



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio Metabólico y de Marcadores de Estrés
Oxidativo y Función Vascular en Pacientes
Sometidos a Trasplante Renal**

D. Ignacio de las Heras Gómez

2017

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO METABOLÓMICO Y DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN VASCULAR EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE RENAL

Memoria para optar al grado de doctor

presentada por

Dº Ignacio de las Heras Gómez

Bajo la dirección de los Doctores:

Dr. Ángel Gil Izquierdo

Dra. Teresa Casas Pina

Dra. Sonia Medina Escudero

Murcia, 2017

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer el apoyo a todas las personas que, de una forma u otra, han intervenido en la presente Tesis Doctoral.

A mis directores Ángel Gil Izquierdo, Teresa Casas Pina y Sonia Medina Escudero, por el apoyo incondicional, la confianza y la paciencia que me han brindado durante este tiempo. Agradecerles también por la cercanía con la que me han tratado y por los consejos como expertos que me han dado, además por la total disponibilidad que me han ofrecido siempre que les he necesitado para la aclaración de cualquier duda.

A la Luisa Jimeno y a Santiago Llorente, quienes me asesoraron en la organización de los pacientes del estudio, y quienes como nefrólogos me aconsejaron en muchos aspectos.

A todos los compañeros del laboratorio del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Virgen de la Arrixaca, quienes me ayudaron en muchas ocasiones y con los que compartí muy buenos momentos.

Al equipo del CEBAS y en especial a Libia y Anna, gracias por ayudarme con el análisis de las muestras, sin vosotras hubiese sido muy complicado hacerlo.

A mis padres, por ofrecerme todo su apoyo en todas las etapas de mi vida, y a quienes debo todo lo que soy.

A mi mujer, Elena, sin su apoyo en los momentos difíciles no sé si hubiese podido llegar hasta aquí. Gracias por estar ahí siempre escuchándome, intentando comprenderme y motivándome cuando lo he necesitado.

A todos los que me habéis acompañado en este proyecto, **MUCHAS GRÁCIAS.**

LISTADO DE ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

ACV: accidente cerebrovascular

Acl.Cr: aclaramiento de creatinina

AdA: ácido adrénico

AGP: ácidos grasos poliinsaturados

AlbS: albúmina sérica

CrO: creatinina en orina

CrS: creatinina sérica

CT: colesterol total

DP: diálisis peritoneal

ERC: enfermedad renal crónica

ERCT: enfermedad renal crónica terminal

EO: estrés oxidativo

EPA: ácido ecosapentaenoico

ERO: especies reactivas del oxígeno

F₂-dihomo-IsoPs: F₂-dihomo-isoprostanos

F₃-NeuroPs: F₃-neuroprostanos

F₄-NeuroPs: F₄-neuroprostanos

FG: filtrado glomerular

FGe: filtrado glomerular estimado

GLA: ácido dihomo- γ -linolénico

Glu: glucosa

GOT: glutamato oxalacetato transaminasa

GPT: glutamato piruvato transaminasa

HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

HD: hemodiálisis

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HTO: hematocrito

IsoPs: isoprostanos

LDH: lactato deshidrogenasa

Leu: leucocitos

LeuO: leucocitos en orina

NeuroPs: neuroprostanos

n-6 DPA: *n*-6-ácido docosapentaenoico

n-3 DHA: *n*-3 ácido docosaheptanoico

ONT: organización nacional de trasplantes

PGs: prostaglandinas

PMP: por millón de población

PT: prostanoide

PtO: proteínas en orina

PtO CrO⁻¹: cociente proteínas urinarias / creatinina urinaria

REDOX: reducción-oxidación

RFI: retraso en la función inicial del injerto

RL: radicales libres

TCE: traumatismo craneoencefálico

Tg: triglicéridos

TR: trasplante renal

TSR: tratamiento sustitutivo renal

TX: tromboxanos

UrS: urea sérica

ÍNDICE GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN	10
1.2. Enfermedad Renal Crónica	11
1.1.1. Definición	11
1.1.2. Etiología	12
1.1.3. Incidencia y prevalencia de la enfermedad renal crónica	14
1.2. Tratamiento y soluciones. Trasplante renal	15
1.2.1. Tratamientos	15
1.2.2. Historia del trasplante renal	17
1.2.3. Modelos de trasplante en España. Organización Nacional de Trasplantes	19
1.3. Problemática y supervivencia de los trasplantados renales	20
1.3.1. Supervivencia del paciente trasplantado	20
1.3.2. Supervivencia del injerto	24
1.4. Marcadores de seguimiento y evaluación del injerto	25
1.4.1. Marcadores tradicionales de seguimiento y evaluación del injerto	25
1.4.1.1. Creatinina	26
1.4.1.2. Filtrado glomerular	26
1.4.1.3. Proteinuria	27
1.4.1.4. Biopsia	28

1.4.2. Nuevos parámetros para la evaluación y seguimiento del injerto	29
1.4.3. Empleo de la lipidómica en la búsqueda de nuevos marcadores	30
1.5. Estrés oxidativo. Marcadores de patologías	31
1.5.1. Estrés oxidativo y sistema antioxidante	31
1.5.2. Síntesis de radicales libres	33
1.5.3. Monitorización del estrés oxidativo	34
1.5.4. Estrés oxidativo y patologías relacionadas	35
1.5.5. Estrés oxidativo y función renal	36
1.6. Lipoperoxidación y marcadores de estrés oxidativo: isoprostanos, neuroprostanos	38
F ₂ -dihomo isoprostanos	
1.6.1. Lípidos y sus funciones	38
1.6.2. Peroxidación lipídica o lipoperoxidación	39
1.6.3. Etapas de la lipoperoxidación	39
1.6.3.1. Inicio de la lipoperoxidación	40
1.6.3.2. Propagación de la lipoperoxidación	41
1.6.3.3. Terminación de la lipoperoxidación	41
1.7. Isoprostanos	43
1.7.1. Definición	43
1.7.2. Síntesis y nomenclatura	43
1.7.3. Isoprostanos y estados fisiológicos	45
1.7.4. Función biológica de los isoprostanos	

1.7.5. Isoprostanos como marcadores de patologías	46
1.7.6. Isoprostanos y función renal	48
1.8. Neuroprostanos	49
1.8.1. Definición, síntesis, nomenclatura y funciones	50
1.8.2. Neuroprostanos como marcadores de patologías	50
1.9. F ₂ -dihomo-isoprostanos	51
1.9.1. Definición, síntesis y funciones	52
1.9.2. F ₂ -dihomo-isoprostanos como marcadores de patologías	52
1.10. Prostanoides: prostaglandinas y tromboxanos	53
1.10.1. Definición	54
1.10.2. Síntesis y nomenclatura	54
1.10.3. Prostanoides y estados fisiológicos	55
1.10.4. Función biológica de los prostanoides	56
1.10.5. Prostanoides como marcadores de patologías	58
1.10.6. Prostanoides y función renal	59
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	61
2.1. Hipótesis de trabajo	61
2.2. Objetivos	63
2.2.1. Objetivo general	63

2.2.2. Objetivos particulares	64
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1. Características de la población de estudio	66
3.1.1. Población de estudio	66
3.1.2. Criterios de exclusión	66
3.1.3. Característica de los trasplantes	66
3.1.4. Confidencialidad	67
3.2. Obtención de muestras	73
3.2.1. Muestras de sangre	73
3.2.2. Muestras de orina	74
3.2.3. Consideraciones especiales de las muestras	74
3.3. Parámetros estudiados y técnicas analíticas empleadas	75
3.3.1. Parámetros hematológicos analizados	75
3.3.2. Parámetros bioquímicos analizados	76
3.3.3. Celularidad en orina	77
3.3.4. Marcadores de estrés oxidativo y función vascular	77
3.3.4.1. Reactivos y calibradores	77
3.3.4.2. Extracción de muestras de orina para el análisis de isoprostanos prostanoides, neuroprostanos y F ₂ -dihomo-isoprostanos	78

3.3.4.3.	UHPLC-QqQ-MS/MS	79
3.4.	Análisis estadístico	85
4.	RESULTADOS	87
4.1.	Características de la población estudiada	88
4.1.1.	Pacientes trasplantados	88
4.1.2.	Grupo control	89
4.2.	Características de los trasplantes realizados	89
4.3.	Parámetros bioquímicos	90
4.3.1.	Pacientes trasplantados y grupo control	90
4.3.2.	Evolución de los parámetros bioquímicos a lo largo de los seis meses postrasplante	92
4.3.3.	Diferencia entre pacientes trasplantados e individuos sanos al inicio y al final del estudio	96
4.3.4.	Función renal en los pacientes trasplantados según las características del trasplante	98
4.4.	Evolución de los diferentes marcadores de estrés oxidativo analizados durante los seis meses postrasplante	101
4.4.1.	Isoprostanos	101
4.4.1.1.	<i>Evolución individual de los diferentes isoprostanos analizados</i>	101

4.4.2. <i>Evolución de los diferentes isoprostanos analizados agrupados por familias</i>	104
4.4.3. Neuroprostanos	109
4.4.4. F ₂ -dihomo-isoprostanos	112
4.5. Correlación de los diferentes marcadores de estrés oxidativo analizados con la función renal	114
4.5.1. Isoprostanos	114
4.5.2. Neuroprostanos	116
4.5.3. F ₂ -dihomo-isoprostanos	117
4.6. Comparación de los diferentes marcadores de estrés oxidativo con los parámetros bioquímicos analizados	117
4.6.1. Isoprostanos	117
4.6.2. Neuroprostanos	118
4.6.3. F ₂ -dihomo-isoprostanos	119
4.7. Diferencias en la excreción de los diferentes marcadores de estrés oxidativo en función de las características del trasplante	119
4.7.1. En función de si tuvieron retraso en el inicio de la función o no	119
4.7.2. En función del tipo de muerte del donante	121
4.7.3. En función de la edad del donante	122
4.7.4. En función del tiempo de isquemia fría del órgano trasplantado	123

4.8. Comportamiento y valor predictor de los marcadores de estrés oxidativo en los pacientes con rechazo	125
4.9. Diferencias en los niveles de neuroprostanos y de F ₂ -dihomo-isoprostanos entre el grupo control y los trasplantados	125
4.10. Prostanoides: prostaglandinas y tromboxanos.	
4.9.1. Evolución de los prostanoides durante los seis meses postrasplante	126
4.9.1.1. <i>Evolución individual de los diferentes prostanoides analizados</i>	126
4.9.1.2. <i>Evolución de los diferentes prostanoides agrupados por familias</i>	129
4.9.2. Correlación de los prostanoides con la función renal	135
4.9.3. Comparación de los prostanoides con los diferentes parámetros bioquímicos analizados	138
4.9.4. Diferencias en la excreción urinaria de prostanoides en función de las características del trasplante	138
4.9.5. Prostanoides en los pacientes con rechazo	145
5. DISCUSIÓN	146
5.1. Trasplante renal. Estudio descriptivo de la población estudiada y de los trasplantes realizados	147
5.1.1. Características de la población estudiada	147

5.1.2. Características de los trasplantes realizados	149
5.2. Evolución de los diferentes marcadores analizados a lo largo del estudio	151
5.2.1. Evolución del estado general de los pacientes según los parámetros bioquímicos analizados	151
5.2.2. Evolución de los marcadores de estrés oxidativo en los pacientes trasplantados renales en los seis meses postrasplante y su correlación con la función renal	152
5.2.3. Evolución de la excreción de prostanoïdes en los pacientes trasplantados renales en los seis meses postrasplante y su correlación con la función renal	156
5.3. Diferencias entre los pacientes trasplantados y el grupo control	162
5.3.1. Estado general	162
5.3.2. Estrés oxidativo	163
5.4. Función renal en los pacientes trasplantados según las características del trasplante	165
5.4.1. Diferencias relacionadas con la función inicial del injerto	165
5.4.2. Diferencias en función de la edad del donante	167
5.4.3. Diferencias en función del tipo de muerte del donante	167
5.4.4. Diferencias en función del tiempo de isquemia fría del injerto	169
5.5. Correlación de otros parámetros bioquímicos analizados con los eicosanoides	170

5.6. Estudio de los eicosanoides analizados en los pacientes que presentaron un rechazo confirmado por biopsia	171
6. CONCLUSIONES	173
7. BIBLIOGRAFÍA	177

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad Renal Crónica

1.1.1. Definición

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la presencia de alteraciones en la estructura o función renal durante al menos tres meses consecutivos, pudiéndose constatar las mismas de forma prospectiva o retrospectiva (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Criterios diagnósticos de la enfermedad renal. *Fuente: Guía KDIGO (1).*

Criterios de ERC^a (cualquiera de los siguientes durante más de 3 meses)	
Marcadores de daño renal	Albuminuria elevada
	Alteraciones en el sedimento urinario
	Alteraciones electrolíticas u otras de origen tubular
	Alteraciones estructurales histológicas
	Alteraciones estructurales en prueba de imagen
	Trasplante renal
FG ^b disminuido	FG < 60 mL/min/1,73 m ²

^aERC: Enfermedad renal crónica; ^bFG: Filtrado glomerular.

Tras la confirmación de la ERC, ésta se clasificará en diferentes grados según los niveles de filtrado glomerular (FG) y albuminuria encontrados en los pacientes (**Tabla 1.2**), así como según la etiología de la misma (1).

Tabla 1.2. Clasificación en grados de la enfermedad renal crónica. *Fuente: Guía KDIGO.*

Categorías del FG		
Categoría	FG ^a	Descripción
G1	> 90	Normal o elevado
G2	60 - 89	Ligeramente disminuido
G3a	45 - 59	Ligera a moderadamente disminuido
G3b	30 - 44	Moderada a gravemente disminuido
G4	15 - 29	Gravemente disminuido
G5	< 15	Fallo renal
Categorías de albuminuria		
Categoría	Albuminuria ^b	Descripción
A1	< 30	Normal a ligeramente elevada
A2	30 - 300	Moderadamente elevada
A3	> 300	Muy elevada

^aFG: filtrado glomerular, en mL/min/1,73 m². ^bLa albuminuria se expresa como cociente albúmina creatinina⁻¹ en mg g⁻¹ en muestra aislada de orina.

1.1.2. Etiología

Las causas de la ERC varían de unos países a otros en función de factores genéticos, ambientales y de las condiciones sociosanitarias del país. Estas se establecerán por la presencia o ausencia de una enfermedad sistémica con potencial afectación renal o mediante las alteraciones anatomopatológicas observadas en el órgano.

En los países en vías de desarrollo la glomerulonefritis crónica y la nefritis intersticial son hoy día la principal causa de ERC, reflejando la alta prevalencia de infecciones bacterianas, virales y parasitarias que afectan a la población de estos países.

Entre los agentes bacterianos más frecuentes se encuentran la tuberculosis y las infecciones causadas por estreptococos. En el caso de las infecciones virales, son los virus del VIH y los de la hepatitis B y C los que más casos de ERC desencadenan, y entre las parasitarias el esquistosoma, el kala azar, la malaria y las filiar (2).

Por otra parte, la creciente tasa de diabetes mellitus e hipertensión que se está dando hoy día en estos países hace que la incidencia de la ERC aumente año tras año. Se estima que en el año 2030 la prevalencia de diabetes en los países subdesarrollados será de más del doble de la presente en la actualidad, hecho que aumentará el número de casos de patología renal (3).

Estos datos son una de las principales preocupaciones de las autoridades sanitarias de los países subdesarrollados, ya que se estima que más del 70% de los pacientes con ERC terminal del mundo residirán en ellos, siendo su economía solo un 15% del total de la economía mundial (3).

En los países desarrollados la etiología de esta patología es diferente y ha cambiado mucho desde hace unos años. Anteriormente la causa más frecuente de insuficiencia renal era la glomerulonefritis, pero hoy día ha sido superada por la nefropatía diabética en primer lugar, y por la nefrosclerosis hipertensiva a continuación (4).

Estos cambios en la etiología de la ERC se explican por los nuevos hábitos adquiridos en la sociedad occidental tales como una inadecuada alimentación con un exceso calórico, que asociado a un incremento del sedentarismo, han desencadenado un aumento exponencial del desarrollo de enfermedades crónicas (5).

Por otra parte, el adecuado manejo de la glomerulonefritis en los países desarrollados está impidiendo que esta enfermedad se cronifique y por lo tanto su importancia en la génesis de la ERC ha ido disminuyendo (6).

En España, según evidencia el registro oficial de Diálisis y Trasplante de la Sociedad Española de Nefrología de 2014, la ERC se presenta asociada a cuatro patologías crónicas de alta prevalencia como son la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca y la cardiopatía isquémica (7).

1.1.3. Incidencia y prevalencia de la enfermedad renal crónica

A nivel global, la incidencia y prevalencia de la ERC están aumentando notablemente en los últimos años debido a factores como el aumento de la aparición de enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y la arterioesclerosis, así como por el envejecimiento de la población (el 22% de la población mayor de 64 años y el 40% mayor de 80 años padece ERC) (8).

- Incidencia

La mayoría de los expertos están de acuerdo en que la incidencia media mundial es en torno a 150 casos por millón de población (pmp), y que las diferencias entre unos países y otros se deben a los factores genéticos y ambientales (2).

Por ejemplo, en Estados Unidos la incidencia es mucho mayor entre los hispanos y afroamericanos que entre los blancos nativos, incidencia que también vemos incrementada en esta subpoblación estadounidense con respecto al mismo grupo étnico

residente en África o en Europa. Esto es debido al aumento de enfermedades crónicas desencadenadas por los malos hábitos dietéticos y el sedentarismo (2).

En España, aproximadamente 4 millones de personas padecen ERC, con una incidencia media en el año 2014 de 133,6 pmp, dato que vemos claramente aumentado si lo comparamos con los datos de 2010, que reflejan una incidencia media de 121,1 pmp (7).

- Prevalencia

La prevalencia continúa aumentando en la mayoría de los países, debido al incremento de la incidencia y al desarrollo y mejora de las técnicas y tratamientos de la ERC.

En Japón ronda los 2000 casos pmp (9), 1500 casos pmp en Estados Unidos (10) y en torno a 800 casos pmp en la Unión Europea, siendo en España de 1092 pacientes pmp en el 2015 (11).

En los países en vías de desarrollo la prevalencia es mucho menor, siendo de 100 casos pmp en el África subsahariana y en la India, de 400 casos pmp en Latinoamérica, y de más de 600 casos pmp en Arabia Saudí (2).

1.2. Tratamiento y soluciones. Trasplante renal.

1.2.1. Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con ERC debe ser integrado y unitario, decantándose en cada uno de ellos por la opción terapéutica más adecuada. Esta dependerá de las diferentes características personales y sociolaborales del paciente, de la

comorbilidad asociada de cada opción, de la valoración de los beneficios y los riesgos, de la calidad de vida, etc.

La ERC es una enfermedad progresiva que se cronifica y hace que cada año unas 6000 personas con insuficiencia renal necesiten seguir uno de los tres tipos de tratamiento sustitutivo renal (TSR): hemodiálisis (HD), diálisis peritoneal (DP) o trasplante renal (TR). Entre ellos, el TR ha resultado ser el tratamiento más efectivo para esta patología, no existiendo a día de hoy, prácticamente ningún estudio en el que no se encuentre que la calidad de vida relacionada con la salud mejoró tras el mismo (12).

Según el Registro Español de Enfermos Renales, en el año 2012 el 80% de los pacientes que necesitaron TSR lo hicieron mediante HD, un 16,4% empezaron DP y el resto, poco más del 3,5%, directamente con un TR (13).

El coste por paciente del tratamiento de esta patología es muy elevado debido a que muchos de ellos son pluripatológicos o crónicos complejos. Si lo comparamos con otras patologías vemos que el coste de su tratamiento es seis veces mayor que el del tratamiento de pacientes con infección por VIH y 24 veces mayor que el del tratamiento de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma. Esto supone un elevado gasto para el Sistema Nacional de Salud, suponiendo el coste del TSR entre el 2,5% y el 3,0% del total de su presupuesto (11).

El incremento anual de la prevalencia de esta patología en España hace que cada vez los costes de la ERC sean mayores para el Sistema Nacional de Salud. Por este motivo se debe seguir avanzando en el estudio de esta patología y en la búsqueda de tratamientos cada vez más eficientes que nos permitan optimizar al máximo los recursos disponibles.

1.2.2. Historia del trasplante renal

El primer trasplante de órganos realizado con éxito fue un trasplante renal. Lo llevaron a cabo el equipo de los doctores Murray y John Merrill en la ciudad de Boston (EE.UU.) el 23 de diciembre de 1954, logro por el que recibieron en 1991 el Premio Nobel de Medicina. Dicho trasplante fue entre gemelos univitelinos, siendo el receptor un joven de 23 años afecto de una glomerulonefritis en estadio terminal.

Sin embargo, los trasplantes que se efectuaban con riñones de donante cadáver seguían teniendo pésimos resultados debido al rechazo agudo. Este tipo de eventos no se consiguió controlar hasta el descubrimiento de la Azatioprina en la década de los sesenta, cuando se vio que al asociarla con esteroides se conseguía evitar este tipo de rechazo, siendo por tanto dicha combinación el primer tratamiento inmunosupresor capaz de aumentar la supervivencia del injerto (14).

En España, el primer trasplante de riñón lo realizaron el urólogo Dr. José María Gil-Vernet y el nefrólogo Dr. Antonio Caralps en el Hospital Clínico de Barcelona en 1965. Esta aventura científica les costó una denuncia por apropiación indebida de órganos, algo que afortunadamente se resolvió posteriormente sin grandes problemas (15).

No obstante, la consolidación del TR no fue hasta finales de la década de los setenta con el perfeccionamiento de la tipificación del HLA, y la aceptación y reconocimiento legal de la muerte cerebral de forma generalizada, hecho que permitió el aprovechamiento e intercambio de riñones procedentes de donante cadáver (15).

El posterior descubrimiento de fármacos inmunosupresores, entre los que están la ciclosporina A, los anticuerpos monoclonales y policlonales, el tacrolimus, el

micofenolato mofetil, el sirolimus y el everolimus, y su introducción en la práctica clínica durante los últimos años de la década de los noventa y los primeros del siglo XXI, permitió personalizar los tratamientos y alcanzar una sinergia inmunosupresora que disminuyó drásticamente la tasa de rechazo agudo.

En la actualidad, el TR se ha convertido en un procedimiento rutinario y habitual en los grandes hospitales de España, gracias a los importantes avances en la terapia inmunosupresora y al alto grado de especialización que han conseguido los equipos de trasplante. Este procedimiento solo se ve limitado por la baja disponibilidad de riñones aptos para trasplante en relación con el aumento de la demanda de pacientes que lo necesitan, desequilibrio que aumenta año tras año.

A pesar de esta limitación, el número de trasplantes renales en España continúa aumentando (**Figura 1.1**), ya que aunque se utilicen órganos subóptimos para el trasplante, esta terapia sigue siendo la mejor opción y la que proporciona una mayor supervivencia a los pacientes con una mejor calidad de vida.

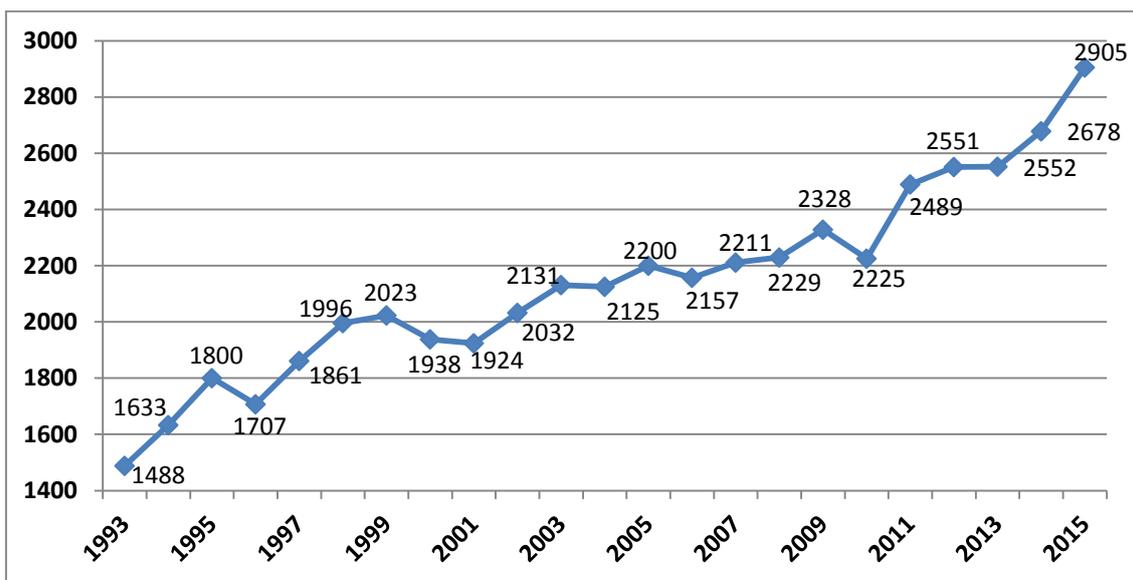


Figura 1.1. Casuística en España para el trasplante renal. Fuente: Organización Nacional de Trasplante.

