40.07$), creatinina (10.0 70.35 vs 11.070.51 mg/dl, $P1/40.10$), albúmina (3.82 70.05 vs 3.7870.07g/dl, $P1/40.57$) y ferritina (395720 vs 373738ng/ml, $P1/40.596$) se observó en los grupos REG y XERW. Todos los pacientes con EH excepto el grupo EV utilizaron hemodializador (biomembrana AM-Bio-HX-90 y AM-Bio-HX-100: Asahi Kasei Med Co., Tokio, Japón). Un VE-recubierto EE18 La membrana de Excerbrane⁵ (Terumoc Co., Japón) se utilizó en el grupo EV. La solución VC (Tai-Yu Pharmaceutical, Taipei, Taiwán) se preparó en 1 g / 250 ml de solución salina antes de su uso. La tasa de flujo sanguíneo durante las sesiones de diálisis fue de 250-300 ml/min y el flujo de dializado de 500 ml/min. El área superficial de estos dos dializadores fue de 1,5 y 1,8 m² respectivamente, y el tratamiento del paciente con cualquiera de las membranas duró 6 meses. El kt/v de todos estos pacientes se mantiene entre 1,3 y 1,6. La causa de la ESRD fue diabetes en 55 pacientes y glomerulonefritis crónica en 43 pacientes. Los pacientes con EH estaban en una dieta libre con una ingesta normal y constante de ácidos grasos esenciales, y ninguno de ellos tomó ningún medicamento con efecto oxidante

establecido o potencial y ningún antioxidante como VC o VE durante 6 meses de período probado. El permiso del ensayo clínico fue aprobado por la reunión del Comité de Investigación Humana del Hospital Regional Wan-Hwa.

Sistema REG

HD-24K (Nihom Trim Co., Osaka, Japón) se estructuró como se describió en detalle anteriormente.³ En resumen, el agua cruda se suministró después de ser comprimida por la bomba de compresión y se suministró a un compartimento para la electrólisis a través de una válvula solenoide, que se abre y se cierra sincronizándose con la señal del sensor de nivel de agua en el tanque de almacenamiento de agua electrolizada y el sensor de flujo. En el compartimento eléctrico, el agua bruta suministrada se electrolizó mediante corriente continua suministrada a p y placa de electrodo a través del diafragma y en el lado de la placa del electrodo se redujo el agua que contenía hidrógeno activo y un valor de potencial redox más bajo. La serie de operaciones se lleva a cabo automáticamente de acuerdo con el nivel del tanque de agua reducido. HD-24K, bomba de compresión, tanque de agua reducido, tanque de agua ácida y computadora personal para el control se colocan frente al dispositivo habitual de procesamiento de agua cruda. El agua reducida producida por HD24K se recogió en un tanque de agua reducido, y luego se suministró al sistema habitual de procesamiento de agua cruda para HD por compresión con bomba de compresión. La intensidad de la electrólisis de HD-24K se ajusta al "nivel 2" y en este estudio se utiliza el REG que indica pH 9.8 justo después de tomar de "fuera" de HD-24K. La calidad de los REG para HD fue aprobada por el Instituto de Investigación Industrial Yen Tjing Ling de la Universidad Nacional de Taiwán con el número E89A299D277, que es requerido por la Asociación Americana de Instrumentos Médicos (AAMI). Los dializados REGW mantienen las propiedades de menor valor de potencial redox en comparación con el del dializado no REGW (15075 29675mV). La calidad microbiológica de los dializados finales cumple con el estándar AAMI (obacterias de 200 unidades formadoras de colonias/ml y concentración de endotoxinas de 2EU/ml). Debido a que los resultados del cultivo no están disponibles durante al menos 48 horas, tiempo durante el cual las bacterias continúan proliferando, el nivel final de acción del dializado también cumple con el estándar AAMI (obacterias y endotoxinas de 50 unidades formadoras de colonias / ml y 1EU / ml, respectivamente). El nivel de endotoxinas en el agua utilizada para la EH es de 0,06170,003 EU/ml medido por un kit ELISA de endotoxinas (HBTHIT301, Biocompare Inc., South San Francisco, CA, EUA) y un analizador ELISA automatizado (CODA, SN10373, Hercules, CA, EUA).