1.2.3. Modelo español de trasplantes. Organización Nacional de Trasplantes.

España es líder internacional en trasplantes gracias a la actuación de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT). Dicho organismo se creó en 1989 e indujo, entre otras medidas la creación de una red nacional de coordinadores entrenados específicamente para el trasplante, con un alto grado de motivación y con un perfil específico y distinto al de otros países europeos.

Los coordinadores son en su gran mayoría médicos intensivistas entrenados por la ONT para detectar posibles donantes, abordar a la familia y hacer lo necesario para lograr la donación. Gracias a su labor, España pasó de tener uno de los índices de donación más bajos de Europa (14 donantes pmp) a alcanzar los más elevados del mundo (41 donantes de órganos pmp entre marzo de 2015 y marzo de 2016), superando en más de 20 puntos a la media de la Unión Europea (19,6 donantes pmp) y en más de 14 a la de Estados Unidos (26,6 pmp), según los datos aportados por la ONT española (15).

España, gracias al ya conocido como modelo español de donación y trasplantes, o “spanish model” fuera de nuestras fronteras, desarrolló un total de 4.769 trasplantes en 2015, de entre los cuales 2.905 fueron trasplantes renales. Estos datos sitúan a España como uno de los pocos países a nivel internacional que presentan un continuo incremento de los índices de donación (15).

En el caso de la Comunidad Autónoma de Murcia, en el año 2015 alcanzó una tasa histórica de donaciones, y se situó a la cabeza en la lista de comunidades con mayor tasa de donaciones multiorgánicas por millón de población (44,3 donaciones pmp), superando en cinco puntos a la media del país (39,7 donaciones pmp). En total se realizaron 366 trasplantes en la región, de los cuales 68 fueron de riñón (16).

Las exitosas medidas tomadas por la ONT han sido ampliamente descritas en la literatura especializada y entre las más destacadas encontramos las siguientes:

- Una red de coordinadores de trasplante a tres niveles: nacional, autonómico y hospitalario.
- Un programa de calidad en el proceso de donación de órganos, llevado a cabo por los coordinadores de trasplante, y un gran esfuerzo en formación continuada.
- Una oficina central de la ONT que actúa como agencia de servicios en apoyo de todo el sistema y que se encarga de la distribución y transporte de los órganos, del manejo de las listas de espera, de las estadísticas y de la información general y especializada.
- Una gran dedicación a los medios de comunicación con el fin de mejorar el nivel de conocimiento de la población española sobre la donación y el trasplante.
- Una legislación adecuada.

1.3. Problemática y supervivencia de los trasplantados renales

1.3.1. Supervivencia del paciente trasplantado

El trasplante renal es la terapia de elección para la mayoría de las causas de enfermedad renal crónica terminal (ERCT), ya que se asocia con una mayor supervivencia del paciente, una mejora en la calidad de vida y un coste menor que el tratamiento sustitutivo con diálisis (17).

En la **Tabla 1.3** podemos ver las tasas de supervivencia para el paciente y para el injerto (18).

Tabla 1.3. Tasas de supervivencia del injerto (censurando la muerte) y del paciente en las distintas modalidades de trasplante en la era de la moderna inmunosupresión

	Trasplante renal con donante cadáver ^a	Trasplante renal con donante vivo ^a
Supervivencia Injerto		
1 año	93	96
5 años	85	90
10 años	70	80
Supervivencia Paciente		
1 año	96	98
5 años	87	90
10 años	72	80

^aTasas expresadas en tanto por ciento

La esperanza de vida a corto plazo del paciente trasplantado renal ha mejorado considerablemente en los últimos años. Sin embargo no lleva una trayectoria paralela con los datos de supervivencia obtenidos para los trasplantes a medio y largo plazo, debido entre otras causas a la elevada mortalidad que presentan estos pacientes por causa cardiovascular, tumoral e infecciosa (18).

- Enfermedad cardiovascular en los pacientes trasplantados renales

La enfermedad cardiovascular en los pacientes trasplantados renales con injerto funcionante es la principal causa de muerte, suponiendo entre el 30-40% de la mortalidad a largo plazo. Además, con respecto a la población general, está incrementada en 3-4 veces (19).

Esta elevada mortalidad cardiovascular no se explica suficientemente bien por los tradicionales factores de riesgo vascular, por lo que es posible que otros factores no tradicionales contribuyan a esa menor supervivencia del paciente trasplantado como el

tiempo que permanece el paciente en diálisis, una historia previa de diabetes mellitus o de enfermedad cardiovascular, o la disfunción del injerto (18).

Asimismo, en estos enfermos la presencia de calcificaciones vasculares pretrasplante, la hiperhomocisteinemia, la inflamación, el síndrome metabólico o la hipertrofia ventricular izquierda son entidades clínicas muy prevalentes que pueden incrementar el riesgo de muerte tras el trasplante.

- Enfermedad tumoral en los pacientes trasplantados renales

El desarrollo de una neoplasia en estos pacientes puede producirse por tres vías diferentes: por transmisión de la enfermedad a partir del donante, por recurrencia de un tumor previo o por aparición de un nuevo tumor.

El cáncer supone una mortalidad de entre un 9 y un 12% en los pacientes trasplantados (20). Además en este tipo de pacientes se caracteriza por una progresión más rápida y por tanto una tasa mayor de mortalidad.

Aunque no se conocen exactamente los mecanismos de este fenómeno, dos podrían ser los que hacen que la inmunosupresión favorezca el desarrollo del cáncer. El primero de ellos sería por acción directa de ciertos fármacos inmunosupresores, ya que hay datos que sugieren que tanto la ciclosporina como el tacrolimus podrían inducir la expresión del factor de crecimiento transformante beta1, asociado con la invasión y diseminación de los tumores (21). El segundo está relacionado con la depresión sostenida del sistema inmune, favoreciendo las infecciones oportunistas por virus con potencial oncogénico y alterando componentes del sistema inmune como las células “natural killer”, involucradas en la vigilancia inmunológica y la eliminación temprana de células neoplásicas (20). Además, factores de riesgo como la edad, el hábito tabáquico, el

antecedente de otras neoplasias previas al TR y las infecciones víricas, van a contribuir de forma directa a esta mayor mortalidad de origen tumoral (22).

- Enfermedades infecciosas en los pacientes trasplantados renales

Las infecciones, a pesar de los avances en prevención desarrollados para pacientes trasplantados, siguen siendo una de las principales complicaciones (20-30%), pudiendo en ocasiones condicionar la supervivencia del paciente y del injerto.

El paciente trasplantado tiene un riesgo aumentado de adquirir infecciones debido al empleo de técnicas invasivas durante el trasplante, a los sondajes posteriores y a la terapia de inmunosupresión que reciben. Además, muchos pacientes son añosos y/o diabéticos, factores que favorecen el desarrollo de una infección.

El tipo de infección que suelen presentar los pacientes trasplantados va cambiando según avanza la etapa postrasplante: en el primer mes suelen aparecer infecciones nosocomiales por bacterias multirresistentes derivadas de la intervención quirúrgica y del uso de sondaje vesical y catéteres intravenosos; en el período comprendido entre el primer y el sexto mes los pacientes presentan mayor riesgo de infecciones oportunistas debido a que la terapia de inmunosupresión es máxima (enfermedad por citomegalovirus, infección fúngica invasora, etc.); a partir del sexto mes los pacientes presentarían infecciones comunitarias, de forma similar a la población general, pero también puede producirse reactivación de ciertos virus latentes (virus BK, citomegalovirus), siendo la enfermedad por citomegalovirus la infección viral más frecuente (23).

1.3.2. Supervivencia del injerto

El número de casos de rechazo agudo ha disminuido notablemente a lo largo de las dos últimas décadas, con un consecuente aumento de la supervivencia del injerto en el primer año. Sin embargo, los resultados a largo plazo no han mejorado tanto, desconociéndose aún los motivos de esta diferencia (24).

Se piensa que la falta de mejora de supervivencia a largo plazo es por el empleo en el trasplante de órganos con criterios expandidos, es decir, órganos de pacientes añosos, con antecedentes de hipertensión, con aumentos de creatinina previos o con infarto de miocardio.

Los datos de supervivencia registrados en España varían de unos estudios a otros, no obstante, todos muestran un aumento de ésta. En el caso del Grupo Español para el Estudio de la Nefropatía Crónica del Trasplante, sus resultados mostraron una reducción de la tasa de rechazo agudo del 46,0 al 15,8 % entre 1990 y 2002, acompañada de un aumento no significativo en la vida media del injerto censurando la muerte del paciente (24). Otro estudio nacional, en este caso un estudio unicéntrico realizado con más de 1400 pacientes, mostró que entre los períodos 1985-1995 y 1996-2005 se produjo un aumento significativo en la vida media del injerto renal de casi 1 año (25).

En la **Tabla 1.4** se muestran los principales factores de riesgo, inmunológicos y no inmunológicos, para la pérdida de los injertos renales, siendo el rechazo agudo un factor de riesgo de primera magnitud, especialmente si coexiste con otros factores no inmunológicos como el retraso en el inicio de la función o la edad avanzada del donante (26).

Tabla 1.4. Factores de riesgo inmunológicos y no inmunológicos asociados a mayor riesgo de pérdida de los injertos renales.

Factores de riesgo inmunológico	Factores de riesgo no inmunológico
<ul style="list-style-type: none"> • Rechazo agudo • Rechazo subclínico • Escasa compatibilidad HLA • Sensibilización previa con anticuerpos anti-HLA • Falta de cumplimiento terapéutico • Escasa inmunosupresión 	<ul style="list-style-type: none"> • Daño por isquemia-reperfusión • Muerte cerebral • Edad del donante • Desbalance ponderal donante-receptor • Proteinuria • Hiperlipidemia, diabetes mellitus • Hipertensión arteria • Nefrotoxicidad por anticalcineurínico • Otros: infecciones, radicales libres, tabaco, etc

Combatir estos factores de riesgo es la principal prioridad de los equipos de trasplante y, para ello, es imprescindible seguir una serie de protocolos en la selección y seguimiento del paciente como son: una adecuada selección del receptor en función de las características del donante; un adecuado seguimiento post-TR mediante la monitorización de la función renal, de los niveles de inmunosupresores y del estado clínico; evitar infecciones tanto en el trasplante como en el periodo posterior; un control ponderal y del estado metabólico del paciente; evitar posibles agentes nocivos contra el injerto; etc.

1.4. Marcadores de seguimiento y evaluación del injerto

1.4.1 Marcadores tradicionales de seguimiento y evaluación del injerto

El seguimiento y evaluación del funcionamiento del injerto en el periodo postrasplante, están basados principalmente en la monitorización de los niveles de

proteinuria y de creatinina sérica (CrS). Con la CrS vamos a determinar el filtrado glomerular estimado (FGe) o aclaramiento de creatinina estimado mediante fórmulas específicas. Cuando se produce una alteración de los parámetros evaluadores o si la clínica lo requiere, se realizará una biopsia renal para ver el estado histológico del injerto.

1.4.1.1. Creatinina

La creatinina es un metabolito generado a partir de la degradación de la creatina muscular, cuyos niveles séricos están influenciados por un gran número de factores como la edad, la masa muscular, el sexo, la hidratación y la medicación concomitante del paciente. Su monitorización es fácil, llevándose a cabo simplemente con una extracción periódica de sangre.

El principal problema del uso de este metabolito como referencia para la evaluación de la función renal es que, además de estar influenciado por numerosos factores, sus niveles aumentan cuando el rechazo está ya en un estadio avanzado y se ha perdido una gran parte de la función renal (27). Esto conlleva un retraso en la detección del rechazo y, consecuentemente, en la toma de las medidas terapéuticas adecuadas.

1.4.1.2. Filtrado glomerular

Para el cálculo del FGe siempre se ha empleado la fórmula del aclaramiento de creatinina (Acl.Cr), que emplea la CrS y la creatinina en orina (CrO), pero en los últimos años está siendo sustituida por nuevas fórmulas de cálculo debido al empleo cada vez menos frecuente de la orina de 24 horas como muestra diagnóstica (28).

$$\text{Acl.Cr (mL/min)} = \frac{[\text{CrO (mg/dL)} \times \text{volumen orina (mL)}]}{\text{CrS (mg/dL)} \times \text{tiempo (min)}}$$

Las nuevas fórmulas para el cálculo de la FGe son la fórmula CKD-EPI y la fórmula MDRD-4. Ambas incluyen la edad, el sexo, la raza y la creatinina sérica del paciente.

$$\text{MDRD-4 variables (mL/min/1.73m}^2\text{)} = [186,3 \text{ (mg/dL)} \times \text{CrS}^{-1,154} \times \text{Edad}^{-0,203} \times 0,742 \text{ (Si mujer)} \times 1,21 \text{ (si afroamericano)}]$$

$$\text{CKD-EPI (mL/min/1.73m}^2\text{)} = [141 \times \text{min (CrS (mg/dL)/ k ó 1)}^\alpha \times \text{max (CrS (mg/dL)/ k ó 1)}^{-1,209} \times 0,993^{\text{edad}} \times 1,018 \text{ (Si mujer)} \times 1,159 \text{ (Si afroamericano)}]$$

K: 0,7 si mujer; 0,9 si hombre

α : -0,329 si mujer; -0,411 si hombre

Min: El mínimo de CrS (mg/dL)/ k o 1

Max: El máximo CrS (mg/dL)/ k o 1

El uso de las nuevas fórmulas de estimación del FG tiene algunas limitaciones y no se deben emplear en los siguientes casos: individuos que siguen dietas especiales (vegetariana estricta o hiperproteica), pacientes menores de 18 años, sujetos con alteraciones importantes en la masa muscular (amputaciones, enfermedades con pérdida de masa muscular con índices de masa corporal extremos ($< 19 \text{ kg m}^{-2}$ o $> 35 \text{ kg m}^{-2}$), en el embarazo, o cuando se requiere una estimación más precisa del FG (1). Es en todos estos casos en los que se sigue empleando la determinación del Acl.Cr.

1.4.1.3. Proteinuria

La proteinuria o excreción de proteínas en orina, se ha medido tradicionalmente en orina de 24 horas, pero la inadecuada recogida de la muestra en un gran número de

casos ha conducido a los especialistas a la utilización del cociente proteínas urinarias / creatinina urinaria (PtO CrO^{-1}). Este cociente se mide en la orina de primera hora de la mañana y nos ofrece una estimación bastante exacta de la proteinuria excretada por el paciente durante un día completo (28).

La presencia de proteinuria postrasplante es un factor de riesgo importante para el desarrollo de nefropatía crónica del injerto. Es posible que la proteinuria pueda causar un daño tubulointersticial y contribuya al daño renal en la nefropatía crónica, siendo por tanto un marcador de mal pronóstico en los pacientes trasplantados renales y que influye negativamente en la progresión del injerto, en su supervivencia y, lo que es más importante, en la supervivencia del paciente.

El hallazgo de proteinuria en un paciente trasplantado debe ser siempre estudiado para ver su etiología (29), siendo necesario en muchas ocasiones hacer una biopsia para una adecuada categorización de la misma (30). Por tanto, la proteinuria nos va a anunciar que hay un problema renal, pero tampoco nos aclara la etiología del mismo, para lo cual habría que recurrir a la biopsia.

1.4.1.4. Biopsia del injerto

La biopsia, considerada como el “Gold-Standard” para el diagnóstico de un rechazo del injerto, es un procedimiento invasivo, costoso y que requiere de un equipo con un alto grado de formación para llevarlo a cabo. Además, a pesar de haberse optimizado mucho en los últimos años consiguiendo una muy alta seguridad en la intervención (31), el riesgo de hemorragias y la consecuente pérdida del órgano trasplantado es algo que a día de hoy todavía ocurre.

La interpretación del análisis de la biopsia tomada no es tarea fácil, pudiéndose

encontrar grandes diferencias interobservador. Igualmente, se necesita una buena comunicación entre nefrólogo y patólogo, además de una minuciosa recogida de datos clínicos (32).

Esta dificultad en la valoración e interpretación de la muestra, sumada a los posibles errores que se puedan cometer en la toma de muestra de la biopsia, hacen que sea un proceso difícil de estandarizar y por tanto difícil de optimizar al máximo, a pesar de los grandes avances conseguidos en los últimos años en este campo gracias al empleo de las técnicas más innovadoras.

1.4.2. Nuevos parámetros para la evaluación y seguimiento del injerto

Dada la falta del marcador idóneo para el seguimiento del estado del injerto tras el trasplante, son múltiples los estudios que han surgido encaminados a la búsqueda de un marcador que nos permita fácilmente la monitorización de la función del órgano trasplantado, y nos haga saber de una forma precisa e incipiente cuando se va a producir un rechazo.

El marcador ideal para la monitorización de un trasplante debe cumplir una serie de requisitos que se describen a continuación (33):

- Marcador determinado en muestras de fácil acceso (sangre, orina, etc.).
- Estable en la muestra tras la recogida de la misma.
- Método simple, económico y reproducible.
- Robusto y apto para diferentes diluciones.
- Sensible y específico.
- Capaz de diferenciar diferentes grados y tipos de rechazo.

Durante más de cuatro décadas, la evaluación del injerto se ha llevado a cabo mediante la monitorización de diferentes metabolitos (34). Sin embargo en los últimos años, además del estudio de estos metabolitos comúnmente conocidos, se han estudiado nuevas líneas de marcadores de rechazo que van desde marcadores inmunológicos, celulares y de inflamación, hasta marcadores descubiertos a raíz de la aparición de las nuevas ciencias “ómicas” como la transcriptómica (35), la proteómica (36) y la metabolómica (33).

1.4.3. Empleo de la lipidómica en la búsqueda de nuevos marcadores

La lipidómica es una de las ciencias holísticas surgidas en los últimos años derivada de la metabolómica, que se dedica al estudio y caracterización del conjunto de los lípidos celulares y de sus metabolitos, de las moléculas con las que interactúa y de sus funciones en el organismo (37).

Esta ciencia surge a partir de los avances en una modalidad de la espectrometría de masas, que combinada con técnicas de separación como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), permiten hoy día de una forma fiable, rápida y sensible, la detección de una gran variedad de especies lipídicas en muestras de pequeño volumen.

Clásicamente se ha considerado que los lípidos cumplen dos funciones generales, una estructural en las membranas celulares y otra almacenadora de energía. Sin embargo, los avances científicos han evidenciado que hay miles de especies de lípidos diferentes en el cuerpo humano, sugiriendo la existencia de funciones aún no exploradas (37) desarrolladas por los mismos y/o por sus metabolitos.

Muchos de estos metabolitos son eliminados por orina, ya sea en su forma libre o en su forma conjugada con ácido glucurónico o grupos sulfato (38), hecho que permite su fácil monitorización al tratarse de una muestra no invasiva, algo fundamental para un marcador de monitorización de una patología crónica como es el trasplante renal (33).

1.5. Estrés oxidativo. Marcadores de patologías

1.5.1. Estrés oxidativo y sistema antioxidante

Hace ya más de 200 años que se empezó a hablar de los efectos nocivos del oxígeno sobre las células debido a su potencial como agente oxidante, pero no fue hasta la década de los 50 del siglo XX cuando este mecanismo patogénico, conocido hoy como estrés oxidativo (EO), se empezó a estudiar (39).

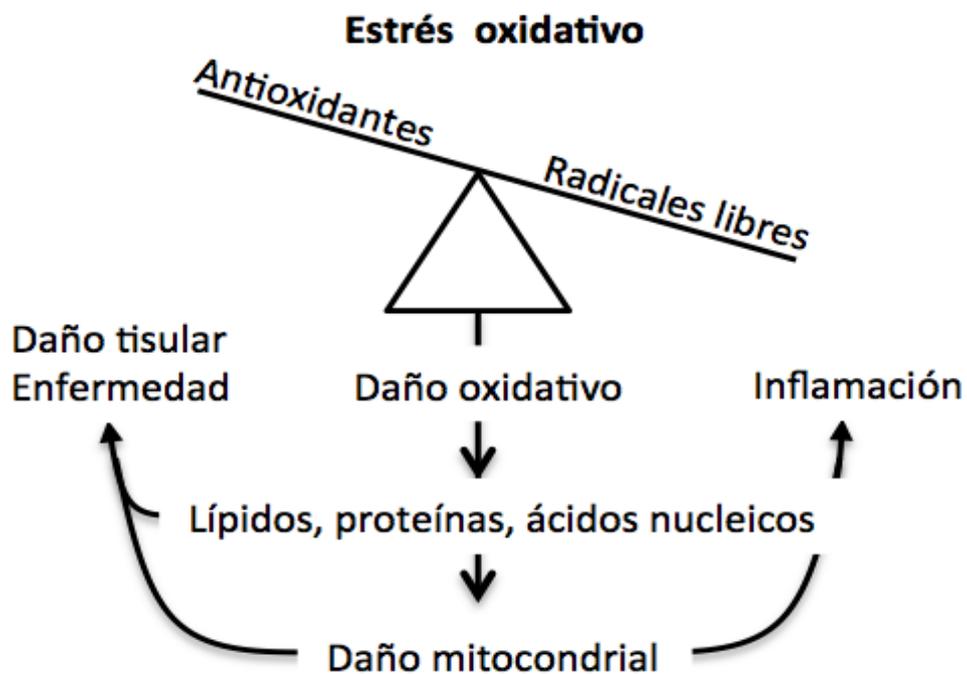


Figura 1.2. Instauración del estrés oxidativo y consecuencias desencadenadas. *Fuente:* Lab. Dr. Echevarne.

La instauración del EO ocurre cuando se genera un desequilibrio entre la producción de radicales libres (RL) y la capacidad de defensa frente a los mismos del sistema antioxidante de un organismo (**Figura 1.2**).

El sistema antioxidante de un ser vivo tiene dos funciones fundamentales, por una parte se encarga de evitar que se produzcan daños sobre la célula mediante la neutralización rápida de los RL generados, y por otra de reparar el daño ya causado por los mismos.

Existen diversos antioxidantes en el organismo, habiendo sido clasificados por algunos autores como primarios y secundarios (40) (**Tabla 1.5**). Entre ellos los más estudiados son las enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (41).

Tabla 1.5. Clasificación de los diferentes antioxidantes. *Fuente: Rosado-Pérez J. Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus (40).*

Antioxidantes primarios		Antioxidantes secundarios
Enzimas	Proteínas	
		Vitaminas E y C
		Vitamina A y carotenos
Superóxido dismutasa	Transferrina	Ácido úrico
Glutatión peroxidasa	Ceruloplasmina	Bilirrubina
Catalasa	Albúmina	Albúmina
	Metalotioneínas	Melatonina
		Estrógenos

Cuando la capacidad de neutralización de RL del sistema antioxidante se ve sobrepasada, ya sea por un exceso de producción de RL o por una limitada capacidad antioxidante, se desencadena un daño celular por EO que puede afectar a los

aminoácidos de las proteínas, a los lípidos celulares y al ADN. Cuando el EO es severo llega producir la apoptosis e incluso la necrosis celular (42).

El efecto tóxico que presentan los RL sobre las células se debe primordialmente a la presencia en su estructura de un electrón desapareado que actuará como oxidante sobre otras moléculas del organismo (43).

1.5.2. Síntesis de radicales libres

La síntesis de RL en el organismo es un mecanismo natural e indispensable para la función inmune (44), pero que cuando se prolonga puede ser un problema para las células y sus funciones, ya que el sistema antioxidante se agotará generando un daño que puede llegar a ser irreversible.

Los principales RL producidos en el organismo son los derivados de la respiración aerobia y se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO). Estos se forman por la reducción secuencial del oxígeno, originando primero el ión radical superóxido, posteriormente al peróxido de hidrógeno y finalmente al radical hidroxilo, el más reactivo de todos (**Figura 1.3**).

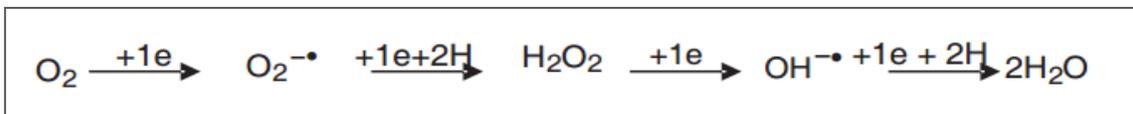


Figura 1.3. Reacción de reducción secuencial del oxígeno con la generación de radicales libres de oxígeno.

El producto final de esta cadena de reacciones puede ser la molécula de agua, en cuyo caso las posibilidades de daño al organismo son menores. Sin embargo, considerando

que éste es un sistema dinámico, es probable que se den otras interacciones bioquímicas que conduzcan a la síntesis de más RL y a su acumulación.

La propagación de la síntesis de RL se suele producir por la presencia de iones metálicos reductores o de compuestos derivados de nitrógeno que la favorecen, o como consecuencia de un déficit en los donadores de electrones necesarios para estabilizar estos RL producidos en exceso (40). Esta excesiva producción de RL puede ser de origen endógeno, producidos por el organismo en su funcionamiento habitual, o exógeno, debido a factores externos (42) (**Tabla 1.6**).