Muestras de sangre y análisis bioquímicos

La sangre (10 ml) se recogió a través de la línea arterial del circuito HD, antes del inicio y el final de una sesión de HD, en un tubo de ensayo estéril heparinizado y se procesó en 2 h. En cuanto a los efectos de la hemoconcentración durante la HD, los niveles post-HD de diversos bioquímicos plasmáticos se corrigieron con la siguiente ecuación:

Valor post HD corregido $1/4$ medido después del valor HD

$$\delta C_{preHD} = C_{postHD} \delta$$

El recuento de células de sangre total, incluido el nivel de hemoglobina y el hematocrito, se determinó con un autoanalizador

(Coulter STKS, Hialeah, Finlandia). Los niveles plasmáticos de nitrógeno ureico y creatinina se determinaron con un autoanalizador (Hitachi 736-15, Ibaraki, Japón). La concentración plasmática de oxalato se determinó por un método enzimático.³⁷

Medición de la actividad de ROS en sangre total y plasma Para determinar la actividad de ROS en sangre total y plasma, tomamos muestras y aislamos plasma de los cuatro grupos de pacientes en varios puntos temporales durante la primera sesión de HD del estudio. Después del muestreo, se agregaron inmediatamente 0,2 ml de sangre total o plasma a la solución de luminol, y las señales de ROS se midieron como descrito anteriormente.⁴

Para identificar los tipos de ROS en la sangre activada por la EH, estudiamos los efectos de varios inhibidores de ROS, incluida la superóxido dismutasa (un eliminador de O₂K, 30U), catalasa (un eliminador de H₂O₂, 30U) y epigallocatequina-3-galato (un eliminador de HOCl y H₂O₂, 10 mg).⁴ Para probar los efectos *in vitro* de los REG, también comparamos las señales de ROS en muestras de sangre obtenidas del grupo N antes y después del tratamiento con REG.

Ensayo de VC plasmática y EV

Para preservar VC, se desproteinizó una alícuota de plasma con ácido metafosfórico al 10% (1:1, vol/vol), y el sobrenadante se mantuvo a 80°C. El VC plasmático se midió mediante cromatografía líquida de alta resolución (sistema HPLC Hitachi D-7000) con detector ultravioleta a 254 nm con una columna Cosmosil 5 C 18-MS (2504,6 mm ID) con un tamaño de partícula de 5 mm.⁴⁵

La EV se midió, después de la extracción con etanol y hexano, por cromatografía líquida de alta resolución con detección UV a 292nm⁴⁶ con una columna Cosmosil 5C₁₈-MS (150 4.6 mm ID) con un tamaño de partícula de 5 mm. El software del administrador del sistema (D-7000, versión 3.0; Hitachi) se utilizó para la integración máxima de VC y VE y la adquisición de datos.

Las recuperaciones de extracción de las recuperaciones estándar de VC y VE dentro del rango de concentración del ensayo fueron 85 y 96%. Para VC y VE, la variabilidad dentro del día fue inferior al 13,5%, mientras que la variabilidad entre días no superó el 14,8%. La variabilidad dentro del día promedió 11,472,5% para VC y 6,171,6% para EV. La variabilidad media entre días fue de 11,972,7% para VC y 6,371,5% para EV.

Mediciones de TAS plasmático

Medimos el TAS de plasma (20ml) por un kit comercial (kit TAS, Randox, San Francisco, CA, USA) de acuerdo con el manual-Instrucciones del fabricante.^{3,4}

Medición de productos de peroxidación lipídica

Un producto de peroxidación lipídica, PCOOH, originado a partir de fosfatidilcolina oxidada es un producto primario de peroxidación lipídica,⁴⁷ que se midió para servir como una indicación de estrés oxidativo.^{3,4} Las cantidades de PCOOH en plasma y eritrocitos se determinaron por duplicado mediante cromatografía líquida de alta resolución quimioluminiscencia (CL-HPLC, Tohoku Electronic Ind. Co., Sendai, Japón).