Tabla 1.6. Mecanismos de producción de radicales libres.

Endógenos	Exógenos
Respiración mitocondrial	Contaminación ambiental
Activación de leucocitos polimorfonucleares	Obesidad, sedentarismo y hábitos tóxicos
Metabolismo del ácido araquidónico	Estrés prolongado
Acciones enzimáticas	Exposición indebida al sol
	Fenómeno de isquemia-reperfusión
	Insuficiencia renal crónica

1.5.3. Monitorización del estrés oxidativo

La adecuada monitorización del efecto del EO sobre las células no es tarea fácil debido, entre otras cosas, a que las ERO son moléculas muy inestables que van a permanecer intactas en la muestra biológica durante un breve periodo de tiempo.

Los principales métodos de medida que se emplean para su determinación son: la fluorimetría, la espectrofotometría y la quimioluminiscencia. En algunos de estos métodos, basados en las propiedades reducción-oxidación (REDOX) que tienen las

ERO, es necesario añadir enzimas inhibidoras específicas para cada reacción, ya que podemos encontrar grandes interferencias debido a la presencia de artefactos con propiedades similares (43).

La complejidad en la determinación de las ERO y los diferentes efectos que pueden generar *in vivo* estas moléculas en función de su potencia, del potencial antioxidante del organismo y de las diferentes localizaciones celulares donde se generan (45), ha convertido la monitorización del EO en la determinación de metabolitos intermedios generados por este mecanismo en el organismo, opción que es mucho más realista si lo que pretendemos es ver los verdaderos efectos producidos por las ERO sobre las células del organismo.

Esta nueva línea de medida surgió gracias a los avances tecnológicos y al desarrollo de nuevas técnicas para su determinación. Una de las utilizadas para la determinación de este tipo de compuestos es la espectrometría de masas, que nos permite la determinación de cientos o miles de metabolitos a la vez, entre los cuales encontramos los productos de degradación del ADN, de proteínas y de lípidos (46). Gracias a estos avances en las técnicas de medida de estos biomarcadores, cada día son más los proyectos diseñados para el estudio de la influencia del EO en las diversas patologías.

1.5.4. Estrés oxidativo y patologías relacionadas

Numerosas son las enfermedades que se han relacionado con el EO y en las que se ha estudiado su influencia (44). En la **Tabla 1.7** se citan algunas en función del órgano o sistema afectado, y entre ellas la patología renal.

Tabla 1.7. Algunas de las enfermedades relacionadas con el EO.

Corazón	Fenómenos de trombosis e hipertrofia
Sistema Nerviosos Central	Parkinson y demencia
Articulaciones	Artritis reumatoide
Tracto gastrointestinal	Pancreatitis y hepatotoxicidad
Ojos	Cataratas y retinopatía
Enfermedades multiorgánicas	Inflamación, intoxicaciones, envejecimiento, isquemia y cáncer
Vasos circulatorios	Aterosclerosis
Eritrocitos	Anemia de Fanconi y malaria
Riñón	Insuficiencia renal y fenómeno de isquemia-reperusión durante el trasplante
Piel	Psoriasis y quemaduras
Pulmón	Asma

1.5.5. Estrés oxidativo y función renal

Al igual que en otros órganos, la influencia del EO sobre el riñón va a tener consecuencias sobre su función y su supervivencia, habiéndose encontrado elevado en pacientes con ERC (47), sometidos a diálisis (48), en el retraso en el inicio de la función tras el trasplante renal (49) y en el rechazo del injerto (50).

Diversas explicaciones fisiopatológicas se han dado para el aumento de EO encontrado en pacientes con ERC y para los sometidos a tratamiento con diálisis como son: una disponibilidad disminuida de grupos “tioles” debido a la malnutrición e hipoalbuminemia que presentan estos pacientes; el déficit de vitaminas antioxidantes; el estado urémico que presentan con la retención de solutos que potencian su patogenicidad; los fenómenos inflamatorios e infecciosos; etc.

Por otro lado, el retraso en el inicio de la función del órgano trasplantado, hecho habitual en el trasplante renal, también se ha relacionado con el EO. Este

acontecimiento se debe al período variable de hipoperfusión e isquemia que ocurre desde que se extrae el órgano del donante hasta que se injerta en el receptor y que se conoce como fenómeno de isquemia-reperfusión. Durante dicho periodo se va a generar una depleción energética que será la responsable de la cascada de eventos bioquímicos acontecidos, eventos que conducen a una situación de desequilibrio oxidativo y que desencadenan una disfunción celular y eventualmente la muerte de la misma (51).

Este desequilibrio en el balance oxidativo se debe al exceso de producción de EROs al reperfundir el órgano, y a la escasez de mecanismos de defensa antioxidante en el tejido renal, como son la disminución de vitamina E en la corteza y la falta de disponibilidad de glutatión reducido, consecuencia de una disminución de su síntesis o a un aumento de su consumo. Cuando el injerto es reperfundido se da una llegada masiva de oxígeno que completa los requisitos para la producción de ERO, ya sea mediante la cadena de reacciones de reducción secuencial del oxígeno o por medio de los leucocitos polimorfonucleares activados en espacios donde los sistemas antioxidantes se encuentran más deprimidos, como el intersticio, la orina o el espacio intravascular (51).

Con respecto al nivel de EO que tienen los pacientes trasplantados comparados con sujetos sanos, se ha visto un notable incremento en los primeros, debido probablemente a la infiltración leucocitaria que se da en el órgano tras ser trasplantado, al estado urémico que sufre el paciente y a la disminución de los antioxidantes disponibles (52). Dentro de este grupo de pacientes, el rechazo del injerto es una de las principales preocupaciones de los nefrólogos tras el trasplante, situación que aunque se ha conseguido controlar en gran medida su incidencia aún es elevada.

Es por ello por lo que el estudio de la influencia que tiene el EO en el rechazo es hoy día una importante línea de investigación, que tiene el objetivo de esclarecer los motivos y

la bioquímica del rechazo, y de valorar la necesidad de suplementar con antioxidantes a este tipo de pacientes (50).

1.6. Lipoperoxidación y marcadores de estrés oxidativo: isoprostanos, neuroprostanos y F₂-dihomo-isoprostanos

1.6.1. Lípidos y sus funciones

Desde siempre se ha considerado que los lípidos cumplen dos funciones principales, una estructural formando parte de las biomembranas, y otra almacenadora de energía en forma de gotas de lípidos intracelulares y de lipoproteínas plasmáticas. Sin embargo, los avances tecnológicos han puesto de manifiesto que hay miles de tipos de lípidos diferentes en el cuerpo humano, sugiriendo la existencia de funciones aún no exploradas (37).

Es por ello que no debe extrañarnos que cada día haya más proyectos centrados en el estudio del lipidoma (conjunto de lípidos en una célula, tejido u organismo) y su relación con las diversas patologías conocidas, siendo la lipidómica la ciencia encargada de su estudio, y que se ocupa de la caracterización del conjunto de lípidos que lo componen, de las moléculas con las que interactúan y de sus diferentes funciones en el organismo.

Entre las funciones descubiertas de los lípidos encontramos: la participación en las vías de señalización celular; el direccionamiento de las proteínas hacia su destino celular y anclaje de las mismas a la membrana; la regulación de la entrada de toxinas, virus y bacterias; la participación en la regulación del ciclo celular; etc.

1.6.2. Peroxidación lipídica o lipoperoxidación

La destrucción de los lípidos por EO se conoce como peroxidación lipídica o lipoperoxidación, hecho que va a desencadenar diversas alteraciones en sus funciones como la alteración de la fluidez de la membrana, la inactivación de receptores y enzimas unidos a la misma, el aumento de su permeabilidad a iones y productos tóxicos, e incluso su ruptura.

La lipoperoxidación es un complejo proceso que se da tanto en plantas como en animales. Los primeros estudios encontrados al respecto se llevaron a cabo en grasas y aceites animales desde el campo de la nutrición y la industria alimentaria, siendo una de las primeras descripciones de la peroxidación lipídica la realizada por De Saussure, quien a finales de los años 20 empleó un simple manómetro de mercurio para estudiar el consumo de oxígeno de una capa de aceite de nuez en agua (53). Rápidamente algunos investigadores asociaron este mecanismo de destrucción de lípidos con patologías animales, como consecuencia del daño generado en la membrana celular (54), desarrollándose así múltiples estudios en torno a este campo.

1.6.3. Etapas de la lipoperoxidación

La peroxidación lipídica, o lipoperoxidación, es una reacción en cadena que se desarrolla en tres fases y que se caracteriza por la sustracción repetitiva de hidrogeniones de un grupo metileno (**Tabla 1.8.**).

Tabla 1.8. Esquema simplificado de las principales reacciones involucradas en el proceso de peroxidación lipídica.

Inicio		
$AGP-H + X^{\cdot}$	\rightarrow	$AGP^{\cdot} + X-H$
Propagación	Ramificación	
$AGP^{\cdot} + O_2 \rightarrow AGP-OO^{\cdot}$	$AGP-OOH + Fe^{2+} \rightarrow O^{\cdot} + AGP-O^{\cdot} + Fe^{3+}$	
$AGP-OO^{\cdot} + AGP-H \rightarrow AGP-OOH + AGP^{\cdot}$	$AGP-H + AGP-O^{\cdot} \rightarrow AGP^{\cdot} + AGP-OH$	
Terminación		
$AGP-OO^{\cdot} + AGP-OO^{\cdot}$		
$AGP-OO^{\cdot} + AGP^{\cdot}$	\rightarrow	PNR
$AGP^{\cdot} + AGP^{\cdot}$		
$AGP-OO^{\cdot} + ANT-X-H$	\rightarrow	$AGP-OOH + ANT-X^{\cdot}$
$AGP-OO^{\cdot} + ANT-X^{\cdot}$	\rightarrow	PNR
$ANT-X^{\cdot} + ANT-X^{\cdot}$	\rightarrow	PNR
$AGP-OOH + Fe^{2+}$	\rightarrow	$Fe^{3+} + PNR$
$AGP^{\cdot} + Fe^{2+}$	\rightarrow	$Fe^{3+} + PNR$

AGP: lípido; X^{\cdot} : radical libre iniciador; AGP^{\cdot} , $AGP-O^{\cdot}$, $AGP-OO^{\cdot}$: radicales libres producidos a partir de AGP; AGP-OOH. Hidroperóxido lipídico; ANT-X: antioxidante; $ANT-X^{\cdot}$: radical libre del antioxidante; PNR: producto no radicalico

Las tres fases en las que se desarrolla la lipoperoxidación son las siguientes:

1.6.3.1. Inicio de la lipoperoxidación

El inicio de esta reacción se origina por el ataque de cualquier especie con suficiente reactividad para sustraer un átomo de hidrógeno a un grupo metileno de un ácido graso poliinsaturado (AGP). El carbono del grupo metileno suele estar flanqueado por dobles enlaces, hecho que facilitará la sustracción del hidrógeno unido al átomo de carbono. Es por ello por lo que los AGP presentan una alta susceptibilidad a la peroxidación.

Los radicales formados tras la sustracción del átomo de hidrógeno se estabilizarán por resonancia con el doble enlace, dando lugar a dienos conjugados y formando diferentes productos en función de la estructura del ácido graso, el cual presenta distintos puntos de su cadena carbonada donde se puede dar la eliminación inicial del átomo de hidrógeno (55).

1.6.3.2. Propagación de la lipoperoxidación.

La segunda etapa, la de propagación, es termodinámica y cinéticamente favorable, motivo por el cual no es de extrañar que se genere una reacción en cadena con un número creciente de ácidos grasos afectados y con la acumulación de RL.

En ésta, la especie radicalica formada en la primera fase reaccionará con el oxígeno, generando un radical peroxilo que a su vez puede reaccionar con otros AGP adyacentes, originando un hidroperóxido y un radical alquílico. El hidroperóxido formado, en presencia de iones metálicos como el Fe^{2+} , puede generar más RL mediante un ciclo REDOX con los mismos, hecho que se conoce como fase de ramificación. Por otra parte, el radical alcóxido puede generar reacciones en cadena adicionales, ya que posee un potencial de reducción superior al del radical iniciador.

La continuación o no de la cadena de propagación antes de la terminación depende de factores como la concentración de oxígeno y antioxidantes presentes en el medio. Esta fase continuará hasta que el sistema antioxidante consiga neutralizar los RL formados y empiece entonces la fase de terminación o descomposición.

1.6.3.3. Terminación de la lipoperoxidación.

En la fase de terminación los hidroperóxidos formados se descompondrán o se combinarán entre sí formando etano, pentano, aldehídos reactivos y cetonas. Los

aldehídos formados en esta fase, como el malonildialdehído y el 4-hidroxinonal, pueden llegar a reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos desencadenando efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos (55).

Como se ha descrito anteriormente, en la peroxidación lipídica se pueden generar una gran variedad de metabolitos derivados de los ácidos grasos, que serán diferentes en función de la localización celular, de las condiciones del medio, de la especie radicalica, de la estructura del ácido graso, etc. Los AGP de los cuales proceden los metabolitos de nuestro estudio, se forman unos a partir de otros a través de la vía de metabolización descrita en la **Figura 1.4**.

Linoléico	18:2 <i>n</i> -6		18:3 <i>n</i> -3	Alfa-linolénico
	↓	Desaturasa	↓	
Gamma linoléico	18:3 <i>n</i> -6		18:3 <i>n</i> -3	Estearidónico
	↓	Elongasa	↓	
Dihomo-γ-linolénico	20:3 <i>n</i> -6		20:4 <i>n</i> -3	Eicosatetraenoico
	↓	Desaturasa	↓	
Araquidónico	20:4 <i>n</i> -6		20:5 <i>n</i> -3	Eicosapentaenoico
	↓	Elongasa	↓	
Adrénico	22:4 <i>n</i> -6		22:5 <i>n</i> -3	Docosapentaenoico
	↓	Desaturasa	↓	
Docosapentaenoico	22:5 <i>n</i> -6		22:6 <i>n</i> -3	Docohexaenoico

Figura 1.4. Metabolización de ácidos grasos poliinsaturados *n*-6 y *n*-3. Vías de desaturación y elongación de los ácidos linoléico y α-linolénico.

A partir de ellos se genera una gran variedad de metabolitos lipídicos, entre los cuales nosotros hemos estudiado tres grupos: isoprostanos (IsoPs) procedentes del ácido araquidónico (AA), neuroprostanos (NeuroPs) procedentes del *n*-6-ácido docosapentaenoico (*n*-6 DPA) y del *n*-3 ácido docosahexaenoico (*n*-3 DHA) y los F₂-dihomo-isoprostanos (F₂-dihomo-IsoPs) procedentes del ácido adrenico (AdA).

1.7. Isoprostanos

1.7.1. Definición

Los IsoPs se describieron por primera vez por Morrow y colaboradores en 1990 como metabolitos generados *in vivo* por la acción de las ERO (principalmente de peróxidos y superóxidos) sobre el AA (C₂₀:₄ *n*-6) (56). Este mismo grupo de investigadores pronto publicó los primeros artículos relacionados con sus funciones en el organismo, y su relación con el EO y ciertas patologías (57,58).

Desde ese momento, la literatura científica relacionada con estos compuestos aumentó exponencialmente con estudios enfocados tanto a su relación con diversas patologías como con sus funciones en el organismo, considerándose a día de hoy como los marcadores “*Gold Standard*” (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA) para la monitorización del EO (59).

1.7.2. Síntesis y nomenclatura

Los IsoPs se generan a partir del AA esterificado con los fosfolípidos de membrana por la acción de ERO, y posteriormente se liberan de éstos por la acción de

las enzimas fosfolipasas (60). Sus niveles en el organismo dependen principalmente de su producción, y no del metabolismo y excreción, hecho que les hace ser buenos marcadores de EO *in vivo*, tal y como expusieron Roberts y Morrow en el año 2000 (61).

Las especies radicálicas que atacan al AA tienen la capacidad de sustraer un átomo de hidrógeno de su molécula, dando lugar a la formación de cuatro isómeros de la PGH₂. Cada uno de estos cuatro isómeros formados, puede ser completamente reducido dando lugar a otros cuatro isómeros diferentes de la PGF_{2α}, o parcialmente reducido dando lugar a isómeros de la PGE₂ o PGD₂ (**Figura 1.5**).

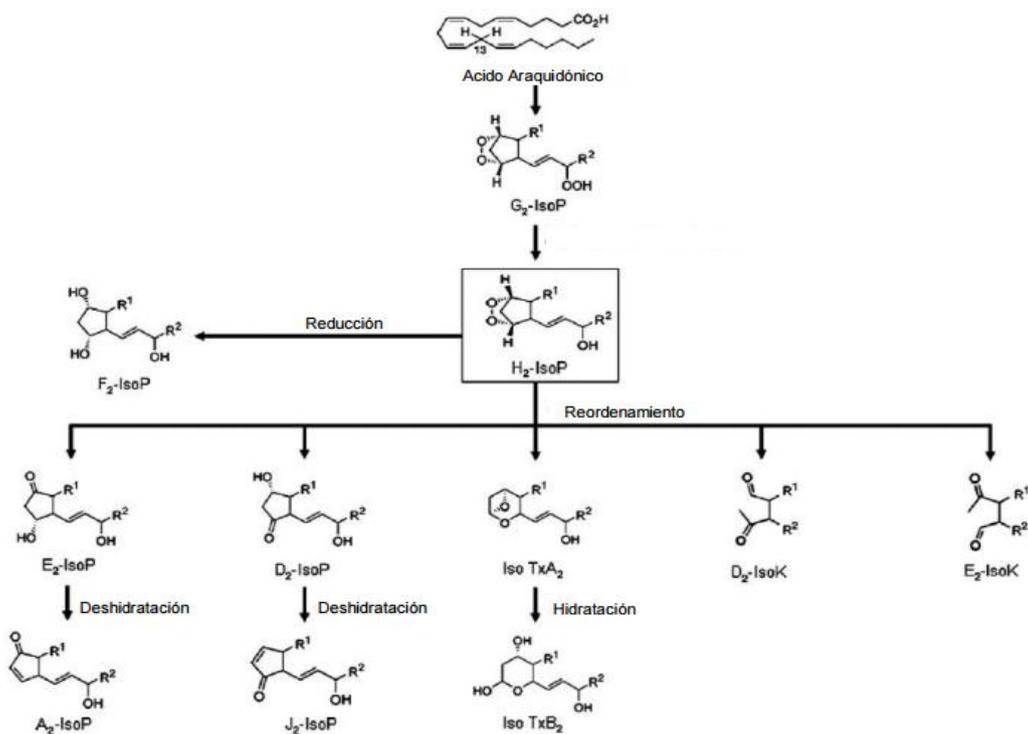


Figura 1.5. Vía de los IsoPs inducida por la oxidación del ácido araquidónico por radicales libres. Tx: tromboxano, IsoK: isoketals. Fuente: Gonzalez-Luis y col. 2010.

Estructuralmente los IsoPs son compuestos muy similares a las prostaglandinas (PGs), diferenciándose de éstas únicamente en la orientación de las cadenas laterales alquílicas

que se unen al anillo prostano. En los primeros las cadenas laterales tienen normalmente una orientación *cis*, mientras que en las PGs suelen encontrarse en posición *trans* (62).

Al principio se adoptó una nomenclatura en paralelo a la de las PGs, como por ejemplo 8-iso-PG, sin embargo esta nomenclatura no permitía la diferenciación de las numerosas estructuras isoméricas. Por ello se propusieron dos nomenclaturas adicionales para los IsoPs: la nomenclatura de Taber (63), en la que el 8-iso-PGF_{2α} se denomina 15-F_{2t}-IsoP, y la de Rokach (64), en la que se le denomina iPF_{2α}-III. En la presente Tesis Doctoral se ha empleado la nomenclatura de Taber y colaboradores.

1.7.3. Isoprostanos y estados fisiológicos

Para poder establecer a los IsoPs como biomarcadores de EO de referencia es necesario disponer de un adecuado conocimiento de sus niveles basales, y del entendimiento de las variaciones que se producen en los mismos en los diferentes estados fisiológicos. Hasta la fecha, la mayoría de los datos disponibles se limitan al 8-iso-PGF_{2α}, considerándose este compuesto como el principal marcador de EO conocido en la actualidad.

En condiciones fisiológicas, los IsoPs pueden ser detectados en su forma esterificada en todos los tejidos biológicos y en su forma libre en todos los fluidos del organismo. Sus niveles están influenciados tanto por factores internos (edad, género, raza, estado pre- o post-menopáusico) como por factores externos (tabaco, alcohol, ejercicio, hábitos dietéticos, fármacos) (59).

El hallazgo de niveles significativos de IsoPs en tejidos y fluidos biológicos de animales y humanos sin ninguna patología conocida indica que se está produciendo una

peroxidación lipídica de forma natural, debido a un bloqueo incompleto de las EROs sintetizadas por parte de las defensas antioxidantes.

Ciertos estudios sugieren que los niveles urinarios de 8-iso-PGF_{2α} están elevados en varones jóvenes sanos comparados con mujeres premenopáusicas (65) y más elevados en mujeres postmenopáusicas que en premenopáusicas (66), hallazgos que refuerzan la hipótesis de que el proceso normal de envejecimiento celular se podría deber al aumento del daño oxidativo de moléculas biológicas relevantes (64).

Se han estudiado también las posibles diferencias circadianas en las concentraciones urinarias de estos compuestos, no encontrándose variación alguna, así como tampoco se encontraron en función del contenido lipídico de la dieta (67,68). En cuanto al ejercicio físico, se ha descrito que si éste es intenso supone una importante fuente de estrés oxidativo, habiéndolo demostrado varios estudios que hallaron incrementos en los niveles de IsoPs (69), sin embargo, el ejercicio físico moderado no parece aumentar el EO, mejorando incluso el balance oxidativo a largo plazo (70).

1.7.4. Función biológica de los isoprostanos

Dada la analogía estructural de los IsoPs con las PGs, desde un primer momento se sospechó que estos metabolitos debían tener una función específica y similar a la de éstas sobre el tono vascular y la agregación plaquetaria (58), sin embargo posteriormente se ha observado que su actividad biológica es más amplia y diversa que la que se pensó inicialmente.

En la actualidad no se conocen con exactitud las diversas funciones que desarrollan estos metabolitos en el organismo humano, ya que la mayor parte de los trabajos

publicados se han realizado en animales, principalmente en ratas (62). Además, la mayoría de los estudios se han centrado solamente en los efectos del 8-iso-PGF_{2α}, dejando de lado el resto de compuestos de esta familia.

Los efectos encontrados en el organismo para estos compuestos son muy diversos: acción sobre la agregación plaquetaria; implicación en la contractibilidad del músculo liso vascular; modificación de la fluidez de las membranas; funciones relacionadas con la capacidad sensorial neuronal; calcificación vascular de células; diferenciación de las células del tejido óseo; etc.

Debido a esos efectos comunes con las PGs y a su semejanza estructural, se pensó que ambos grupos de compuestos debían interactuar con los mismos receptores, pero posteriormente se ha visto que no es así. Existen datos que demuestran la presencia de receptores de baja y alta afinidad para los IsoPs, describiéndose los receptores de alta afinidad como receptores específicos de IsoPs, pero estos aún no se han estudiado con exactitud (62). Los de baja afinidad, debido a su analogía estructural con las PGs, se cree que son receptores compartidos con las mismas.

Las PGs fueron los primeros compuestos derivados del AA que se descubrieron, motivo por el cual han sido estudiadas ampliamente, encontrando hoy una amplia y diversa literatura al respecto. Se sabe que hay 5 receptores principales de PG: D-prostanoide, E-prostanoide, F-prostanoide, I-prostanoide y receptores TP, los cuales tienen una mayor selectividad por PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ y TXA₂ respectivamente (71).

La selectividad de estos receptores radica en los grupos cetona y aldehído del anillo ciclopentano de las moléculas con las que interactúan, así como en las cadenas hidrocarbonadas de las mismas. La diferente orientación de estos grupos en las PGs y en los IsoPs hace que les sea más o menos fácil interactuar con el receptor, pudiendo por

ello interaccionar los diferentes IsoPs con diferentes receptores y producir distintos efectos en función de la localización y tipo del mismo (60).

1.7.5. Isoprostanos como marcadores de patologías

La monitorización del EO resulta de gran relevancia para la comprensión de numerosos mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos, algo por lo que diversos grupos de investigadores se han centrado en la búsqueda de marcadores fiables que permitan analizar su influencia en determinadas situaciones clínicas.

Los IsoPs se consideran buenos marcadores de EO ya que son productos secundarios de peroxidación lipídica, cuantificables y con una gran estabilidad química. Por este motivo se ha llevado a cabo su determinación en su forma libre en diversos fluidos orgánicos como la orina (59), el plasma (57), el líquido cefalorraquídeo (72), el lavado broncoalveolar, o de forma esterificada en membranas titulares y en partículas lipídicas circulantes (57).

Por otra parte, además de ser buenos marcadores de EO, su cuantificación ha sido propuesta como marcador pronóstico en patologías como el fallo cardiaco, donde se usan como herramienta de evaluación de la terapia antioxidante (73) y como predictores de riesgo de eventos cardiovasculares (74).