Evaluación espectrofotométrica de las actividades de hemoglobina oxidada y RBC reductasa

El estrés oxidativo inducido por la EH, a través de la peroxidación lipídica de la membrana de los eritrocitos, conduciría a la destrucción de los eritrocitos y la liberación de hemoglobina. Determinamos la concentración plasmática de metHb espectrofotométricamente, como se describió anteriormente.³⁴ La puntuación de hemólisis se determinó mediante medición espectrofotométrica a 540 nm y con un contador Coulter (Coulter Onix, Miami, FL, EUA). Una actividad reducida del *sistema de transporte de electrones de membrana transplasmática de glóbulos rojos, incluida la ferricianuro reductasa y la metHb reductasa, podría provocar daño celular y aumentar la concentración plasmática de metHb y H₂O₂*.^{28,29} La actividad de la ferricianuro reductasa de glóbulos rojos se midió como se describió anteriormente. La actividad de la reductasa de ⁴⁸metHb se ensayó mediante el uso de 2,6-diclorofenol indofenol como aceptor de electrones.⁴⁹

Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como media \pm s.e.m. Las comparaciones dentro del grupo entre los valores pre y post-HD se realizaron mediante prueba t pareada. Para los datos longitudinales, se utilizó el análisis de varianza de medidas repetidas con análisis *post hoc* con el procedimiento de Bonferroni para analizar las diferencias entre y dentro del grupo. *P*0.05 fue adoptado como indicativo de significación estadística.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencias de la República de China (NSC 92-2320-B002-078), Nacional Taiwán Hospital Universitario (NTUH94S104), Taipei City United Hospital Heping Branch y Formosan Blood Purification Foundation.

REFERENCIAS

- Sela S, Shurtz-Swirskin R, Shapiro G et al. Estrés oxidativo durante la hemodiálisis: efecto de la heparina. *Riñón Int* 2001; 59: S159–S163.
- Himmelfarb J, Lazaus JM, Hakim RM. Producción reactiva de especies de oxígeno por monocitos y leucocitos polimorfonucleares durante la hemodiálisis. *Am J Kidney Dis* 1991; 7: 271–276.
- Huang KC, Yang CC, Lee KT, Chien CT. Reducción del estrés oxidativo inducido por hemodiálisis en pacientes con enfermedad renal terminal mediante agua reducida electrolizada. *Riñón Int* 2003; 64: 704–714.
- Yang CC, Hsu SP, Wu MS et al. Efectos de la infusión de vitamina C y la membrana recubierta de vitamina E sobre el estrés oxidativo inducido por hemodiálisis. *Riñón Int* 2006; 69: 706–714.
- Descamps-Letscha B, Herbelin A, Nguyen AT et al. Equilibrio entre IL-1 beta, TNF-alfa y sus inhibidores específicos en insuficiencia renal crónica y diálisis de mantenimiento. Relaciones con marcadores de activación de células T, células B y monocitos. *J Immunol* 1995; 154: 882–892.
- Herbelin A, Nguyen AT, Zingraff J et al. Influencia de la uremia y la hemodiálisis sobre la interleucina-1 circulante y el factor de necrosis tumoral alfa. *Riñón Int* 1990; 37: 116–125.
- Danielski M, Ikizler TA, McMonagle E et al. Vinculación de hipoalbuminemia, inflamación y estrés oxidativo en pacientes que reciben terapia de hemodiálisis de mantenimiento. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 286–294.
- MacDougall IC. ¿Podría el tratamiento con citoquinas antiinflamatorias mejorar los resultados deficientes del tratamiento en pacientes en diálisis? *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(Suppl 5): V73–V78.
- Muller C, Eisenbrand G, Gradinger M et al. Efectos de la hemodiálisis, tipo dializador e infusión de hierro sobre el estrés oxidativo en pacientes urémicos. *Free Radic Res* 2004; 38: 1093–1100.
- Wratten ML, Galaris D, Tetta C, Sevanian A. Evolución del estrés oxidativo y la inflamación durante la hemodiálisis y su contribución a la enfermedad cardiovascular. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 935–944.
- Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A et al. La inflamación aumenta el riesgo cardiovascular y la mortalidad en pacientes en hemodiálisis. *Riñón Int* 1999; 55: 648–658.
- Giardini O, Taccone-Gallucci M, Lubrano R et al. Evidencia de peroxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos en pacientes en hemodiálisis. *Nefrona* 1984; 36: 235–237.
- Costagliola C, Romano L, Scibelli G et al. Anemia e insuficiencia renal crónica: un enfoque terapéutico mediante la administración parenteral reducida de glutatión. *Nefrona* 1992; 61: 404–408.
- Canestrari F, Galli F, Giorgioni A et al. Estado redox de eritrocitos en anemia urémica: efecto de la hemodiálisis y relevancia del metabolismo del glutatión. *Acta Haematol* 1994; 91: 71–220.
- Usberti M, Lima G, Arisi M et al. Efecto del glutatión reducido exógeno sobre la supervivencia de los glóbulos rojos en pacientes hemodializados. *J Nephrol* 1997; 10: 261–265.
- Cristol JP, Bosh JY, Badiou S et al. Eritropoyetina y estrés oxidativo en hemodiálisis. Efectos beneficiosos de la suplementación con vitamina E. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2312–2317.
- Taccone-Gallucci M, Lubrano R, Meloni C et al. Peroxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos y resistencia al tratamiento con eritropoyetina en pacientes hemodializados. *Clin Nephrol* 1999; 52: 239–245.
- Galli F, Canestrari F, Buoncrisiani U. Efectos biológicos del estrés oxidativo en hemodiálisis: las posibles funciones de la vitamina E. *Blood Purif* 1999; 17: 79–94.
- Weiss SJ. Formación de metahemoglobina mediada por neutrófilos en el eritrocito. El papel del superóxido y el peróxido de hidrógeno. *J Biol Chem* 1982; 257: 2947–2953.
- Claster S, Chiu DT, Quintanilha A et al. Los neutrófilos median la peroxidación lipídica en los glóbulos rojos humanos. *Sangre* 1984; 64: 1079–1084.
- Calo LA, Stanic L, Davis PA et al. Efecto de la epoietina sobre el nivel de ARNm de HO-1 y antioxidantes plasmáticos en pacientes en hemodiálisis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41: 187–192.
- Kawanishi S, Caughey WS. Mecanismo de transferencia de electrones al dioxígeno coordinado de oxihemoglobinas para producir peróxido y metahemoglobina. Control proteico de la donación de electrones por acupentacianoferrato (II). *J Biol Chem* 1985; 260: 4622–4631.
- McLeod LL, Alayash AI. Detección de un intermediario de ferrilhemoglobina en un modelo de células endoteliales después de hipoxia-reoxigenación. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 46: H92–H99.
- Zenser TV, Lakshmi VM, Hsu FF, Davis BB. Oxidación de metahemoglobina de N-acetilbencidina para formar una sulfonamida. *Medicamento Metab Dispos* 2001; 29: 401–406.
- D'Angillo F, Alayash AI. El ciclo redox de la hemoglobina reticulada de diaspirina induce la detención de G2/M y la apoptosis en células endoteliales cultivadas. *Sangre* 2001; 98: 3315–3323.
- Bello RI, Alcain FJ, Gomez-Diaz C et al. Expresión regulada por peróxido de hidrógeno y densidad celular de NADH-citocromo b5 reductasa en células HeLa. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 169–179.
- Dekker J, Eppink MH, van Zwieten R et al. Siete nuevas mutaciones en el gen de la nicotinamida adenina dinucleótido reducido del citocromo b (5) reductasa que conduce a la metahemoglobinemia tipo I. *Blood* 2001; 97: 1106–1114.
- Orringer EP, Roer MES. Un sistema de reducción transmembrana mediado por ascorbato del eritrocito humano. *J Clin Invest* 1979; 63: 53–58.
- Borgese N, Pietrini G, Gaetani S. Concentración de NADH-citocromo b5 reductasa en eritrocitos de individuos normales y metahemoglobinémicos medida con un ensayo cuantitativo de radioinmunotransferencia. *J Clin Invest* 1987; 80: 1296–1302.
- Shirahata S, Kabayama S, Nakano M et al. El agua reducida electrolizada elimina las especies activas de oxígeno y protege el ADN del daño oxidativo. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 269–274.
- Li Y, Nishimura T, Teruya K et al. Mecanismo protector del agua reducida contra el daño de las células pancreáticas inducido por aloxano: efecto de eliminación contra especies reactivas de oxígeno. *Citotecnología* 2002; 40: 139–149.
- Pfafferoth C, Neiselman J, Hochstein P. El efecto del malonildialdehído sobre la deformabilidad de los eritrocitos. *Sangre* 1982; 59: 12–15.