En los trabajos publicados en el ámbito de la patología cardiovascular se han encontrado niveles elevados de IsoPs en entidades como la angina inestable, el infarto de miocardio, las coronariopatías, la hipercolesterolemia, la preeclampsia y la aterosclerosis (74). Algunos autores defienden incluso que los IsoPs contribuyen a la formación de la placa de ateroma a través de la oxidación de las LDL, y por el potente

efecto vasoconstrictor e inductor de la mitogénesis que desempeñan en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos (74).

En su relación con la patología pulmonar se han detectado niveles elevados de IsoPs en pacientes con asma, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis quística, síndrome de distrés respiratorio y fallo respiratorio grave (60). También se ha encontrado un aumento de éstos en el aire espirado tras la exposición al humo del cigarro, determinación que resulta relevante ya que abre paso a un método no invasivo que pudiera ser útil para detectar el daño oxidativo local en los tejidos pulmonares (60).

En el caso de entidades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer (75), la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington y en las lesiones medulares también se han detectado niveles elevados de IsoPs (76), al igual que en patologías metabólicas como la diabetes tipo 1 y la tipo 2 (73), y en otras patologías como las renales (77).

1.7.6. Isoprostanos y función renal

Los trabajos publicados relacionados con la función renal describen una correlación inversa entre los niveles de IsoPs y el filtrado glomerular. Además, se ha demostrado que los IsoPs se producen a nivel local en el riñón y que su administración en concentraciones nanomolares en ratas produce una potente vasoconstricción en la arteriola eferente, reduciéndose así el filtrado glomerular por la consecuente disminución del flujo sanguíneo en el riñón (78).

Por otra parte, Cottone y colaboradores observaron una buena capacidad de los IsoPs como predictores del empeoramiento de la función renal, hallándose también una

correlación inversa entre los niveles plasmáticos de IsoPs y el valor de filtrado glomerular (79).

En cuanto al trasplante renal, los IsoPs han sido estudiados en varias ocasiones, pero no hemos encontrado ningún estudio que los haya medido hasta el sexto mes postrasplante. Cracowski y colaboradores estudiaron su excreción en orina en los primeros 5 días postrasplante y no detectaron niveles elevados de los mismos (50), sin embargo Lauzurica y colaboradores sí los encontraron elevados en los tres primeros meses postrasplante con respecto a un grupo control de pacientes sanos, detectando además una correlación significativa con marcadores clásicos de inflamación como la proteína C reactiva, la interleukina-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (77).

1.8. Neuroprostanos

1.8.1. Definición, síntesis nomenclatura y funciones

Los neuroprostanos (NeuroPs) son marcadores de lipoperoxidación descubiertos en el año 1990 a raíz de la aparición de los IsoPs como un subtipo de los mismos (56). Su diferencia estructural con los IsoPs reside en que contienen dos átomos de carbono más en su molécula, motivo por el cual se decidió nombrarlos de otra forma, llegándose a la denominación de NeuroPs por su elevada abundancia en las membranas neuronales (72).

Estos compuestos se forman por el efecto producido por las ERO sobre AGPs, generándose los F₃-NeuroPs a partir del *n*-3 DHA (C22:6 *n*-3), y los F₄-NeuroPs a partir del *n*-6 DPA (C22:5 *n*-6). La nomenclatura establecida por el Comité de Nomenclatura de Eicosanoides para los diferentes regioisómeros de estos compuestos se

basa en el número del carbono al que va unido la cadena hidroxilada, designando como C-1 al carbono unido al grupo carbonilo (72).

Su actividad biológica ha permanecido inexplorada durante años debido al elevado coste que suponía su síntesis, creyéndose desde su descubrimiento que estos metabolitos tienen funciones similares a las de los ácidos grasos de los que proceden.

Existen autores que exponen que tienen propiedades antiinflamatorias debido a su potente efecto inhibitor del Factor de Necrosis kappaB (80), no obstante las funciones precisas de estos compuestos están aún por definir.

1.8.2. Neuroprostanos como marcadores de patologías

Los NeuroPs se eliminan por orina en su forma libre o en su forma conjugada con ácido glucurónico, grupos sulfato o conjugados sulfo-glucurónidos (38), hecho que nos permite su fácil monitorización al tratarse la orina de una muestra no invasiva.

Dada la abundancia de estos ácidos grasos poliinsaturados en el sistema nervioso central, particularmente en las membranas neuronales de la materia gris, la mayoría de estudios publicados en la literatura actual los relacionan con enfermedades neurológicas, siendo Roberts y colaboradores en el año 1998 los primeros en describirlos como marcadores de neurodegeneración en pacientes con Alzheimer (72). Sin embargo, pocos son los estudios que los relacionan con la patología renal, a pesar de conocerse el efecto protector que ejercen sobre la función renal los AGP de los que proceden, tanto en los procesos de isquemia-reperfusión (81) como en la enfermedad renal crónica (82).

Lauretani y colaboradores observaron que en pacientes ancianos suplementados con dietas ricas en AGP $n-3$ y $n-6$, el filtrado glomerular se mantenía en mejor estado que en los pacientes no suplementados. Este descubrimiento lo atribuyeron a su influencia sobre el factor de relajación endotelial, a su poder antiinflamatorio, y a su efectos sobre los niveles de citoquinas, triglicéridos, colesterol y presión sanguínea (82).

La acción conservadora de la función renal observada en pacientes suplementados con AGP podría deberse a alguna función ejercida por sus metabolitos en el riñón, ya que estos son eliminados por vía urinaria, pero es algo que aún está por aclarar debido a la falta de estudios relacionados al respecto.

1.9. F₂-dihomo-isoprostanos

1.9.1. Definición, síntesis y funciones

Los F₂-dihomo-IsoPs, descritos por primera vez en el año 1985, son marcadores de lipoperoxidación análogos de los IsoPs (83). Estos metabolitos se generan a partir del AdA (ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico C22:4 $n-6$), por la degradación del mismo por el efecto de los RL (84).

Este AGP se genera por elongación del AA, o por elongación y desaturación del ácido linoléico. En el organismo se encuentra ampliamente distribuido como componente de las membranas, hallándolo a una mayor concentración en las vainas de mielina, en las células de la musculatura vascular del riñón y de las glándulas adrenales (85).

En su estado natural el AdA se haya esterificado con los lípidos de membrana, y tras ser degradado por EO forma los F₂-dihomo-IsoPs, metabolitos que serán liberados en su forma activa por la acción de la enzima fosfolipasa A₂.

Se piensa que estos marcadores de lipoperoxidación presentan funciones diversas ampliamente distribuidas, pero la realidad es que aún no se han estudiado con exactitud, habiéndolos relacionado con funciones como el mantenimiento del tono vascular (86).

1.9.2. F₂-dihomo-isoprostanos como marcadores de patologías

La mayoría de trabajos disponibles en la actualidad que han estudiado los F₂-dihomo-IsoPs se centran en su papel como marcadores de EO en patologías neurológicas como la epilepsia (87), el Alzheimer y el síndrome de Rett (85), encontrando también un estudio que los emplea como marcadores de EO y daño neurológico en deportistas de élite entrenados a diferentes altitudes (88).

A nivel del riñón, donde se ha observado que su concentración es elevada, no se encuentran estudios que lo relacionen directamente con su función, hallándose solamente el trabajo de Kopf y colaboradores, quienes concluyeron que el AdA regula el tono vascular tanto en el riñón como en la glándula adrenal (86). Este mismo grupo de autores advirtió que esta función es concentración-dependiente, y que probablemente al degradarse este AGP por EO dicha función se verá alterada, originando una incorrecta vascularización del riñón y de la glándula adrenal con la consecuente alteración de sus funciones.

1.10. Prostanoides

1.10.1. Definición

El término prostanoides (PT) engloba una serie de compuestos con carácter autacoide (sustancia formada metabólicamente por un grupo de células que altera la función de otras a nivel local), ampliamente distribuidos por el organismo, y que pertenecen a la familia de los eicosanoides: las prostaglandinas (PGs), las prostaciclina y los tromboxanos (TX) (89).

El descubrimiento de los PTs y su identificación estructural comienza en los albores del siglo XX, cuando en 1930 los ginecólogos Kurzrok y Lieb observaron que durante la práctica de las inseminaciones artificiales que realizaban, el útero en algunos casos sufría una violenta contracción (90). Tras este hallazgo estos mismos autores describieron la presencia en el líquido seminal de un compuesto de bajo peso molecular capaz de producir la contracción uterina, compuesto que recibió el nombre de PG debido al origen prostático del líquido seminal donde lo descubrieron (89).

Rápidamente surgieron propuestas relacionadas con sus propiedades fisiológicas y farmacológicas, sin embargo hubo que esperar cerca de 25 años para que el aislamiento, la purificación e identificación de estas moléculas fuese técnicamente posible. En 1962 ya se contaba con la certeza de que los PTs se producían en diversos tejidos, y además se conocía la estructura molecular de seis PGs: PGE₁, PGF_{1 α} , PGE₂, PGF_{2 α} , PGE₃, PGF_{3 α} (91).

En el estudio de la estructura de estas moléculas se observó que son compuestos de 20 átomos de carbono con dobles enlaces localizados en posición similar a la de algunos ácidos grasos esenciales, algo que llevó a pensar a los investigadores que los AG

esenciales podrían ser sus precursores. Esta hipótesis fue demostrada posteriormente, llegando a la conclusión de que son ácidos grasos de 20 átomos de carbono hidroxilados, con una estructura cíclica y dos cadenas laterales (89).

1.10.2. Síntesis y nomenclatura

In vivo los PTs se sintetizan por la vía de la enzima cicloxigenasa a partir de diferentes AGP, generándose la PGH como producto cíclico precursor de los mismos. Los estímulos que promueven su síntesis son: la hipoxemia, el estímulo neural, la serotonina, la acetil-colina, la histamina, la norepinefrina, la angiotensina II y las bradicininas. Su clasificación los encuadra en tres series diferentes en función del AGP del que proceden:

- Ácido dihomo- γ -linolénico (20:3 n-6), precursor de la serie 1, prostanoides con un único doble enlace en su estructura.
- Ácido araquidónico (20:4 n-6), precursor de la serie 2, prostanoides con dos dobles enlaces. Estos son los que mayor actividad biológica presentan.
- Ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3), precursor de la serie 3, prostanoides con tres dobles enlaces.

En su estructura los PTs presentan un anillo ciclopentano que puede tener diferentes configuraciones y que condiciona su actividad biológica, dividiéndose según ésta en dos grupos:

- Ciclopentano de 5 átomos de carbono: prostaglandinas (PGEs, PGDs, PGFs) y prostaciclina (PGI).

- Ciclopentano interrumpido con un átomo de oxígeno: tromboxanos (TXAs, TXBs).

1.10.3. Prostanoides y estados fisiológicos

El carácter autacoide de los PTs reside en su cualidad como mensajeros intercelulares, hecho que les permite acceder a los receptores expresados por las células vecinas (acción paracrina), estimular sus propios receptores de membrana (acción autocrina), o desde el compartimiento intracelular acceder a los receptores nucleares (acción intracrina).

Estos compuestos tienen una vida media muy corta y no se almacenan, por tanto una vez sintetizados en los diferentes tejidos, donde comienzan su acción a nivel local, se distribuyen por el torrente sanguíneo a todo el organismo ejerciendo diversos efectos.

En su distribución y su consecuente paso por el pulmón, las prostaglandinas del tipo E y las del tipo F son metabolizadas hasta en un 90% por medio de la 15-PG-deshidrogenasa, generando un producto inactivo que será posteriormente metabolizado por la acción de una enzima reductasa, y finalmente será eliminado por orina (92). El resto de PTs escapan al metabolismo pulmonar y son metabolizados en hígado o riñón, eliminándose igualmente por vía urinaria.

1.10.4. Función biológica de los prostanoides

Entre las diversas funciones en las que participan los prostanoides se incluyen la coagulación sanguínea, la ovulación, la iniciación del trabajo de parto, el metabolismo

óseo, el desarrollo y crecimiento del sistema nervioso, la citoprotección del tracto gastrointestinal, la secreción de mucus, fluidos y bicarbonato duodenal, la reparación de tejidos, la función renal, el tono vascular y la respuesta inmune (89).

Estas acciones otorgan a estas moléculas un potencial farmacológico importante, como por ejemplo, el empleo de análogos de la prostaciclina como antihipertensivos en la hipertensión pulmonar (93).

De igual forma, la inhibición de su síntesis, como es el caso del efecto producido por los antiinflamatorios no esteroideos, también es un importante mecanismo farmacológico. Sin embargo, dicha inhibición desencadena a su vez, como efecto secundario, un factor etiopatogénico de úlcera gástrica por reducción de la secreción de mucus, de bicarbonato y del flujo sanguíneo local, que son consecuencia de la inhibición de la síntesis gástrica de PGI_2 , PGE_2 y PGE_1 (94).

Los prostanoideos pueden tener efectos antagónicos, como es el caso de la PGE_2 que provoca la relajación del músculo liso bronquial, así como la dilatación de los vasos sanguíneos, mientras que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ tiene efectos contrarios a la primera en los mismos tejidos (89).

Si nos centramos en la función de las PGs podemos decir que la más importante es su papel como mediadores de la inflamación, especialmente la PGD_2 que actúa sobre las células endoteliales de vasos sanguíneos provocando vasodilatación y aumento de la permeabilidad con el consecuente aumento del flujo sanguíneo a la zona. Además produce quimiotaxis de eosinófilos, basófilos y linfocitos T, actuando también sobre células musculares lisas en el estímulo de su contracción (95).

En el caso de los TXs, su función principal es la de participar en los procesos de hemostasia, es decir en la coagulación y agregación plaquetaria, debido a su papel como agregantes plaquetarios y como agentes vasoconstrictores (89).

1.10.5. Prostanoides como marcadores de patologías

Los PTs se han monitorizado en pacientes con diversas enfermedades, encontrando niveles elevados en patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal (96), el cáncer (97), enfermedades autoinmunes, Alzheimer (75), asma infantil, enfermedades cardíacas, etc. Igualmente estos compuestos se emplean para el tratamiento de enfermedades como las siguientes:

- Evitar el cierre del ductus arterioso patente en los recién nacidos con particulares defectos cardíacos cianóticos (PGE_1) (98).
- Tratamiento de la hipertensión pulmonar con PGs, como el eprostenol o el iloprost (99).
- Inducir el parto o el aborto (PGE_2 o PGF_2).
- Prevenir y tratar úlceras pépticas.
- Como vasodilatador en el fenómeno de Raynaud grave, o la isquemia de una extremidad.
- En el tratamiento del glaucoma.
- Tratar la disfunción eréctil, o en la rehabilitación del pene después de cirugía (PGE_1 como alprostadil) (100).

1.10.6. Prostanoides y función renal

En el riñón, los PTs se producen en diferentes localizaciones, siendo los más abundantes la PGE₂, sintetizada principalmente en la médula renal, y la PGI₂, sintetizada en los vasos sanguíneos y el glomérulo. Ambas PGs desencadenan un aumento del flujo sanguíneo con un consecuente incremento de la diuresis y la natriuresis. Su síntesis renal se ve favorecida por acción de hormonas vasoconstrictoras como la angiotensina II y la noradrenalina, pero también por factores como la estimulación nerviosa simpática, la constricción de la arteria renal y la infusión intraarterial de bradicinina (101).

Por otro lado, la PGE₂ actúa sobre el receptor EP₁ a nivel tubular inhibiendo la acción de la hormona antidiurética, generando con ello un aumento en la diuresis debido a la disminución de la reabsorción de agua y de sodio (101). Otra de las acciones de las PGs tiene lugar a nivel de las células yuxtaglomerulares renales, las cuales producen renina por la acción de PGI₂, PGE₂ y PGD₂ (101). Por el contrario, el TXA₂ debido a su potente efecto vasoconstrictor disminuye el flujo sanguíneo renal y, consecuentemente, el filtrado glomerular (101).

También se ha observado para la PGE₂ y para la PGI₂ un efecto protector frente a la pérdida de función renal, tanto en casos de isquemia como en casos de exposición a tóxicos, debido probablemente al efecto diurético ejercido por las mismas (102). Este efecto de mantenimiento de la función renal se observó también en pacientes trasplantados renales tratados con ciclosporina, en los cuales la función del injerto mejoraba tras administrarles PGE₁. Además en estos pacientes se observó una disminución en la incidencia de rechazos agudos, acción que se le atribuyó al efecto inmunosupresor de las PGs (103).

Por otra parte, en los pacientes con ERC se ha visto una asociación directa entre dicha patología y el uso crónico de antiinflamatorios no esteroideos, además de un empeoramiento de la misma con su consumo. Esto se debe a la inhibición que producen estos fármacos en la síntesis de PGs, y a la consecuente disminución del FG que esto genera (104).

Otra patología relacionada con los niveles de PGs es el síndrome de Bartter, caracterizado por la presencia de hiperreninemia, hiperaldosteronismo e hipopotasemia, con una presión arterial normal y una disminución de la sensibilidad a la angiotensina. En dicha enfermedad los niveles de PGE₂ y PGI₂ se mantienen elevados de forma constante, asociando las características de la misma a este incremento de PGs, sintomatología que mejora significativamente al tratar a estos pacientes con inhibidores de la enzima ciclooxygenasa (101).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis de trabajo

El TR es a día de hoy la terapia de elección en los pacientes con ERCT. Este tipo de intervención mejora la calidad de vida de los pacientes permitiéndoles prescindir de las incomodidades de la diálisis y de las restrictivas dietas a las que son sometidos. En las últimas décadas, ha aumentado mucho la demanda de este tipo de intervención debido al incremento de pacientes con patología renal, consecuencia de la evolución de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, hipertensión y otros desórdenes metabólicos (105).

El TR se ha convertido en un proceso rutinario gracias a la alta experiencia conseguida por los equipos de trasplante, pero que se ve limitado por la disponibilidad de órganos aptos para el mismo. Para suplir esta baja disponibilidad de riñones disponibles, los criterios de selección de órganos son cada vez menos restrictivos, pero sin olvidar que la adecuada selección es fundamental para el éxito de la intervención y para la supervivencia del injerto.

La supervivencia ha aumentado notablemente debido a las nuevas terapias de inmunosupresión, pero el rechazo del órgano a día de hoy es una de las complicaciones más importantes en estos pacientes. Esto supone un mal pronóstico a largo plazo para el órgano trasplantado y en ocasiones termina en una pérdida total del mismo (5). Para intentar evitarlo es importante realizar un adecuado seguimiento de su función en la etapa postrasplante, con el objetivo de hacer modificaciones en la terapia inmunosupresora cuando se detectan datos sugestivos de un rechazo.

El rechazo renal es un complejo proceso fisiopatológico que va más allá de la respuesta inmunológica y que requiere un análisis a diferentes niveles para su completa comprensión (106). Los parámetros más utilizados hoy día para la monitorización de la

función renal en la etapa postrasplante son: la CrS, la UrS, el cociente $PtO\ CrO_{-1}$ y el FGe. Cuando estos parámetros sugieren un rechazo se realiza una biopsia del órgano para confirmarlo. El problema es que en muchas ocasiones cuando estos marcadores nos alertan de un posible rechazo, éste está en un estado avanzado e irreversible. Por ello, es necesario encontrar algún biomarcador que nos alerte con la suficiente anticipación que se va a producir un rechazo.

Para la búsqueda de un biomarcador de este tipo y para mejorar la comprensión del proceso fisiopatológico que se desencadena, se ha estudiado la influencia del EO y de la inflamación en la evolución de la función del injerto en los seis primeros meses postrasplante, así como su posible relación con la aparición de un rechazo. Además se evaluará la influencia del EO sobre la función renal y la evolución del mismo durante los seis primeros meses postrasplante. Para ello hemos determinado por espectrometría de masas metabolitos de ácidos grasos como los NeuroPs, F_2 -dihomo-IsoPs e IsoPs como marcadores de EO, y por otra parte PTs como mediadores de inflamación.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

El presente trabajo, se planteó con el objetivo de estudiar la fisiopatología del riñón trasplantado y la función renal con respecto a su EO y estado inflamatorio, prestando especial atención a la evolución de los marcadores de EO y función vascular, y buscando entre ellos posibles predictores precoces de rechazo agudo del órgano trasplantado.

2.2.2 Objetivos particulares

Los objetivos particulares del presente estudio son los siguientes:

1. Evaluar los cambios en los marcadores de función renal, estado nutricional, función hepática, y estado inflamatorio que presentan los pacientes tras un trasplante de riñón.
2. Analizar las diferencias entre los sujetos sanos y los pacientes trasplantados a los 5 días postrasplante y al sexto mes postrasplante en los marcadores de función renal, de estado nutricional y en los nuevos marcadores de lipoperoxidación analizados (F₂-dihomo isoprostanos y neuroprostanos).
3. Evaluar el estrés oxidativo en la etapa postrasplante e investigar su influencia en la función renal.
4. Determinar la excreción urinaria de prostanoides durante la etapa postrasplante y estudiar su relación con la función renal.
5. Valorar las diferencias en la función renal y en la excreción urinaria de marcadores de lipoperoxidación y prostanoides según las características clínicas del trasplante.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Características de la población de estudio

3.1.1. Población de estudio

Estudio longitudinal prospectivo realizado en el periodo comprendido entre Octubre de 2013 y Mayo de 2015, en el cual se incluyeron 60 pacientes trasplantados de riñón en la Unidad de Nefrología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), con edades comprendidas entre 16 y 72 años. De todos los pacientes se tomaron muestras de sangre y orina en seis momentos diferentes durante los seis primeros meses postrasplante.

Por otra parte, se recogieron como grupo control muestras de sangre y orina de 60 voluntarios sanos del mismo hospital con edades comprendidas entre 24 y 67 años. De este grupo, en el que los participantes no presentaban ninguna patología conocida, solo se tomó una muestra de cada individuo.

3.1.2. Criterios de exclusión

Se han excluido los pacientes fallecidos durante el estudio o que perdieron el injerto, y aquellos que no acudieron a todas sus citas programadas y por tanto, no se les pudieron recoger las correspondientes muestras necesarias para completarlo.

3.1.3. Características de los trasplantes

Todos los trasplantes se realizaron con órganos de donante cadáver. Las causas del fallecimiento de los mismos fueron: 46 por accidente cerebrovascular o anoxia

cerebral y 14 por traumatismo craneoencefálico. No se incluyeron trasplantes con donante vivo ni retrasplantes.

3.1.4. Confidencialidad

Todos los pacientes fueron informados del estudio y de su inclusión en un programa de seguimiento durante un periodo de seis meses desde la intervención del trasplante (**Anexo I**). Todos entregaron firmado el consentimiento informado del estudio (**Anexo II**), el cual había sido previamente aprobado por el Comité Ético del HCUVA de Murcia.

La investigación se llevó a cabo según las normas establecidas en la Declaración de Helsinki (107) y tras ser aprobada por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas del HCUVA (**Anexo III**). Para asegurar la confidencialidad de los resultados solo han tenido acceso a los mismos los investigadores involucrados en el estudio, pertenecientes a los servicios de Análisis Clínicos y de Nefrología y Trasplante del HCUVA, y al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del CEBAS-CSIC de la ciudad de Murcia.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA
APLICADA DEL SEGURO

Anexo I

HOJA DE INFORMACIÓN

Solicitamos de Ud. su colaboración para el desarrollo del ensayo: **‘Estudio metabólico y de marcadores de estrés oxidativo y función vascular en pacientes sometidos a trasplante renal’**.

El trasplante renal es una de las prácticas quirúrgicas más aplicadas en la sustitución de órganos en pacientes. Gracias a las nuevas técnicas y tecnologías permite un avance en la supervivencia en personas con patologías renales graves con conservación de dicho órgano funcionalmente durante un periodo más largo en el individuo trasplantado. Sin embargo, la detección temprana de los rechazos agudos sería una herramienta más a añadir en el avance de la esperanza de vida del paciente así como el tratamiento precoz a aplicar. Para ello, la metabolómica es un término relativamente nuevo que se dirige a la medida global de todos los metabolitos de masa menor de 900 Dalton en el metaboloma humano. Esta capacidad para medir cientos de compuestos importantes de forma rápida y fácil ha abierto la puerta a muchas aplicaciones potenciales en un número de áreas incluyendo la fisiología vegetal, nutrición, investigación farmacéutica, enfermedad cardiovascular o trasplantes de órganos entre otras. En el presente proyecto, este tipo de técnica ayudaría a tener un mayor conocimiento del órgano trasplantado con posibilidad de obtener un mayor cuidado del mismo y por tanto una mejor calidad de vida del paciente.

Las muestras obtenidas durante este tipo de proyecto irán destinadas a un exhaustivo análisis de los parámetros bioquímicos y hemogramas en sangre y orina. Asimismo, se estudiará las rutas fisiológicas afectadas por la intervención quirúrgica y la evolución del órgano trasplantado.

El ensayo es iniciativa del Servicio de Nefrología y el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, y del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, del CEBAS, centro que tiene el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Murcia.

Objetivo final: Descubrimiento de nuevos metabolitos ligados al rechazo agudo en el trasplante de riñón así como la evaluación marcadores de estrés oxidativo y función vascular como posibles candidatos a biomarcadores de seguimiento de la fisiología renal del trasplante así como la prevención precoz del rechazo agudo del órgano.

Procedimiento del estudio y Descripción del proceso:

Su aportación es clave para el desarrollo del Proyecto, por lo que le agradecemos de antemano su colaboración. En este ensayo participarán un total de 60 pacientes. Su colaboración consistirá la obtención de dos pequeños tubos de sangre en las extracciones programadas para los días 5 y 10 postrasplante durante su ingreso en planta y en las consultas de un mes, dos, tres y seis meses postrasplante, además de una fracción de la muestra de orina que tendrá que entregar en las mismas fechas. Se solicita su permiso para el uso de las muestras extraídas para investigaciones científicas. Todos sus datos personales tendrán manejo estrictamente confidencial, de forma que ningún dato personal que permita su identificación será accesible a nadie.

Se le informará sobre los objetivos del proyecto de investigación para el que emplearán las muestras y es le responderá a las dudas que pueda plantear.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA
APLICADA DEL SEGURA

Anexo I (Continuación)

No percibirá ninguna recompensa económica o de otro tipo por las muestras y datos proporcionados y éstas no tendrán valor comercial.

Los productos obtenidos de las muestras y los datos asociados a las mismas se archivarán y quedarán custodiados, por un mínimo de cinco años, en las instalaciones del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

Los productos obtenidos de las muestras y los datos asociados a las mismas se archivarán y quedarán custodiados, por un mínimo de cinco años, en las instalaciones del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

Los análisis biomédicos, clínicos y bioquímicos realizados serán tratados estadísticamente, exclusivamente para fines de investigación biomédica de acuerdo a lo descrito anteriormente.

La información será almacenada en soporte informático. Los datos registrados serán tratados estadísticamente, de forma codificada, para los fines de investigación científica que se describen anteriormente.

Molestias y posibles riesgos:

La toma de muestras de sangre le puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y ocasionar un pequeño hematoma o una leve infección que desaparece en pocos días. Más raramente puede aparecer mareo en el momento de la extracción de sangre.

Lugar de realización del análisis:

La investigación biomédica, clínica y bioquímica con sus muestras biológicas se realizará en las instalaciones debidamente acondicionadas del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones científicas, Murcia). La titularidad de la custodia de sus muestras será compartida por los investigadores responsables del proyecto.

Protección de datos personales:

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se obtengan serán los necesarios para cubrir los fines del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada por métodos informáticos en condiciones de seguridad por las Dras. Luisa Jimeno y Teresa Casas Pina, o por una institución designada por ellas. El acceso a dicha información quedará restringido al personal de Laboratorio de Análisis Clínicos y al Servicio de Nefrología, designado al efecto o a otro personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información.

De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo dese, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA
APLICADA DEL SEGURO

Anexo I (Continuación)

Implicaciones de la información obtenida en el estudio:

Si decide participar en el estudio, es posible que en el análisis de sus muestras biológicas se obtenga información relevante para su salud o la de su familia. De acuerdo con la legislación vigente, tiene derecho a ser informado de los datos que se obtengan en el curso del estudio. En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar la información acerca de los estudios de investigación en los que hayan utilizados sus muestras.

Si quiere conocer los datos relevantes para su salud que se obtengan, infórmese a través de su médico sobre las implicaciones que esta información puede tener para su persona y su familia. Esta información se le comunicará si lo desea; en el caso de que prefiera no ser informado, si quiere conocer los datos relevantes para su salud que se obtengan, infórmese a través de su médico sobre las implicaciones que esta información puede tener para su persona y su familia. Esta información se le comunicará si lo desea; en el caso de que prefiera no ser informado, su

decisión se respetará. No obstante, cuando esta información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante.

Uso futuro de las muestras:

Además, le pedimos su consentimiento para que autorice al investigador a almacenar su muestra para realizar otros estudios relacionados con la enfermedad renal. Si autoriza que el material biológico obtenido se utilice en estas investigaciones, sus datos se mantendrán codificados a fin de garantizar la confidencialidad en su utilización, tal como prevé la legislación vigente. Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estas muestras deberá disponer de la aprobación del Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca u otros comités que se establezcan según la legislación vigente. Este comité vela para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Si necesita más información sobre este estudio puede contactar con los investigadores responsables, la Dra. Luisa Jimeno (Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Tel. 968369653, Dra. Teresa Casas Pina (Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Tel. 968369759 y Dr. Ángel Gil Izquierdo (Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del CEBAS-CSIC, Tel. 968396363)

Derecho de revocación del consentimiento:

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que necesite y la relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

Si cambia de opinión después de dar sus muestras biológicas para este estudio, puede pedir que se destruya sus muestras; para ello puede contactar con la Dra. Juisa Jimeno del Servicio de Nefrología o la Dra. Teresa Casas Pina del Laboratorio de Análisis Clínicos, ambas en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA
APLICADA DEL SEGURO

Anexo II

Hoja de Consentimiento informado

Título del ensayo: 'Estudio metabólico y de marcadores de estrés oxidativo y función vascular en pacientes sometidos a trasplante renal'

Yo, D. (nombre del voluntario) con DNI:

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido información suficiente sobre el estudio.
- Mi participación consiste en permitir extracciones de sangre así como la recolección de orina.
 - Comprendo que mi participación es voluntaria.
 - Comprendo que mi participación puede aportar información científica que podría resultarme beneficiosa a mí o a otras personas en el futuro.
 - Comprendo que si acepto participar es para intentar completar el estudio.
 - Aún así, comprendo que si lo deseo, puedo retirarme del estudio cuando quiera.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma Voluntario

Fecha:

Accedo a que los médicos responsables de este estudio me contacten en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos: -Si -No

Investigadores Responsables: Dres. Luisa Jimeno, Teresa Casas Pina y Ángel Gil Izquierdo



Anexo III

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 25/11/2013, acta 10/13 ha evaluado la propuesta de los investigadores referida al estudio:

Título: Estudio metabólico y de marcadores de estrés oxidativo y función vascular en pacientes sometidos a trasplante renal

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado en por los siguiente :

CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

Dra. Teresa Casas Pina
(Análisis Clínicos) Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

Dr. Angel Gil Izquierdo
(CEBAS-CSIC)

Dra. Luisa Jimeno García
(Nefrología) Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

Dr. Pedro Martínez Hernández
(Análisis Clínicos) Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

Lo que firmo en Murcia, a 25 de noviembre de 2013

Fdo:

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

3.2. Obtención de muestras

3.2.1. Muestras de sangre

Se obtuvieron seis muestras de sangre de los pacientes trasplantados en seis momentos diferentes después de la intervención, coincidiendo siempre con la extracción de sangre programada para este tipo de pacientes en el seguimiento de la función del injerto, intentando así no interferir en la recuperación de los pacientes ni realizar extracciones de sangre adicionales a las necesarias.

Las extracciones durante el ingreso del paciente en la fase de recuperación, en los días 5 y 10 postrasplante, las realizó el personal de enfermería de la planta de Nefrología y Trasplante, mientras que las extracciones realizadas durante las consultas habituales programadas tras el trasplante al mes, dos meses, tres meses y seis meses postrasplante, las realizó el personal de enfermería de la consulta de Nefrología y Trasplante.

Del grupo control se tomó una sola muestra de sangre, recogida por el personal de enfermería de extracciones del policlínico del HCUVA.

Las muestras de sangre venosa se obtuvieron tras un ayuno de 12 horas, entre las 7 y las 10 de la mañana (para evitar la variación circadiana), mediante el sistema Vacutainer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se recogió un tubo de sangre total con ácido etilendiaminotetracético como anticoagulante y un tubo sin anticoagulante con gel separador para la obtención de suero.

La sangre total se utilizó para la determinación de los parámetros hematológicos, realizándose su análisis en las dos horas posteriores a su extracción. Los tubos sin anticoagulante se dejaron reposar a temperatura ambiente para su coagulación, y

posteriormente se centrifugaron a 4 °C a 1200 g durante 10 minutos, utilizando el suero obtenido para la determinación de los diferentes parámetros bioquímicos analizados.

3.2.2. Muestra de orina.

En el grupo de pacientes se recogieron 6 muestras de orina en 6 momentos diferentes después del trasplante, y en el grupo control solo una. La toma de muestra en ambos grupos se hizo el mismo día que las extracciones de sangre descritas en el apartado anterior. Todas las muestras fueron de orina de primera hora de la mañana, con el objetivo de evitar los errores que se producen en la recogida de orina de 24 horas (28). Por este motivo todos los parámetros urinarios se expresan estandarizados según la excreción de creatinina urinaria.

Las muestras de ambos grupos se recolectaron en envases estériles de poliestireno, posteriormente se centrifugaron a 4 °C a 1200 g y se tomaron dos alícuotas. Una de las alícuotas se empleó para la determinación de los parámetros bioquímicos ese mismo día, y la otra se conservó congelada a -80°C hasta el momento de su análisis.

3.2.3. Consideraciones especiales de las muestras

- Las muestras empleadas para la determinación de los parámetros hematológicos en sangre total, y para la determinación de los parámetros bioquímicos en suero y orina, se procesaron el mismo día de su recogida.

- Para la determinación en orina de los marcadores de EO y función vascular por espectrometría de masas se separó una alícuota de la muestra y se congeló a -80°C, con

el objetivo de evitar la pérdida o degradación de los mismos. Estas muestras se sometieron a un solo ciclo de congelación-descongelación previo a la determinación de dichos marcadores, habiéndose comprobado previamente la estabilidad de los mismos tras este ciclo. Antes de su análisis se procesaron por el método descrito en el **Apartado 3.3.4.2.**

- Los resultados bioquímicos y hematológicos de todas las muestras analizadas han sido correctamente identificados y almacenados en el sistema informático del laboratorio de Análisis Clínico del HCUVA, introduciéndose a su vez en una base de datos creada expresamente para su procesamiento con el programa estadístico SPSS v15.0. En dicha base de datos se incluyeron también los resultados de los marcadores de EO y función vascular analizados en el CEBAS-CSIC para su posterior procesamiento de forma conjunta.

3.3. Parámetros estudiados y técnicas analíticas empleadas

3.3.1. Parámetros hematológicos analizados

Los parámetros hematológicos se analizaron en las dos horas posteriores a la extracción de la muestra por citometría de flujo en un analizador automático XE-5100 (Sysmex, Kobe, Japón) con reactivos de Roche Diagnostics®.

- Hematocrito (HTO): determinado para valorar el estado nutricional de los pacientes.
- Leucocitos (Leu): determinado para valorar el estado inflamatorio del paciente.

3.3.2. Parámetros bioquímicos analizados

Los diferentes parámetros bioquímicos medidos en suero y orina se determinaron en un autoanalizador Cobas 8.100 de Roche Diagnostics® con reactivos de esa misma casa comercial, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y habiendo comprobado previamente que las técnicas de medida empleadas se encontraban perfectamente calibradas y controladas. El análisis de los mismos se llevó a cabo mediante métodos colorimétricos y turbidimétricos.

- Glucosa (Glu): determinada por la influencia que ejerce en el estrés oxidativo (40).
- Urea (UrS) y CrS. A partir de la CrS se calculó el FGe según la fórmula MDRD descrita anteriormente: parámetros determinados para el control de la función renal.
- Albúmina sérica (AlbS): determinada para el control del estado nutricional de los pacientes.
- Triglicéridos (Tg) y Colesterol total (CT): determinados para el control del perfil lipídico.
- Enzimas hepáticas Glutamato Piruvato Transaminasa (GPT) y Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT): determinadas para el control de la función hepática.
- Lactato Deshidrogenasa (LDH): determinada como marcador de inflamación, para valorar los posibles cambios en PGs y marcadores de EO.
- PtO: determinadas para valorar la función renal.

- CrO: determinada para estandarizar los analitos medidos en orina.

3.3.3. Celularidad en orina:

La celularidad en orina se determinó por medio del sistemático de orina y posterior sedimento urinario (108).

- Leucocitos en orina (LeuO): determinados para valorar una posible infección urinaria que afectaría a la función renal.

3.3.4. Marcadores de estrés oxidativo y función vascular

3.3.4.1. Reactivos y calibradores

Los IsoPs y las PTs empleados como estándares se adquirieron en Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA) y en el Instituto de Biomoléculas Max Mosseron (IBMM) (Montpellier, France) al equipo del Dr. Durand (109). En el caso de los NeuroPs y F₂-dihomo-IsoPs utilizados como calibradores fueron cedidos por el equipo de Durand en el Instituto de Biomoléculas de Max Mosseron (IBMM) (Montpellier, Francia) (110). Las diferentes soluciones preparadas con los calibradores adquiridos se elaboraron con MeOH (1:1, v/v), partiendo de unos estándares a concentración 1 µM. Posteriormente, para la preparación de la curva de calibración, se hicieron diluciones seriadas de dicha solución de trabajo para obtener las diferentes concentraciones de las rectas de calibración.

La β -glucuronidasa tipo H2 procedente de *Helix pomatia*, y el BIS-TRIS (Bis-(2-hidroxietil)-amino-tris-(hidroximetil)-metano) utilizado en este estudio se adquirieron de Sigma-Aldrich[®] (EE.UU.). El ácido clorhídrico, el hexano, el acetato de etilo y el ácido tricloroacético utilizados se compraron a Panreac[®] (Castellar del Vallés, Barcelona, España). Los cartuchos de extracción en fase sólida que se usaron fueron Strata XAW, 100 mg 3mL⁻¹ adquiridos en Phenomenex[®] (Torrance, CA, EE.UU.).

3.3.4.2. Extracción de muestras de orina para el análisis de isoprostanos, prostaglandinas, neuroprostanos y F₂-dihomo-isoprostanos

La extracción de IsoPs, PGs, TXs, NeuroPs y F₂-dihomo-IsoPs en orina, se llevó a cabo siguiendo los métodos desarrollados anteriormente por Medina y colaboradores en 2012 (59). Primeramente las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Tras su total descongelación se homogenizaron en un agitador tipo Vortex. A un volumen de 1000 μ L de muestra de orina, se le añadieron 55 μ L de enzima β -glucuronidasa sulfatasa y 110 μ L de tampón acetato, consiguiendo así la hidrólisis de los conjugados formados entre los analitos y el ácido glucurónico y grupos sulfato, y dejando tras la misma los analitos en su forma libre. Para la completa hidrólisis de los conjugados, la muestra con la enzima y el tampón se incubó durante dos horas en un bloque térmico a 37°C. Tras el incubado, se añadieron 500 μ L de MeOH/HCl 200 mM para la precipitación de las proteínas.

A continuación, se homogenizó y se centrifugó a 11180 g durante 5 minutos. Tras esta operación, se retiró el sobrenadante y se mezcló con 1250 μ L de MeOH y 2000 μ L de buffer Bis-tris 0,02 M. Esta mezcla se utilizó para la extracción en fase sólida empleando cartuchos Strata X-AW de intercambio catiónico (Phenomenex,

100 mg 3 mL⁻¹; California, EE.UU.) previamente acondicionados. Los analitos, dado su carácter ácido, se eluyeron posteriormente con 1 mL de MeOH, y se llevaron a sequedad en condiciones de vacío usando un concentrador SpeedVac (Savant SPD121P, Thermo Scientific, MA, EE.UU.). Los extractos secos se reconstituyeron con 200 µL de una mezcla de fases A:B (90:10, v:v), siendo la fase A agua al 0,01% de ácido acético (v:v) y la fase B MeOH al 0,01% de ácido acético (v:v). Las muestras reconstituidas se pasaron a través de un filtro de 0,45 µm y 4 mm de diámetro (Millipore, MA, EE.UU.) y posteriormente se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

3.3.4.3. UHPLC-QqQ-MS/MS

- *Análisis de isoprostanos y prostaglandinas*

La detección e identificación de los eicosanoides presentes en orina se realizó mediante un equipo de cromatografía líquida (UHPLC Agilent-1.290), acoplado a un espectrómetro de masas con tecnología de triple cuadrupolo (Agilent-6.460) y *electrospray* como fuente de ionización (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La columna usada fue una ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (2.1 x 50 mm, 1.8 µm de tamaño de partícula) y su temperatura fue 5 °C en ambos extremos. Las fases móviles constaron de una fase A (agua al 0,01 % de ácido acético (v:v)) y una fase B (MeOH al 0,01 % de ácido acético (v:v)). El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL. El flujo se fijó en 0,3 mL min⁻¹, siguiendo un gradiente lineal que comenzó en 60 % de fase B entre 0-7 minutos, se incrementó a 73% de fase B entre 7,01-10 minutos y alcanzó el 100 % de fase B en el minuto 10,01, para mantenerse en ese porcentaje hasta el minuto 13,50 (59).

El flujo de muestra fue nebulizado para su impulsión con flujo de nitrógeno de 480 y 560 L h⁻¹ e ionización en modo negativo. La temperatura del nitrógeno, como gas secante, fue de 325 °C. El flujo de nitrógeno del dispositivo “jetstream” fue de 12 L min⁻¹. El voltaje del capilar y el de la boquilla de “jetstream” fueron 2750 y 1500 V, respectivamente, para conseguir una mayor eficacia en la desolvatación y generación iónica a través de un mayor enfoque térmico.

La fragmentación se realizó en la celda de colisión ubicada en el segundo cuadrupolo, mediante el uso de nitrógeno en fase gas y con la ayuda del voltaje de colisión. De la misma manera, el voltaje a la salida del capilar (“*fragmentor*”), se optimizó con el objetivo de conseguir la mayor concentración de ión precursor y, por tanto, mayor sensibilidad. Los analitos obtenidos de la fragmentación se detectaron en modo de monitorización por reacción múltiple (“*multiple reaction monitoring mode*”) (**Tablas 3.1. y 3.2.**). La adquisición y procesamiento de datos se realizó mediante el software MassHunter B.04.00 (Agilent Technologies, Walbronn, Alemania). La concentración se calculó mediante la relación del área de los iones de los compuestos con los correspondientes estándares.

- Análisis de neuroprostanos y F₂-dihomo-isoprostanos

Para analizar los NeuroPs y los F₂-Dihomo-IsoPs se utilizó un sistema UHPLC como el descrito anteriormente para los eicosanoides. Su separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna ACQUITY BEH C₁₈ (2.1 x 50 mm, 1.7µm) (Waters, MA, EE.UU.). La temperatura de la columna fue de 6 °C en ambos extremos. El análisis de las muestras se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Medina y colaboradores (87). El modo de monitorización por reacción múltiple se realizó utilizando la ionización en el modo negativo. Las fases móviles A (agua) y B (MeOH) contenían

ambas un 0,01% de ácido acético (v:v). El flujo fue de 0,2 mL min⁻¹ usando un esquema de gradiente lineal (t; % fase B): (0.0; 60), (7; 70), (7,01; 90), (10; 90), (10; 60).

El volumen de inyección fue de 20 µL. Las condiciones para los parámetros de espectrometría de masas fueron las siguientes: flujo de gas 8 µL min⁻¹, nebulizador 30 psi, voltaje capilar 4.000 V, voltaje de boquilla de 1000 V, temperatura del gas de 325 °C; finalmente, el flujo de corriente de gas fue 12 µL min⁻¹. El tiempo para un solo análisis fue de 10,01 min. El voltaje a la salida del capilar y la energía de colisión se optimizaron para cada compuesto para generar los iones de productos más abundantes (**Tabla 3.3**). La adquisición y procesamiento de datos se realizó mediante el software MassHunter B.04.00 (Agilent Technologies, Walbronn, Alemania). La concentración se calculó mediante la relación del área de los iones de los compuestos con los correspondientes estándares (87).

Tabla 3.1. Características MRM para la determinación de prostanoïdes en UHPLC - MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
Prostaglandinas derivadas del ácido araquidónico					
Vía de síntesis H					
U-44069	349,2	219,1	145	22	Negativa
U-46619	349,2	219,1	145	22	Negativa
Vía de síntesis D					
PGD ₂	350,9	315	80	5	Negativa
PGDM	327,1	309,1	90	0	Negativa
Tetranor-PGDM	327,1	108,9	80	20	Negativa
Tetranor-PGDM-lactona	309,1	142,9	90	10	Negativa
11-β-PGF _{2α}	353	309,1	150	17	Negativa
2,3-dinor-11-β-PGF _{2α}	325,2	237,1	100	5	Negativa
Tetranor-PGJM	309	155	100	15	Negativa
Vía de síntesis E					
PGE ₂	351,2	333,1	100	0	Negativa
20-OH-PGE ₂	367,1	349,2	120	0	Negativa
Tetranor-PGEM	327	308,8	50	0	Negativa
Tetranor-PGAM	309	290,9	70	0	Negativa
15-keto-PGF _{2α}	351,1	314,9	100	0	Negativa
Vía de síntesis F					
20-OH-PGF _{2α}	369,2	325,1	80	0	Negativa
19(R)-OH-PGF _{2α}	369,2	325,1	75	17	Negativa
Tetranor-PGFM	329,4	311,1	89	8	Negativa

MRM: monitorización por reacción múltiple; UHPLC: cromatografía líquida de alta resolución; MS: espectrometría de masas.

Tabla 3.1. (Continuación). Características MRM para la determinación de prostanoïdes en UHPLC - MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
Tromboxanos					
11-dehidro-TXB ₂	367	161,1	120	13	Negativa
Prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-γ-linolénico					
PGE ₁	353,2	317,2	80	5	Negativa
PGF _{1α}	355,2	311	90	15	Negativa
6-keto-PGF _{1α}	369	245,1	160	24	Negativa
2,3-dinor-6-keto-PGF _{1α}	341	134,9	160	24	Negativa
Prostaglandinas derivadas del ácido eicosapentaenoico					
17- <i>trans</i> -PGF _{3α}	350,9	307	100	15	Negativa

MRM: monitorización por reacción múltiple; UHPLC: cromatografía líquida de alta resolución; MS: espectrometría de masas.

Tabla 3.2. Características MRM para la determinación de isoprostanos en UHPLC - MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15					
<i>ent</i> -PGF _{2α}	353,1	309	90	0	Negativa
8-iso-PGF _{2α}	353,2	193,1	125	21	Negativa
8-iso-15-keto-PGF _{2α}	349	234,9	100	5	Negativa
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	353,1	315,1	100	0	Negativa
2,3-dinor-8-iso-PGF _{2α}	325,2	237,1	100	5	Negativa
<i>ent</i> -8-iso-15(S)-PGF _{2α}	353,1	309,1	100	0	Negativa
8-iso-PGF _{2β}	353,2	193,1	80	20	Negativa
15- <i>epi</i> -15F _{2t}	351,2	315,1	90	0	Negativa
2,3-dinor-15- <i>epi</i> -15-F _{2t}	324,9	237,1	80	0	Negativa
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 5					
5-F _{2t}	353,1	335,2	90	0	Negativa
5- <i>epi</i> -5-F _{2t}	353,2	334,8	80	0	Negativa
E₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15					
8-iso-15-keto-PGE ₂	349	234,9	100	5	Negativa
Isoprostanos derivados del ácido dihomo-γ-linolénico					
8-iso-PGE ₁	352,9	234,8	80	15	Negativa
8-iso-PGF _{1α}	355,1	311,1	90	15	Negativa
Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico					
8- <i>epi</i> -8-F _{3t}	350,6	127,2	90	0	Negativa
8-F _{3t}	351,2	126,8	90	15	Negativa

MRM: monitorización por reacción múltiple; UHPLC: cromatografía líquida de alta resolución; MS: espectrometría de masas.

Tabla 3.3. Características MRM para la determinación NeuroPs y F₂-Dihomo-IsoPs en UHPLC - MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
F₄-neuroprostanos					
10- <i>epi</i> -10-F _{4t} -NeuroP	377	152,8	80	0	Negativa
10-F _{4t} -NeuroP	377,1	152,9	90	15	Negativa
4(<i>RS</i>)F _{4t} -NeuroP	377,1	271,2	80	0	Negativa
4-F _{4t} -NeuroP	377,1	333,1	80	0	Negativa
F₃-neuroprostanos					
4- <i>epi</i> -4-F _{3t} -NeuroP	379	219	90	0	Negativa
4-F _{3t} -NeuroP	379,1	101	80	0	Negativa
F₂-dihomo-isoprostanos					
17- <i>epi</i> -17-F _{2t} -DihomoIsoP	381,1	319,1	80	0	Negativa
17-F _{2t} -DihomoIsoP	381,1	337,1	80	5	Negativa
<i>ent</i> -7(<i>RS</i>)-7-F _{2t} -DihomoIsoP	381,1	363,2	80	0	Negativa
<i>ent</i> -7- <i>epi</i> -7-F _{2t} -DihomoIsoP	381,1	362,9	80	0	Negativa

MRM: monitorización por reacción múltiple; UHPLC: cromatografía líquida de alta resolución; MS: espectrometría de masas.