33. Zachee P, Ferrant A, Daelemans R et al. Lesión oxidativa de los eritrocitos, rigidez celular y hemólisis esplénica en pacientes hemodializados antes y durante el tratamiento con eritropoyetina. *Nefrona* 1988; 65: 288–293.
34. Winterbourn CC. Reacciones oxidativas de la hemoglobina. *Métodos Enzymol* 1990; 186: 265–272.
35. Hayashi H. Teoría reguladora del agua: el modelo de Hayashi. *Explora* 1995; 6: 28–31.
36. Happe RP, Roseboom W, Pierik AJ et al. Activación biológica del hidrógeno. *Naturaleza* 1997; 385: 126.
37. Rolton HA, McConnell KN, Modi KS et al. Un ensayo simple y rápido para oxalato plasmático en pacientes urémicos que usan oxalato oxidasa, que está libre de interferencia de vitamina C. *Clin Chim Acta* 1989; 182: 247–254.
38. Mydlik M, Derzsiova K, Racz O et al. Un dializador modificado con vitamina E y parámetros de defensa antioxidantes. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: S144–S147.
39. Snyder JJ, Foley RN, Gilbertson DT et al. Niveles de hemoglobina y dosis de eritropoyetina en pacientes en hemodiálisis y diálisis peritoneal en los Estados Unidos. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 174–179.
40. Tarng DC, Huang TP, Liu TY et al. Efecto de la membrana unida a la vitamina E en el nivel de 8-hidroxi 2 O-desoxiguanosina en el ADN leucocitario de pacientes en hemodiálisis. *Riñón Int* 2000; 58: 790–799.
41. Fandrey J, Frede S, Ehleben W et al. El cloruro de cobalto y la deferoxamina antagonizan la inhibición de la producción de eritropoyetina por especies reactivas de oxígeno. *Riñón Int* 1997; 51: 492–496.
42. Libetta C, Zucchi M, Gori E et al. El dializador cargado con vitamina E restablece la red de citoquinas operada por PBMC en pacientes en diálisis. *Riñón Int* 2004; 65: 1473–1481.
43. Girndt M, Kaul H, Sester U et al. El genotipo antiinflamatorio de la interleucina-10 protege a los pacientes en diálisis de eventos cardiovasculares. *Riñón Int* 2002; 62: 949–955.
44. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR. Regulación a la baja de la capacidad proinflamatoria durante la apoptosis en leucocitos polimorfonucleares humanos. *J Immunol* 2003; 170: 3357–3368.
45. Kutnink MA, Hawkes WC, Schaus EE et al. Un método estándar interno para el análisis líquido desatendido de alto rendimiento del ácido ascórbico en componentes sanguíneos. *Bioquímica Anal* 1987; 166: 424–430.
46. Nierenberg DW, Nann SL. Un método para determinar las concentraciones de retinol, tocoferol y cinco carotenoides en muestras de plasma y tejido humano. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 417–426.
47. Waston AD, Leitinger N, Navab M et al. Identificación estructural por espectrometría de masas de fosfolípidos oxidados en lipoproteínas de baja densidad mínimamente oxidadas que inducen interacciones monocitos/endoteliales y evidencia de su presencia in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272: 13597–13607.
48. Baker MA, Lane DJR, Ly JD et al. VDAC1 es una membrana transplasmática NADH-ferricianuro reductasa. *J Biol Chem* 2004; 279: 4811–4819.
49. Scott EM. La relación de la diaforasa de los eritrocitos humanos con la herencia de la metahemoglobinemia. *J Clin Invest* 1969; 39: 1176–1179.