3.4. Análisis estadístico

Se comprobó la distribución normal de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos cuantitativos están representados como mediana y rango intercuartílico (RI) para aquellos parámetros que no cumplieron normalidad y media y desviación estándar (DE) para aquellos distribuidos normalmente. Los marcadores de estrés oxidativo y de función vascular medidos, se normalizaron con los valores de creatinina urinaria y posteriormente se analizaron, expresándose en ng de analito mg⁻¹ de creatinina urinaria. El análisis realizado entre las variables medidas en los diferentes momentos postrasplante se llevó a cabo utilizando el test de Wilcoxon. La

comparación entre grupos en cada momento postrasplante se realizó utilizando los test de Kruskal–Wallis y el test U de Mann–Whitney. Las correlaciones entre las variables de estudio se realizaron empleando el método de correlación de Pearson o el de Spearman. La comparación entre los pacientes trasplantados y los voluntarios sanos se realizó con el test U de Mann-Whitney. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS 15.0 (LEAD Technologies Inc, Chicago, EE.UU.) y el nivel de significado estadístico establecido fue de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características de la población estudiada

4.1.1. Pacientes trasplantados

Se incluyeron un total de 60 pacientes trasplantados en el HCUVA de Murcia, de los cuales fueron excluidos 19 por diversas causas: dos por fallecimiento durante el estudio, dos por riñón no funcionante, uno por rechazo con pérdida del injerto, y 14 por la imposibilidad de recoger todas las muestras necesarias para el estudio debido a su falta de asistencia a las consultas programadas.

Entre los 41 pacientes restantes que finalmente se incluyeron en el estudio 27 eran hombres (65,8 %) y 14 mujeres (34,2 %), con edades comprendidas entre 16 y 72 años y una edad media de $53,3 \pm 15,3$ años. Durante el seguimiento, tres de ellos sufrieron un rechazo agudo celular de tipo vascular (según los resultados de la biopsia) que fue controlado con inmunosupresores.

El 60,9 % de los pacientes presentaba un IMC $> 30 \text{ Kg/m}^2$, clasificándose éstos como pacientes obesos (111). El 17,1 % de los pacientes eran diabéticos o intolerantes a la glucosa en el momento del trasplante, considerando diabéticos a los pacientes con niveles de glucosa superiores a 126 mg dL^{-1} o que tomaban previamente fármacos para dicha patología, e intolerantes a los que tenían una glucemia entre 100 y 125 mg dL^{-1} (112). Durante la evolución del estudio un 14,6% de los pacientes desarrolló intolerancia a la glucosa. El 94,2 % de los pacientes eran hipertensos, característica que puede ser causa o consecuencia de la insuficiencia renal. De entre el grupo de pacientes declararon ser no fumadores o exfumadores el 82 %.

4.1.2. Grupo control

Para el grupo control se seleccionaron un total de 60 individuos sin patologías conocidas, según la revisión de la historia clínica del paciente, y sin ningún parámetro bioquímico medido fuera de los rangos de normalidad. El intervalo de edad de estos sujetos fue de 24 a 67 años, con una edad media de $42,90 \pm 13,7$ años, entre los cuales 28 eran hombres (47 %) y 32 mujeres (53 %).

4.2. Características de los trasplantes realizados

Los pacientes incluidos en el estudio se sometieron a un trasplante renal de donante cadáver tras haber estudiado previamente la compatibilidad donante-receptor en el servicio de Inmunología del HCUVA de Murcia, siendo las características de los trasplantes realizados las siguientes:

- Los donantes tenían una edad media de $52,75 \pm 13,7$ años, con un máximo de 82 años y un mínimo de 10 años. El número de donantes mayores de 65 años fue de 13.
- Todos los trasplantes incluidos fueron de donante cadáver, de los cuales 29 (73,2 %) perdieron la vida por accidente cardiovascular (ACV) o anoxia cerebral y el resto por traumatismo craneoencefálico (TCE).
- De los órganos trasplantados a los 41 pacientes que finalmente se incluyeron en el estudio, 31 (75,6 %) procedían del HCUVA y 10 (24,4 %) de otros centros.
- Los órganos trasplantados permanecieron en isquemia fría antes de la intervención una media de $9,66 \pm 4,5$ horas, con un mínimo de 2 horas correspondiente a un órgano procedente del HCUVA, y un máximo de 18 horas en un riñón procedente de otro centro.

- Un total de 20 (46,5%) pacientes sufrió un retraso en la función inicial del injerto (RFI), considerándose como tal los casos de oligoanuria o retraso en el descenso de la CrS en la primera semana postrasplante (113). De ellos 10 (23,3% del total) necesitaron diálisis y 10 prescindieron de ella.
- Los pacientes estuvieron ingresados en el hospital tras el trasplante una media de $18,9 \pm 10,8$ días, con un mínimo de 8 días y un máximo de 44.
- De entre los pacientes trasplantados, 18 (43,9 %) necesitaron una o más transfusiones, siendo 9 el número máximo de transfusiones recibidas por un paciente.
- Durante los 6 meses postrasplante, a 13 pacientes se les realizó una biopsia por empeoramiento de la función renal. El resultado de las biopsias relacionó ese empeoramiento con las causas descritas en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Resultados de las biopsias

Causa	Número de casos
Infección por virus BKV	1
Toxicidad por anticalcineurínicos	2
Necrosis tubular aguda	7
Rechazo del injerto	3

4.3. Parámetros bioquímicos

4.3.1 Pacientes trasplantados y grupo control

Los parámetros bioquímicos analizados en ambos grupos se representan en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Parámetros bioquímicos analizados en las diferentes muestras obtenidas.

	Cinco días p-TR	Diez días p-TR	Un mes p-TR	Dos meses p-TR	Tres meses p-TR	Seis meses p-TR	Sujetos sanos
CrS (mg dL ⁻¹)	4,75 (2,40-6,03)	3,29 (2,01-5,33)	1,76 (1,64-2,22)	1,67 (1,55-1,97)	1,72 (1,56-2,07)	1,61 (1,42-2,06)	0,81 (0,73-0,93)
MDRD (mL/min/1,73m ²)	13,7 (9,01-30,4)	19,8 (10,1-34,7)	41,0 (31,5-48,9)	40,5 (35,9-51,8)	41,4 (33,9-51,5)	45,9 (34,5-55,5)	88,5 (69,3-112)
UrS (mg dL ⁻¹)	141 (88,5-182)	168 (96,0-214)	71,5 (54,5-103)	66,5 (50,7-85,0)	68,1 (52,0-99,5)	61,0 (46,0-85,5)	31,0 (23,5-39,5)
PtO CrO⁻¹ (mg g ⁻¹ creat)	827 (507-2441)	295 (205-943)	167 (128-248)	156 (95,1-312)	146 (84,5-280)	146 (81,5-279)	ND
AlbS (g dL ⁻¹)	3,40 (3,00-3,80)	3,50 (3,20-3,78)	4,10 (3,65-4,45)	4,25 (3,98-4,53)	4,40 (4,15-4,60)	4,50 (4,10-4,63)	4,54 (4,12-4,96)
Hct (%)	30,8 (28,0-34,5)	29,9 (27,2-34,3)	34,3 (30,8-39,6)	37,7 (33,4-41,7)	40,1 (36,8-43,9)	40,7 (36,5-45,9)	42,9 (40,4-47,1)
Glu (mg dL ⁻¹)	89,5 (79,0-117)	88,0 (77,0-107)	90,0 (81,0-113)	94,0 (84,0-120)	91,0 (81,0-107)	94,0 (87,5-108)	89,8 (82,0-97,0)
TG (mg dL ⁻¹)	123 (85,3-149)	125 (78,2-171)	120 (92,6-172)	110 (90,1-148)	131 (95,7-163)	116 (78,9-165)	91,2 (71,3-109)
CT (mg dL ⁻¹)	148 (124-158)	139 (129-157)	198 (183-225)	186 (165-212)	182 (167-203)	175 (153-205)	173 (158-187)
GOT (U L ⁻¹)	14,5 (10,0-20,7)	12,0 (9,0-14,0)	12,0 (11,0-14,2)	14,5 (11,0-16,7)	18,0 (15,0-21,0)	17,0 (13,0-21,0)	20,4 (17,0-23,0)
GPT (U L ⁻¹)	20,5 (14,3-44,5)	20,0 (15,0-29,0)	16 (12,5-26,0)	18,0 (12,0-25,2)	18,5 (14,0-22,0)	17,0 (12,5-23,0)	20,5 (14,0-23,7)
Leu (1000 Cel µL ⁻¹)	9,62 (7,62-11,90)	10,65 (7,05-14,45)	7,850 (6,25-10,00)	7,77 (5,80-9,78)	7,28 (5,08-9,35)	7,66 (5,74-9,64)	7,03 (5,95-7,87)
LDH (U L ⁻¹)	238 (170-311)	204 (165-274)	181 (150-223)	186 (166-253)	220 (187-267)	181 (157-226)	NA
LeuO (Cel Campo ⁻¹)	19,0 (9,31-47,8)	5,21 (3,12-22,5)	2,17 (1,15-5,23)	1,89 (1,27-5,26)	1,54 (1,08-5,62)	1,12 (1,00-10,3)	1,00 (0,00-2,6)

Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartílico). ND (No detectado). NA (No analizado), CrS (Creatinina sérica). Urea sérica (UrS). PtO CrO⁻¹ (Cociente Cociente proteínas en orina/creatinina en orina). Albúmina sérica (AlbS), Hematocrito (Hct), Glucosa (Glu), Colesterol total (CT), Triglicéridos (TG), Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT), Glutamato Piruvato Transaminasa (GPT), Leucocitos en sangre (Leu), Lactato deshidrogenasa (LDH), Leucocitos en orina (LeuO), Células (Cel), p-TR (Postrasplante renal).

4.3.2. Evolución de los parámetros bioquímicos a lo largo de los seis meses postrasplante

- Función renal

Como era de esperar, la función renal mejoró después del trasplante. En el caso de la CrS y el MDRD se observó que mejoraban significativamente entre los días 5 y 10 postrasplante ($p < 0,05$ para ambos), y entre el día 10 y el primer mes ($p < 0,05$ para ambos), encontrando al final del estudio el máximo valor de MDRD y el mínimo de CrS (**Figuras 4.1 y 4.2**). Igualmente se observó cómo la proteinuria disminuyó a lo largo de la etapa postrasplante estudiada, con diferencias significativas entre los días 5 y 10 postrasplante y entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,05$ para ambos), hallando el mínimo en el tercer mes postrasplante (**Figura 4.3**).

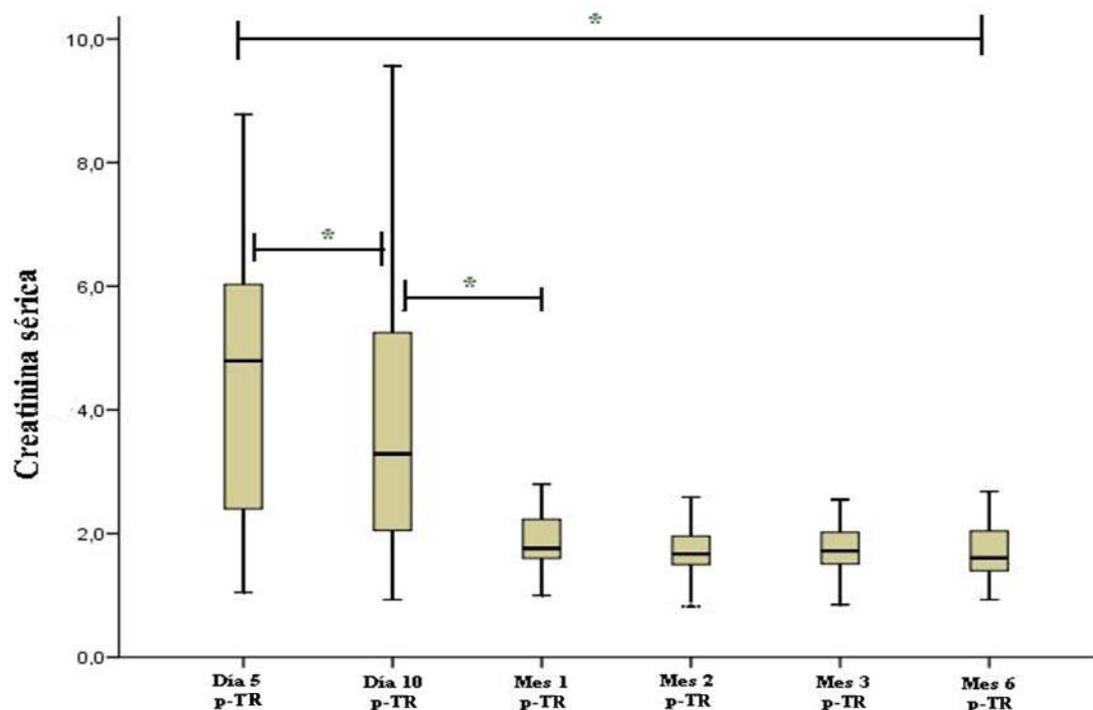


Figura 4.1. Evolución de la creatinina sérica durante el estudio. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en mg dL^{-1} .

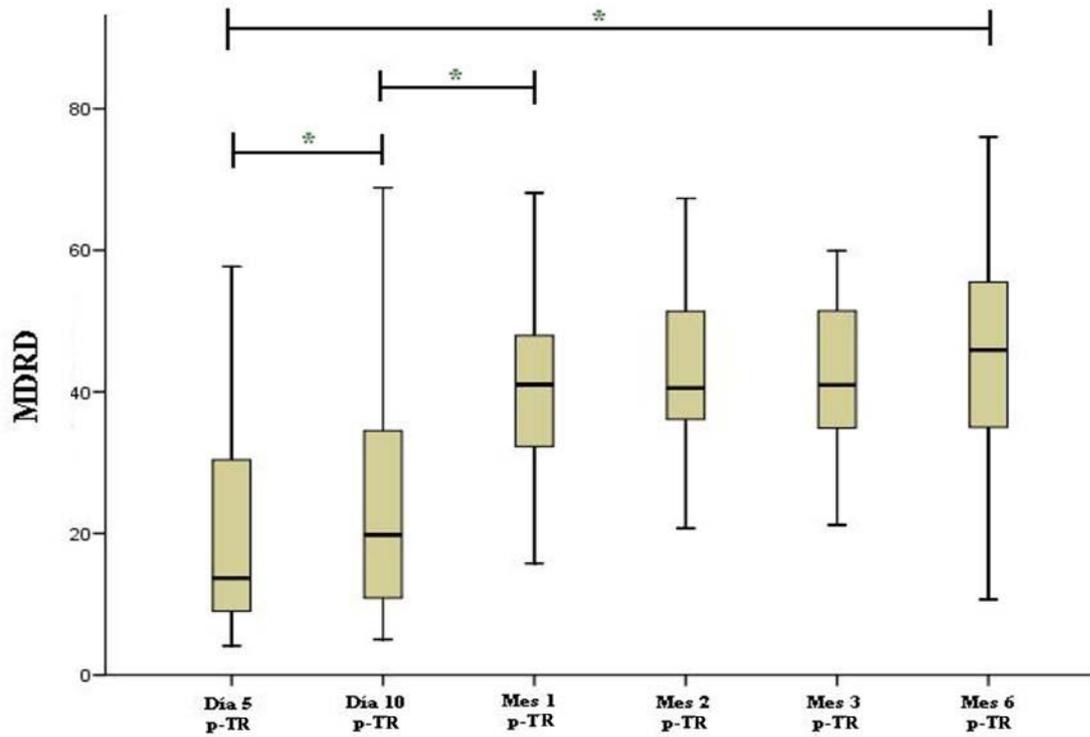


Figura 4.2. Evolución del MDRD durante el estudio. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en mL/min/1,73m².

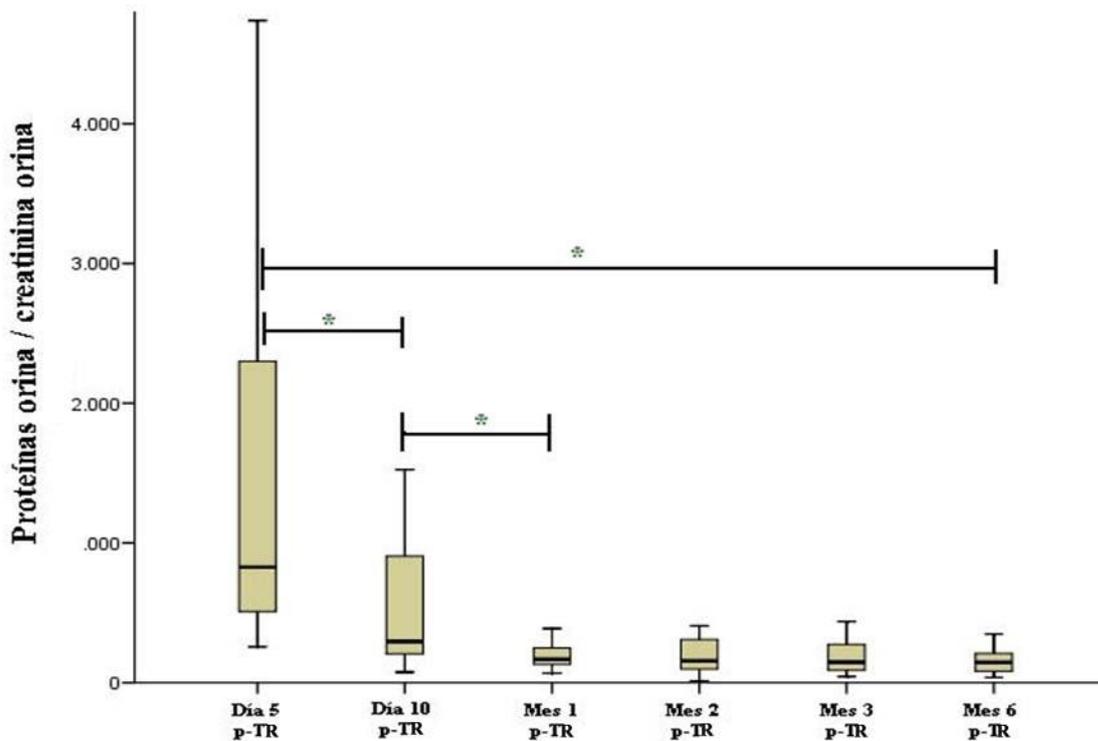


Figura 4.3. Evolución del índice proteínas/creatinina durante el estudio. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en mg g⁻¹.

En el caso de la UrS, a pesar que disminuye progresivamente en los seis momentos tras el trasplante, solo se encontró una reducción estadísticamente significativa entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,001$), no encontrando diferencias entre el resto de momentos consecutivos del estudio (**Figura 4.4**).

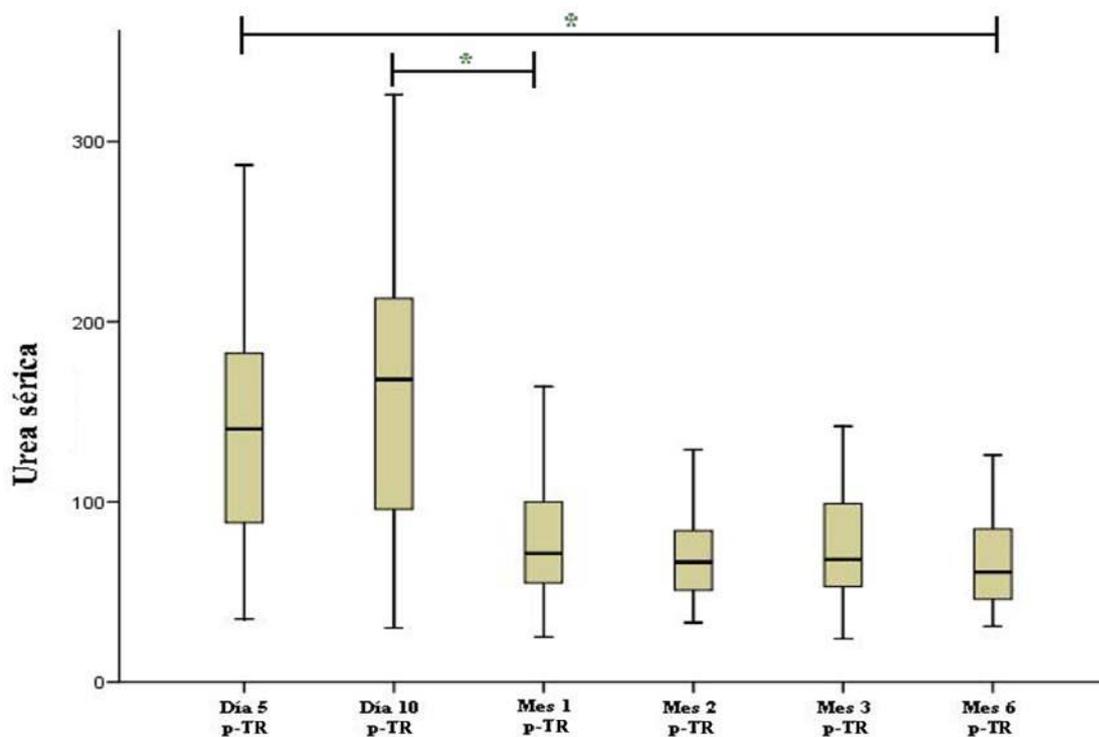


Figura 4.4. Evolución de la urea sérica durante el estudio. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,001$). Datos expresados en mg dL^{-1} .

De la misma manera, se compararon estas cuatro variables evaluadoras de la función renal en el día 5 y en el sexto mes postrasplante (correspondiente a los momentos con peor y mejor FGe respectivamente), observándose diferencias estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0,001$ para todos) (**Figuras 4.1 – 4.4**).

La correlación entre el MDRD y el cociente PtO CrO^{-1} a lo largo del estudio, arrojó resultados significativos a los 3 meses ($r_s = -0,348$ $p < 0,05$) y a los 6 meses postrasplante ($r_s = -0,523$ $p < 0,001$).

- *Estado nutricional*

Para evaluar el estado nutricional de los pacientes tras el trasplante se utilizó la AlbS y el HTO. En ambos parámetros se observó un aumento progresivo a lo largo del estudio, con diferencias significativas entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,05$), y entre el primer mes y el segundo postrasplante ($p < 0,05$), encontrando un máximo a los 6 meses de la intervención en los dos casos.

Cuando se compararon estos dos parámetros en el día 5 y en el sexto mes postrasplante, se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos casos ($p < 0,001$).

- *Perfil lipídico*

Para evaluar la evolución del perfil lipídico de los pacientes en los seis meses de seguimiento tras el trasplante se compararon las concentraciones de CT y Tg en el día 5 y en el sexto mes postrasplante. A pesar de no encontrar diferencias significativas entre ambos momentos, se observó que el CT aumentó.

- *Estado inflamatorio o infeccioso*

Tal y como era de esperar, al estudiar el estado inflamatorio de los pacientes, mediante la monitorización de la enzima LDH, de los leucocitos en sangre y de los leucocitos en orina, se observó que disminuía progresivamente, encontrando algunas diferencias significativas entre los diferentes momentos consecutivos. En la LDH se encontraron diferencias significativas entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p = 0,02$), entre el mes 1 y el 2 ($p = 0,03$), entre el mes 3 y el 4 ($p = 0,004$) y entre el mes 5 y el 6 ($p < 0,001$). En los Leu se hallaron diferencias significativas entre los días 5 y 10 postrasplante ($p = 0,03$), y entre el día 10 y el primer mes postrasplante

($p < 0,001$). En los LeuO solamente se encontraron diferencias entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p = 0,02$).

Además se compararon estos tres parámetros entre el inicio y el final del estudio, encontrándose diferencias significativas en todos los casos ($p = 0,003$, $p < 0.001$, $p = 0,008$, respectivamente).

- *Función hepática*

La función hepática se evaluó mediante la monitorización de las enzimas GOT y GPT durante los seis meses de seguimiento. Al evaluar la evolución de la concentración de ambas enzimas, no se encontraron diferencias significativas, ni entre los diferentes momentos consecutivos, ni entre el inicio y el final del estudio.

- *Otros parámetros con influencia sobre el estrés oxidativo*

Debido a la demostrada influencia que ejerce la glucosa sobre el EO (73), se estudió su evolución con el fin de valorar la posible influencia de la misma sobre los marcadores de lipoperoxidación analizados, observando un aumento entre el inicio y el final del estudio que no alcanzó significación estadística.

4.3.3. Diferencias entre pacientes trasplantados e individuos sanos al inicio y al final del estudio

- *En la función renal*

Tal y como exponemos en el apartado anterior (4.3.2), la función renal de los pacientes mejoró notablemente entre el inicio y el final del estudio. En el día 5

postrasplante, los resultados de CrS, MDRD y UrS entre el grupo de pacientes y los sujetos sanos presentaron diferencias significativas en todos los casos ($p < 0,001$). El mismo comportamiento se observó en el sexto mes postrasplante para los tres parámetros comparados entre ambos grupos ($p < 0,001$ para los tres parámetros).

En el caso de la proteinuria, representada por el cociente PtO CrO^{-1} , no se pudieron analizar las diferencias entre ambos grupos, debido a que en los pacientes sanos la excreción urinaria de proteínas fue menor del límite de detección de la técnica empleada para su determinación.

- *En el estado nutricional*

El HTO en los pacientes trasplantados, a pesar de experimentar un aumento progresivo a lo largo del estudio, fue significativamente más bajo al inicio ($p < 0,001$) y al final del mismo ($p < 0,01$) comparado con los individuos sanos.

La AlbS también aumentó progresivamente en los pacientes trasplantados a lo largo del estudio, llegando a alcanzar valores similares a los de los sanos al final del mismo, hallándose diferencias significativas en el día 5 ($p < 0,01$), pero no en el sexto mes postrasplante.

- *En el perfil lipídico*

En el día 5 postrasplante, se observaron niveles de CT en los pacientes trasplantados significativamente más bajos que los correspondientes a los controles sanos ($p = 0,006$), diferencia que no se observó en el sexto mes postrasplante.

- *En el estado inflamatorio o infeccioso*

Al comparar los Leu y los LeuO de los pacientes trasplantados al inicio del estudio con los de los sanos se observó un claro aumento en ambos parámetros en los pacientes trasplantados ($p < 0,01$ para ambos), sin embargo al final del mismo no hubo diferencias entre ambos grupos en ninguno de los dos parámetros analizados ($p > 0,05$ para ambos).

- *En la función hepática*

Se analizaron las posibles diferencias en la función hepática entre los trasplantados y los sanos, observando que las concentraciones de ambas enzimas (GOT y GPT) en los pacientes trasplantados presentaban niveles significativamente más bajos tanto al inicio como al final del estudio ($p < 0,05$ para todas).

- *Parámetros con influencia sobre el estrés oxidativo*

Se comparó la concentración de Glu en suero obtenida en los pacientes trasplantados al inicio y al final del estudio con la medida en los individuos sanos, observando diferencias al final del mismo ($p = 0,008$) pero no al inicio ($p = 0,247$), debido probablemente a ese aumento no significativo observado en la fase postrasplante.

4.3.4. Función renal en los pacientes trasplantados según las características del trasplante

- *Según si hubo o no retraso en la función inicial del injerto*

Al comparar el cociente PtO CrO^{-1} entre los pacientes que sufrieron retraso en la función inicial (con o sin necesidad de diálisis) y en los que no, se observó que dicho

cociente urinario siempre era menor en los pacientes sin RFI, encontrando diferencias significativas solo en tres de los seis momentos del estudio (**Tabla 4.3**).

En el caso del MDRD se observaron grandes diferencias entre ambos grupos en todos los momentos del estudio (**Tabla 4.3**), siendo este siempre mayor en los pacientes que no presentaron RFI.

Tabla 4.3. Diferencias encontradas en los diferentes momentos del estudio al comparar el cociente PtO CrO^{-1} y el MDRD entre los pacientes que sufrieron RFI (con o sin necesidad de diálisis) y los que no.

	Cociente PtO CrO^{-1}	MDRD
	<i>p</i>	<i>p</i>
Día 5 pos-TR	0,029	< 0,001
Día 10 pos-TR	0,551	< 0,001
1º mes pos-TR	0,087	< 0,001
2º mes pos-TR	0,047	0,018
3º mes pos-TR	0,581	0,003
6º mes pos-TR	0,012	0,006

- Según la edad del donante

Se estudió la correlación de los marcadores de función renal con la edad del donante, encontrándose una correlación débil con el MDRD a partir del primer mes postrasplante (**Tabla 4.4**). Con el cociente PtO CrO^{-1} solo se obtuvo una correlación significativa en el sexto mes del estudio ($r_s = 0,483, p = 0,002$).

Tabla 4.4. Correlaciones encontradas entre el MDRD y la edad del donante en los diferentes momentos del estudio.

	r_s	p
Día 5 pos-TR	-0,283	0,070
Día 10 pos-TR	-0,241	0,129
1° mes pos-TR	-0,300	0,051
2° mes pos-TR	-0,304	0,049
3° mes pos-TR	-0,381	0,014
6° mes pos-TR	-0,437	0,004

- Según el tipo de muerte del donante

Clasificamos a los pacientes en dos grupos en función del tipo de muerte del donante, por un lado los fallecidos por TCE y por otro aquellos fallecidos por anoxia cerebral o ACV. Al comparar el cociente $PtO\ CrO^{-1}$ y el MDRD de ambos grupos no se encontraron diferencias significativas. No obstante, a pesar de ello, pudimos observar como la media del cociente $PtO\ CrO^{-1}$ era en todo momento mayor en los pacientes del grupo de TCE, y el MDRD siempre menor a partir del segundo mes postrasplante.

- Según la procedencia del órgano y el tiempo de isquemia del mismo

Por una parte, se estudió la diferencia en el MDRD y el cociente $PtO\ CrO^{-1}$ entre pacientes trasplantados con órganos procedentes del HCUVA y pacientes con injertos procedentes de otros centros, no hallándose diferencias significativas en ningún caso.

Por otra parte, se estudió la correlación del tiempo de isquemia fría del órgano con el cociente $PtO\ CrO^{-1}$ y el MDRD a lo largo del estudio, hallándose una correlación inversa con el MDRD en los diferentes momentos del estudio (**Tabla 4.5**). Sin embargo,

con el cociente PtO CrO^{-1} solo se observó una correlación en el sexto mes postrasplante, siendo en este caso positiva ($r_s = 0.476$, $p < 0,05$).

Tabla 4.5. Correlaciones resultantes entre el MDRD y el tiempo de isquemia del órgano trasplantado en los diferentes momentos del estudio

	r_s	p
Día 5 pos-TR	-0,342	0,028
Día 10 pos-TR	-0,426	0,005
1º mes pos-TR	-0,438	0,005
2º mes pos-TR	-0,340	0,029
3º mes pos-TR	-0,415	0,007
6º mes pos-TR	-0,311	0,047

4.4. Evolución de los diferentes marcadores de estrés oxidativo analizados durante los seis meses postrasplante

4.4.1. Isoprostanos

Se analizaron un total de **16 isoprostanos** procedentes de la oxidación de diferentes ácidos grasos poliinsaturados: **12** procedentes del **AA**, **2** del **GLA** y **2** del **EPA**. De todos ellos se estudió su evolución a lo largo de los seis meses del estudio, tanto de forma individual como agrupados por familias según su procedencia y vía de producción.

4.4.1.1. Evolución individual de los diferentes isoprostanos analizados

En las **Tablas 4.6** y **4.7** se representa la evolución de los IsoPs analizados de manera individual, observándose una disminución generalizada a lo largo del estudio, excepto en 8-iso-PGF_{1α} y en 2,3-dinor-15-*epi*-15-F_{2t}, isoprostanos que aumentaron. Dicha disminución no fue progresiva, observándose fluctuaciones no significativas e independientes de la función renal entre los diferentes momentos consecutivos.

Por otra parte, se estudiaron las diferencias entre el inicio y el final del estudio, día 5 y sexto mes postrasplante respectivamente, encontrándose resultados significativos en el metabolito 8-iso-15-keto-PGF_{2α} ($p < 0,001$).

Tabla 4.6. Concentración de los isoprostanos derivados del ácido dihomo- γ -linolénico y del ácido eicosapentaenoico en los seis momentos del estudio.

	Cinco días p-TR	Diez días p-TR	Un mes p-TR	Dos meses p-TR	Tres meses p-TR	Seis meses p-TR
Isoprostanos derivados del ácido dihomo-γ-linolénico						
8-iso-PGF_{1α}	1,09 (0,62-1,56)	1,36 (1,30-1,67)	1,63 (1,50-2,90)	1,78 (0,97-3,29)	2,24 (1,11-6,18)	2,09 (1,77-3,86)
8-iso-PGE₁	34,2 (20,9-47,6)	27,8 (22,3-42,2)	20,1 (13,8-31,3)	19,9 (14,5-35,1)	25,5 (12,4-34,5)	22,3 (15,9-42,4)
Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico						
8-F_{3t}	22,8 (16,4-34,5)	23,5 (17,6-28,7)	15,8 (12,5-21,7)	16,7 (12,6-27,7)	17,8 (11,8-28,1)	15,8 (11,9-29,3)
8-<i>epi</i>-8-F_{3t}	5,10 (4,04-7,07)	4,76 (3,89-6,99)	3,27 (2,84-5,26)	3,68 (2,75-4,54)	4,45 (2,92-6,28)	4,04 (2,69-6,78)

Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartílico). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina. p-TR: postrasplante renal.

Tabla 4.7. Concentración de los isoprostanos derivados del ácido araquidónico en los seis momentos del estudio.

	Cinco días p-TR	Diez días p-TR	Un mes p-TR	Dos meses p-TR	Tres meses p-TR	Seis meses p-TR
F₂-isoprostanos: Serie 15						
<i>ent</i> -PGF _{2α}	18,8 (14,8-32,0)	19,1 (14,6-23,9)	14,7 (10,9-20,4)	14,6 (9,25-19,6)	11,3 (10,0-25,6)	17,46 (13,7-20,4)
8-iso -PGF _{2α}	76,2 (49,0-97,6)	59,2 (46,1-90,3)	45,6 (30,1-60,6)	48,4 (32,2-83,8)	50,4 (32,3-81,4)	53,6 (31,2-86,5)
8-iso-15keto - PGF _{2α}	27,2 (9,42-127,9)	7,94 (5,60-20,5)	5,4 (4,19-9,4)	7,1 (4,91-9,6)	6,1 (4,43-11,0)	6,41 (4,01-10,6)
8-iso-15(R) - PGF _{2α}	18,7 (12,7-28,6)	16,1 (12,5-23,8)	11,5 (9,10-16,3)	12,6 (8,95-18,8)	13,7 (8,56-21,5)	13,8 (8,42-19,8)
2,3-dinor-8- iso -PGF _{2α}	16,2 (11,0-24,9)	14,3 (11,4-21,9)	12,1 (10,5-15,8)	13,6 (10,4-20,5)	15,7 (10,4-23,3)	15,5 (10,3-25,1)
<i>ent</i> - 8-iso- 15(S) -PGF _{2α}	7,58 (3,31-16,9)	6,21 (3,32-12,9)	5,64 (2,66-7,97)	7,88 (2,21-13,4)	7,93 (4,34-11,3)	6,57 (3,56-9,45)
8-iso -PGF _{2β}	19,6 (14,9-32,7)	17,8 (15,3-26,1)	13,0 (10,9-21,7)	15,2 (10,6-22,8)	15,1 (9,63-24,1)	14,2 (9,18-25,8)
15-epi-15F _{2t}	28,7 (24,2-43,3)	28,5 (23,0-36,4)	20,7 (17,0-26,8)	22,58 (16,4-33,8)	21,4 (14,7-33,9)	22,2 (14,1-34,5)
2,3-dinor-15- epi-15F _{2t}	14,5 (11,2-20,1)	15,0 (10,4-20,8)	13,3 (9,52-18,2)	16,6 (10,4-24,4)	15,2 (10,0-24,0)	17,2 (12,3-23,2)
F₂-isoprostanos: Serie 5						
5-F _{2t}	53,5 (36,4-53,5)	49,4 (36,9-73,7)	34,3 (26,6-45,9)	34,4 (21,9-54,1)	39,3 (22,0-55,8)	34,3 (22,9-51,5)
5-epi-5-F _{2t}	100,7 (60,4-152,4)	91,3 (75,2-134,9)	59,6 (44,8-90,7)	67,7 (42,2-104,9)	65,7 (37,4-112,8)	73,0 (42,9-108,9)
E₂-isoprostanos: Serie 15						
8-iso-15keto - PGE ₂	16,08 (13,8-29,3)	14,1 (12,2-16,1)	10,3 (9,36-12,8)	12,8 (11,5-14,2)	10,3 (8,33-16,8)	15,0 (6,11-23,4)

Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartílico). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina. p-TR: postrasplante renal.

4.4.1.2. Evolución de los diferentes isoprostanos analizados agrupados por familias

Además de estudiarlos de manera individual se analizó su evolución a lo largo del estudio agrupándolos por familias según su procedencia y vía de producción:

- *Isoprostanos derivados del ácido araquidónico*

Los derivados del AA se estudiaron a tendiendo a cuatro grupos diferentes, tres según los subtipos y el otro restante de la suma de todos. En todos ellos se observó una disminución a lo largo del estudio con fluctuaciones entre los diferentes momentos (**Figuras 4.5 - 4.8**). A pesar de esta disminución generalizada solo se encontraron diferencias significativas en los siguientes casos: en los F₂-IsoPs de la serie 15 entre los días 5 y 10 postrasplante ($p < 0,028$) y entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,008$); en los F₂-IsoPs de la serie 5 entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,012$); en el total de los IsoPs derivados del AA entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,009$). Además se compararon los niveles de IsoPs urinarios entre el inicio y el final del estudio en los cuatro grupos, hallándose diferencias significativas en los F₂-IsoPs de la serie 15 y en los E₂-IsoPs de la serie 15 ($p < 0,036$ y $p < 0,043$, respectivamente).

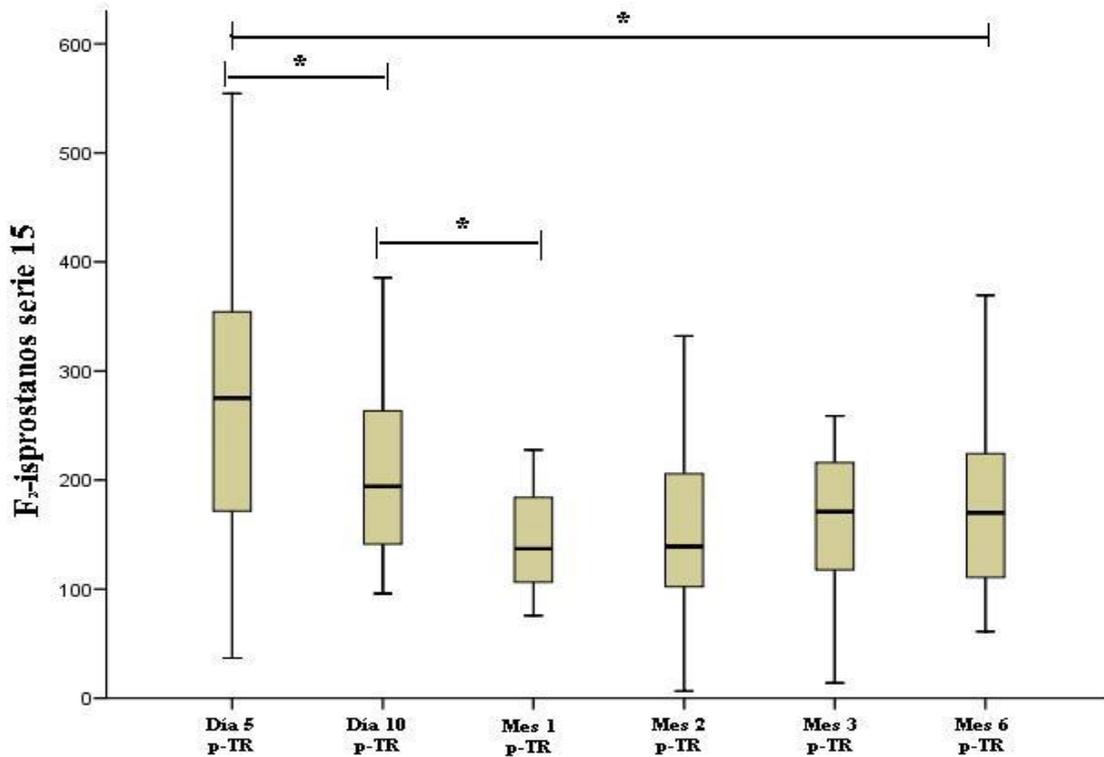


Figura 4.5. Evolución de los F₂-isoprostanos de la serie 15. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina.

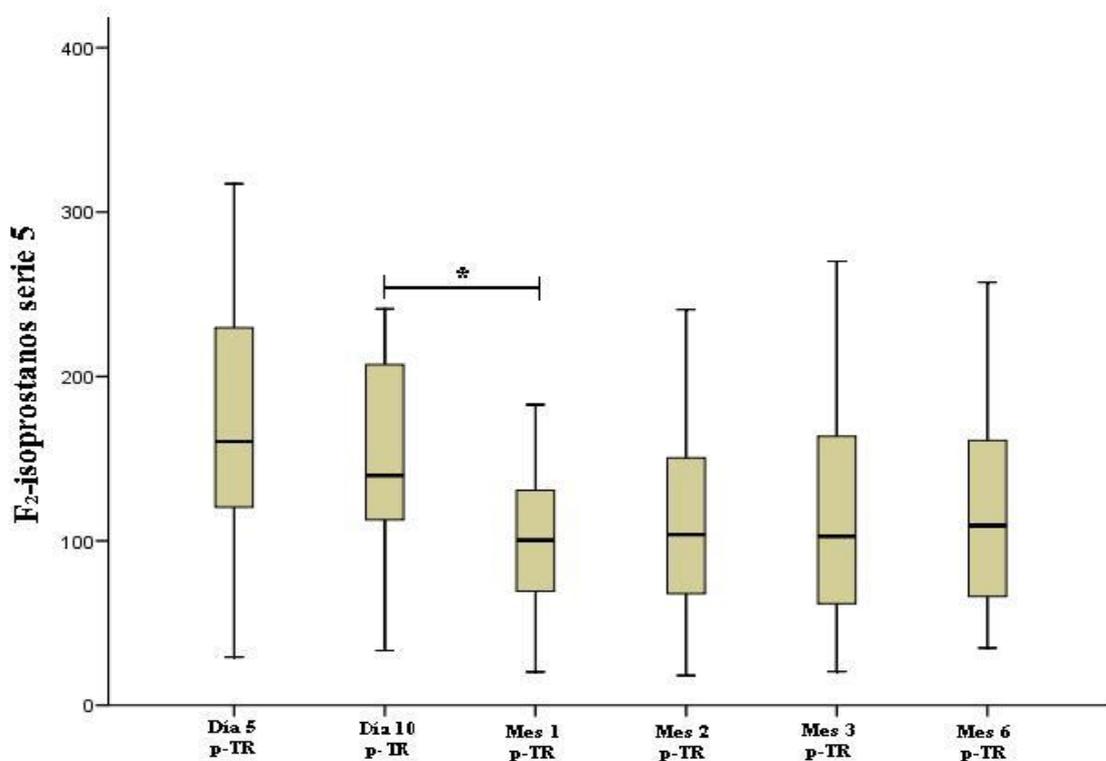


Figura 4.6. Evolución de los F₂-isoprostanos de la serie 5. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina.

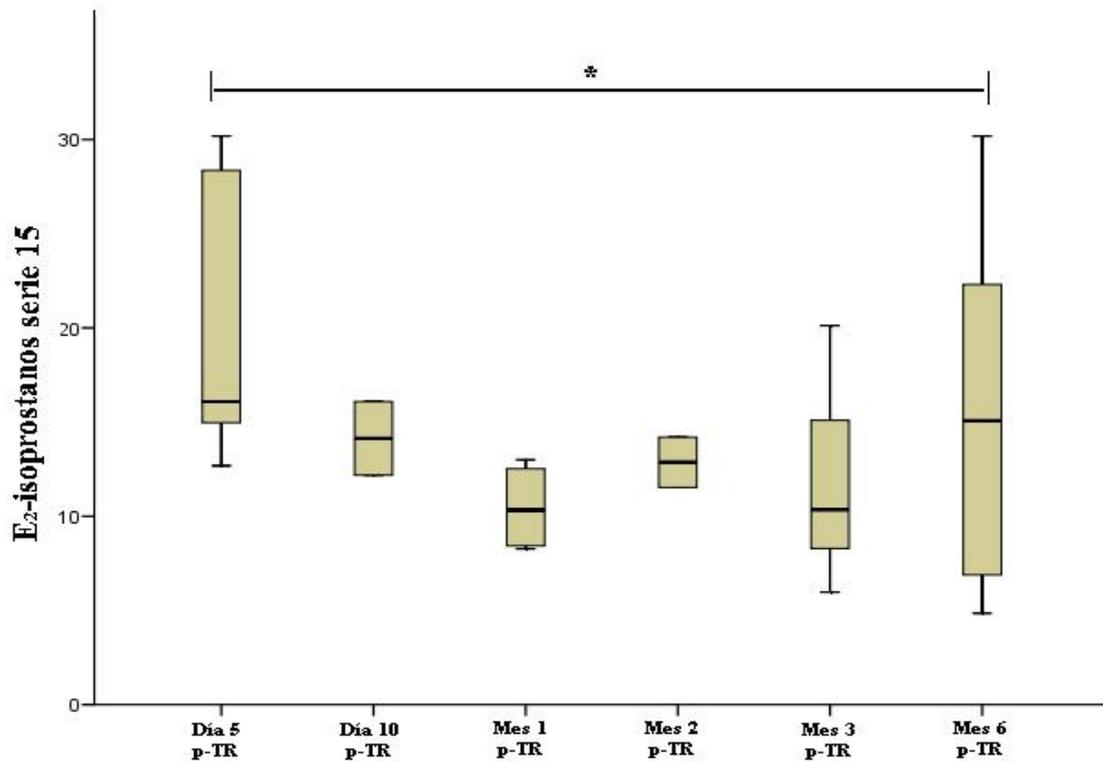


Figura 4.7. Evolución de los E₂-isoprostanos de la serie 15. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

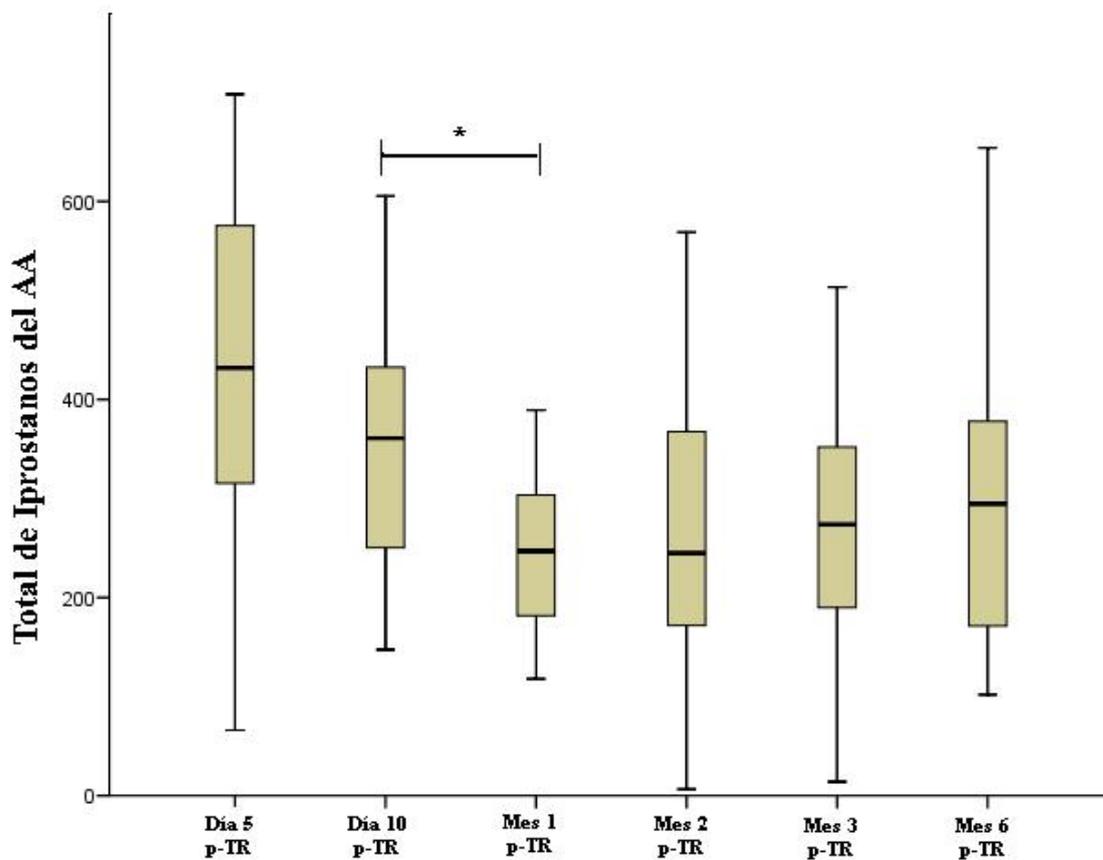


Figura 4.8. Evolución de los isoprostanos derivados del ácido araquidónico (AA). p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

- *Isoprostanos derivados del ácido dihomo- γ -linolénico*

Al estudiar la evolución de los IsoPs derivados del GLA se observó que disminuían según avanzaba la fase postrasplante con fluctuaciones entre los diferentes momentos consecutivos (**Figura 4.9**), hallándose diferencias significativas solamente entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,016$).

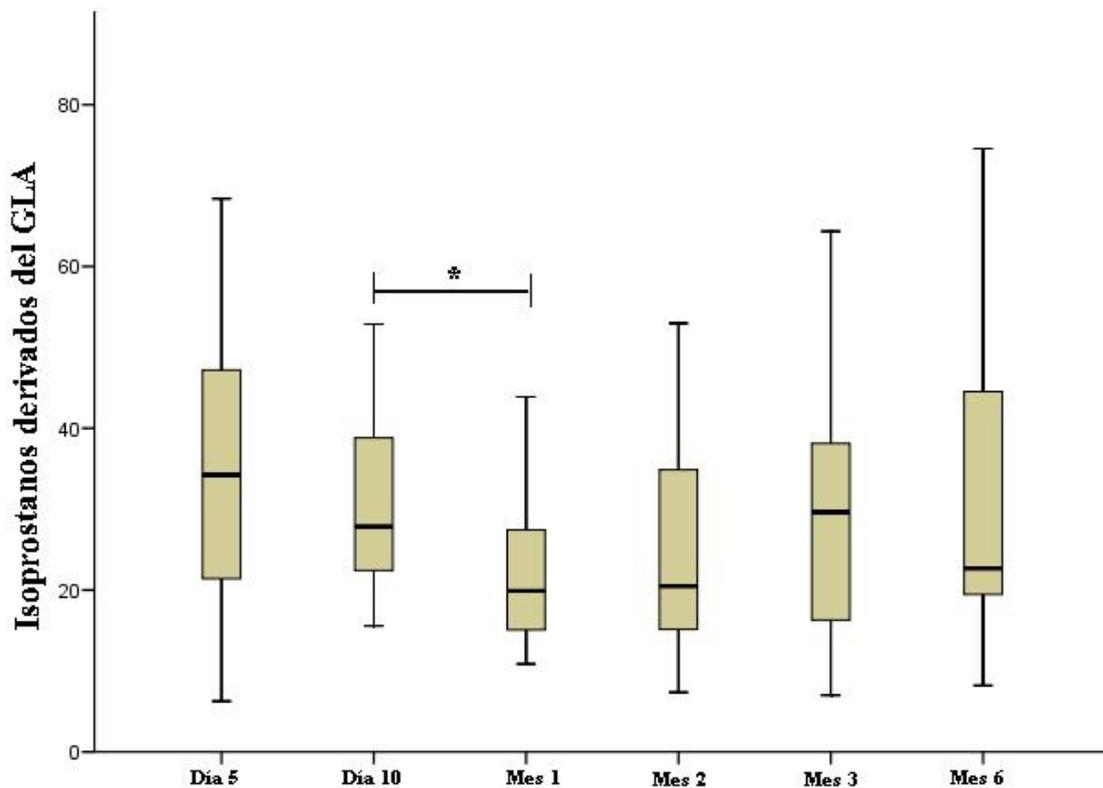


Figura 4.9. Evolución de los isoprostanos derivados del ácido dihomo- γ -linolénico (GLA). p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

- *Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico*

Los IsoPs derivados del EPA, al igual que el resto de IsoPs del estudio, disminuyeron a lo largo de la etapa postrasplante con fluctuaciones entre los diferentes momentos (**Figura 4.10**), siendo significativas solo entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,004$). Tampoco, en este caso, entre el inicio y final del estudio.

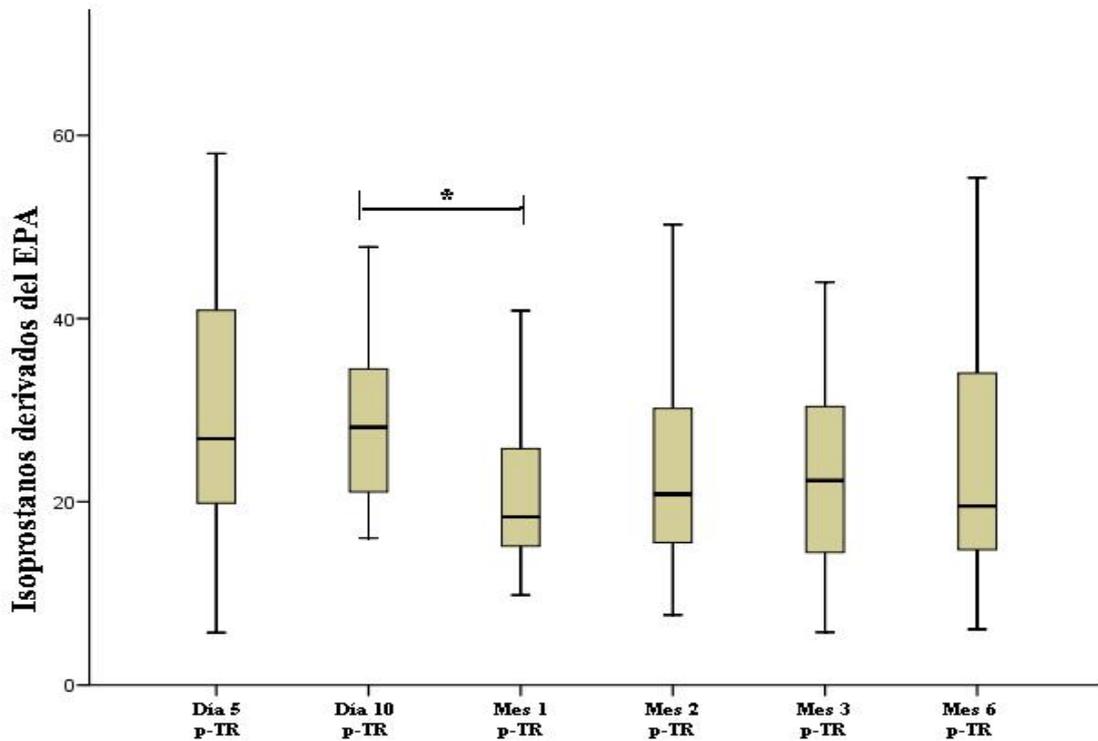


Figura 4.10. Evolución de los isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico (EPA). p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

- Isoprostanos totales

Igualmente, al hacer la suma de todos los IsoPs analizados en el estudio y ver su evolución, se observó que disminuían según avanzaba la fase postrasplante (**Figura 4.11**), encontrando diferencias significativas entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,009$), pero no entre el resto de momentos consecutivos. Tampoco se halló significancia estadística al compararlos entre el inicio y final del estudio.

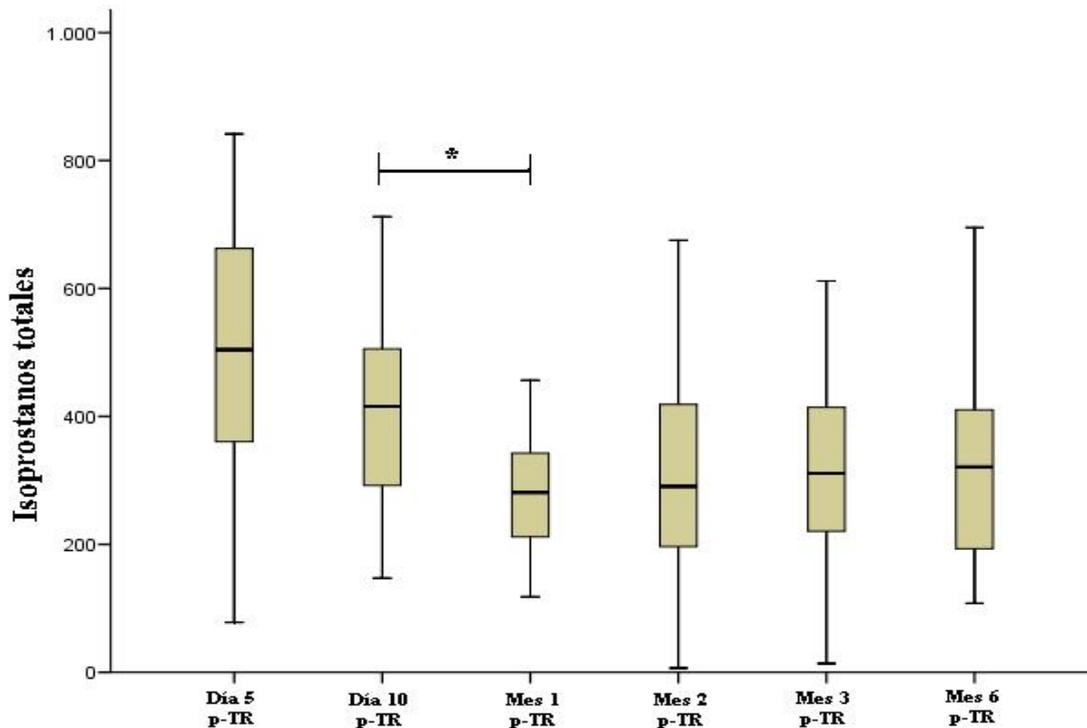


Figura 4.11. Evolución de los isoprostanos totales. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

4.4.2. Neuroprostanos

En este estudio se analizaron dos tipos de NeuroPs, los F₄-NeuroPs derivados del *n*-3 DHA, y los F₃-NeuroPs derivados del *n*-6 DPA (**Tabla 4.8**).

Del grupo de los F₄-NeuroPs, se determinaron cuatro metabolitos, de los cuales tres de ellos, el 4(*RS*)-F_{4t}-NeuroP, el 4-F_{4t}-NeuroP y el 10-F_{4t}-NeuroP, oscilaban en los diferentes momentos sin una correlación con la función renal. Por otro lado, el 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP, el otro F₄-NeuroP analizado derivado del *n*-3 DHA, aumentó durante la etapa postrasplante. A pesar de este aumento no se encontraron diferencias significativas ni entre los diferentes momentos consecutivos ($p > 0,05$ para todas las comparaciones) ni entre el día 5 y el sexto mes postrasplante ($p = 0,182$).

Tabla 4.8. Neuroprostanos urinarios encontrados en los seis momentos del estudio y en los sujetos sanos del grupo control.

	Día 5	Día 10	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 6	Sujetos sanos
	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	
F₃-Neuroprostanos							
4-<i>epi</i>-4-F_{3t}-NeuroP	2,84 (1,85-4,66)	2,20 (1,43-2,96)	2,25 (1,75-2,99)	1,84 (1,26-4,53)	2,12 (1,58-2,88)	1,61 (1,25-3,13)	ND
4-F_{3t}-NeuroP	0,35 (0,16-0,53)	1,99 (0,57-3,41)	0,34 (0,14-0,60)	0,44 (0,14-1,01)	0,20 (0,17-0,87)	0,56 (0,21-0,93)	1,49 (0,91-2,12)
F₄-Neuroprostanos							
4(<i>RS</i>)-F_{4t}-NeuroP	4,61 (3,13-12,4)	2,33 (1,09-3,87)	3,82 (3,01-5,29)	2,22 (1,28-5,85)	2,18 (1,46-3,36)	2,49 (1,79-3,56)	ND
4-F_{4t}-NeuroP	22,7 (12,0-47,1)	39,6 (16,0-69,7)	26,0 (14,4-51,1)	31,3 (10,2-52,1)	25,66 (13,5-64,4)	30,6 (16,2-46,0)	ND
10-<i>epi</i>-10-F_{4t}-NeuroP	0,94 (0,61-2,82)	0,97 (0,58-2,05)	1,10 (0,71-2,64)	1,08 (0,59-3,07)	1,48 (0,58-1,86)	1,68 (0,72-3,79)	ND
10-F_{4t}-NeuroP	0,26 (0,10-0,48)	0,24 (0,13-0,42)	0,33 (0,23-0,63)	0,60 (0,20-1,35)	0,35 (0,21-0,97)	0,63 (0,29-1,23)	ND

Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartílico) en ng mg⁻¹ creatinina en orina. ND (no detectado).

Del otro grupo de NeuroPs analizados, los F₃-NeuroPs, se estudió la evolución de dos metabolitos, encontrando igualmente diferentes comportamientos en su evolución en los seis meses postrasplante. Uno de ellos, el 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP, disminuyó según mejoraba la función renal, encontrando su mínima concentración a los 6 meses postrasplante, momento en el que se halló el valor más alto de FGe. Sin embargo, a pesar de esta disminución progresiva no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos la concentración de este NeuroP entre los diferentes momentos consecutivos ($p > 0,05$ para todas las comparaciones), pero sí al compararlas entre el día 5 y el sexto mes postrasplante ($p = 0,01$). Por el contrario, el otro F₃-NeuroP analizado, el 4-F_{3t}-NeuroP, no siguió un patrón definido, con oscilaciones en los

diferentes momentos estudiados y sin correlación con la función renal, siendo su concentración similar al comienzo y al final del estudio ($p = 0,655$).

Por otra parte, se agruparon los diferentes NeuroPs en dos grupos según el ácido graso del que procedían, F₃-NeuroPs totales y F₄-NeuroPs totales, estudiándose su evolución a lo largo del estudio y sus diferencias entre el inicio y el final del mismo. En este caso solo se hallaron diferencias significativas entre los meses 3 y 6 postrasplante en el grupo de los F₄-NeuroPs totales ($p < 0,05$) (Figuras 4.12 y 4.13).

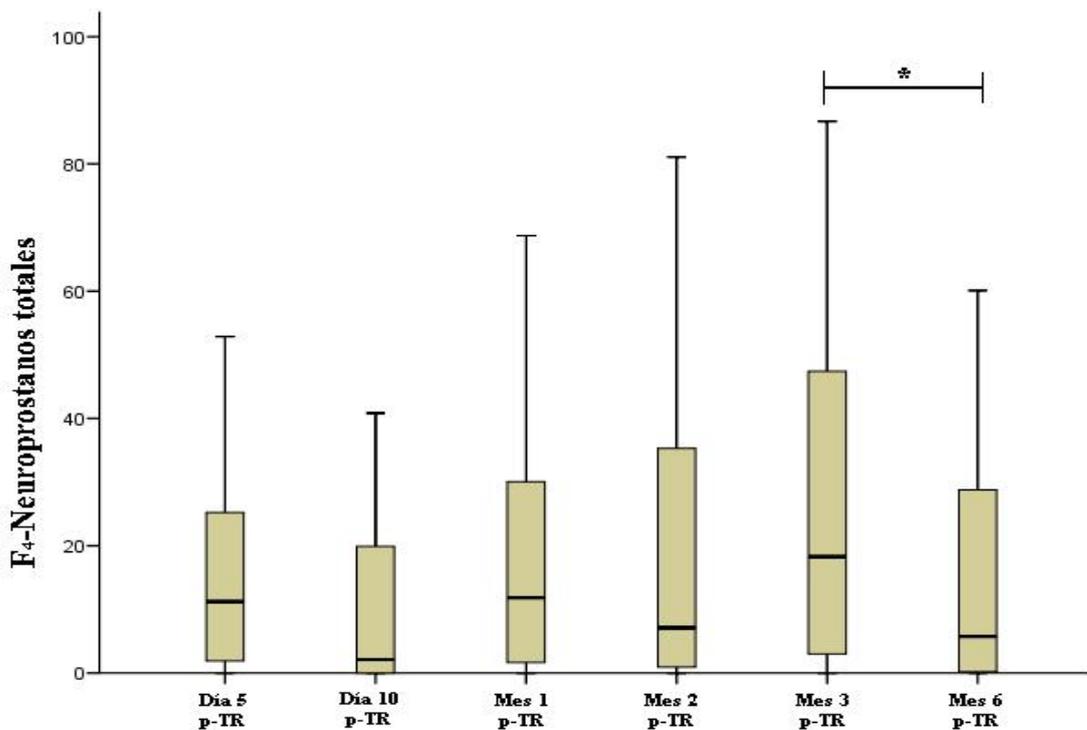


Figura 4.12. Evolución de los F₄-neuroprostanos totales. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina.

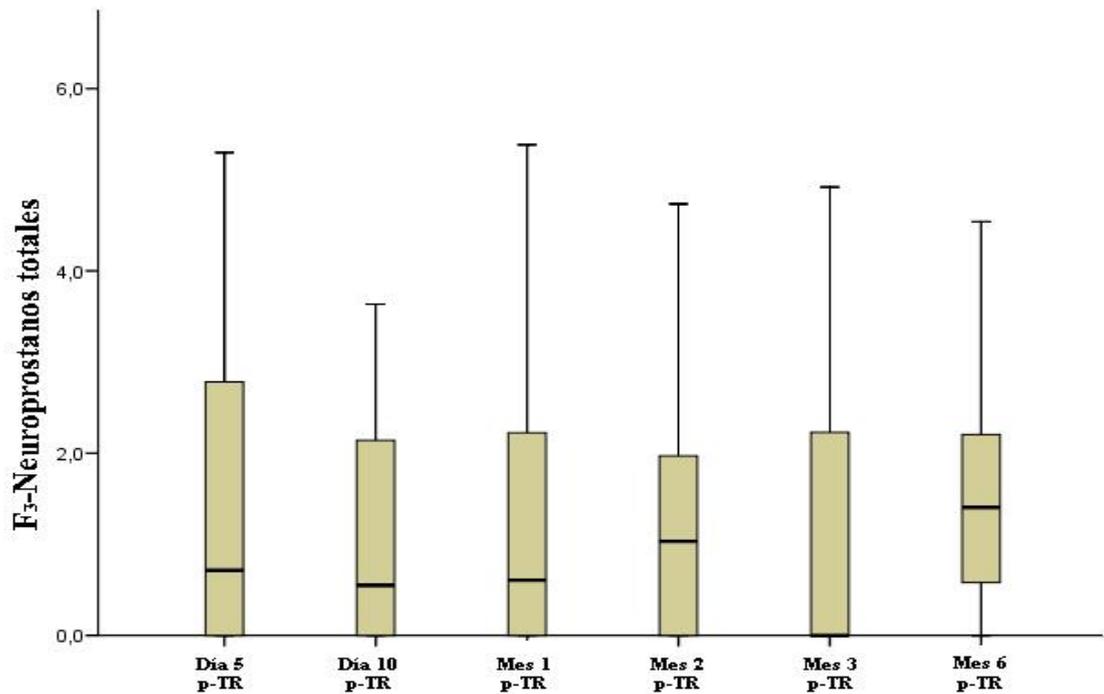


Figura 4.13. Evolución de los F₃-neuroprostano totales. p-TR (Postrasplante renal). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina.

4.4.3. F₂-dihomo-isoprostanos

En relación con los F₂-dihomo-IsoPs, biomarcadores de EO derivados del AA, se observaron dos patrones diferentes (**Tabla 4.9**). Por un lado, los metabolitos 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo-IsoP y 17-F_{2t}-dihomo-IsoP, que aumentaron y disminuyeron aleatoriamente durante la etapa postrasplante. Por otro lado, el *ent*-7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP y el *ent*-7(*S*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP, que presentaron un comportamiento similar con una disminución de sus concentraciones urinarias según avanzaba el período postrasplante y un mínimo a los tres meses de la intervención.

A pesar de la progresiva disminución observada en la excreción del 7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP y del *ent*-7(*S*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP, no se encontraron

diferencias significativas ni entre los diferentes momentos consecutivos analizados, ni al comparar sus concentraciones entre el día 5 y el sexto mes postrasplante, donde solamente se observó una tendencia a la disminución en ambos parámetros ($p = 0,072$ y $p = 0,162$, respectivamente). Sin embargo, al comparar sus concentraciones en el día 5 y en el tercer mes postrasplante, momentos en los que el cociente PtO CrO^{-1} alcanzó sus cifras más altas y más bajas respectivamente, si se observó una disminución significativa en ambos metabolitos ($p < 0,05$ para ambos), observándose por tanto como las concentraciones del *ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP* y la del *ent-7(S)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP* disminuyeron a medida que mejoraba la función renal y disminuía la proteinuria.

Tabla 4.9. Concentraciones urinarias de F₂-dihomo-isoprostanos encontradas en los diferentes momentos del estudio en los pacientes trasplantados y en los sujetos sanos.

	Día 5	Día 10	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 6	Sujetos sanos
	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	
17-<i>epi</i>-17-F_{2t}-dihomo-IsoP	0,81 (0,21-1,68)	0,72 (0,22-1,48)	0,98 (0,68-1,49)	0,84 (0,44-1,84)	1,01 (0,55-1,61)	1,10 (0,47-1,97)	1,82 (1,08-2,36)
17-F_{2t}-dihomo-IsoP	0,79 (0,22-1,59)	0,53 (0,16-1,14)	0,62 (0,35-1,11)	0,63 (0,19-1,51)	0,75 (0,24-1,80)	0,75 (0,31-1,96)	1,37 (1,18-1,74)
<i>ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP</i>	5,04 (3,07-8,34)	4,14 (2,23-7,58)	4,28 (2,55-5,92)	4,00 (2,37-5,56)	2,96 (1,98-6,93)	3,49 (2,52-5,89)	3,51 (2,81-4,56)
<i>ent-7(S)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP</i>	1,59 (1,01-2,36)	1,46 (0,59-2,60)	1,24 (0,65-2,06)	1,17 (0,81-2,01)	1,15 (0,64-1,89)	1,19 (0,63-2,19)	2,61 (2,14-3,23)

Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartílico). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina. p-TR (Postrasplante renal).

Al estudiar el comportamiento de todos los F₂-dihomo-IsoPs agrupados en una misma familia como F₂-dihomo-IsoPs totales se observó que no cumplían un patrón definido, con aumentos y disminuciones no significativas entre los diferentes momentos consecutivos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el inicio y el final

del estudio (**Figura 4.14**), comportamiento asociado a la variabilidad interpersonal de cada uno de los metabolitos.

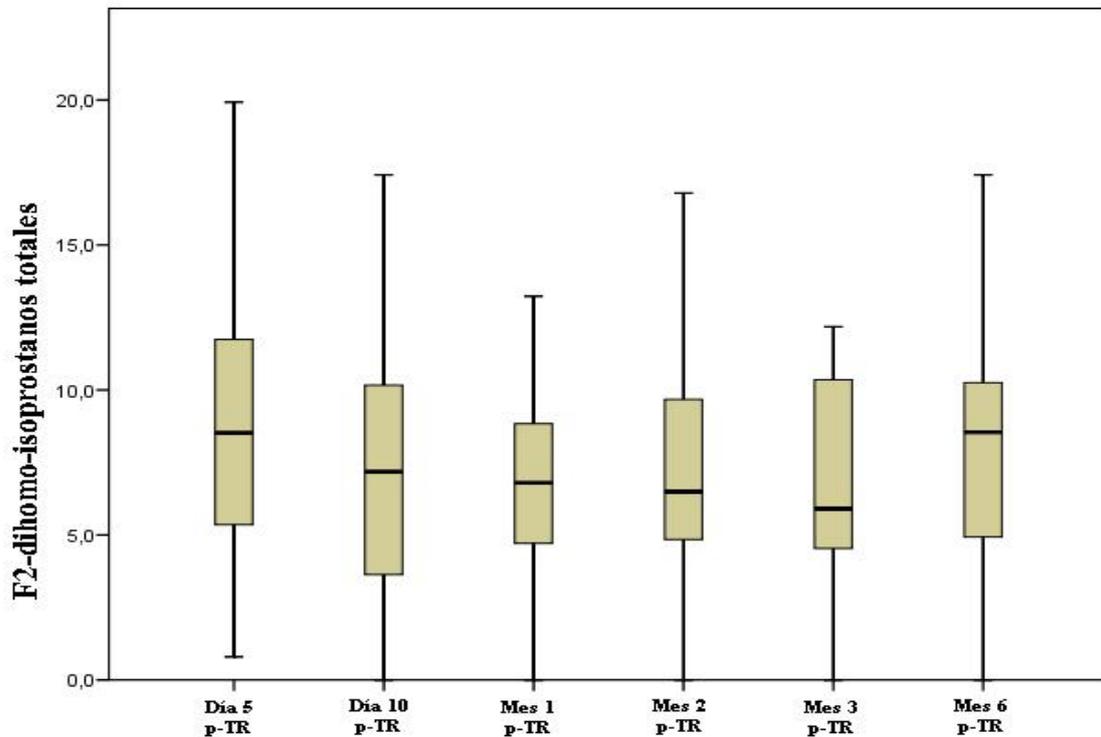


Figura 4.14. Evolución de los F₂-dihomo-isoprostanos totales. p-TR (Postrasplante renal). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina.

4.5. Correlación de los diferentes marcadores de estrés oxidativo analizados con la función renal

4.5.1. Isoprostanos

En el caso del MDRD y de la UrS no se encontraron correlaciones significativas con los diferentes IsoPs analizados en los 5 primeros momentos del estudio, sin embargo en el sexto mes postrasplante se observaron varias correlaciones significativas (**Tabla 4.10**).

Tabla 4.10. Correlaciones resultantes al comparar el MDRD y los isoprostanos, y la urea sérica y los isoprostanos en el sexto mes postrasplante.

Isoprostano ^a	MDRD		Urea sérica	
	r _s	p	r _s	p
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15				
8-iso-PGF_{2α}	-0,504	0,010	0,556	0,003
8-iso-15(R)-PGF_{2α}	-0,500	0,010	0,606	0,001
2,3-dinor-8-iso-PGF_{2α}	-0,360	0,069	0,500	0,010
15-epi-15F_{2t}	-0,486	0,013	0,659	< 0,001
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 5				
5-F_{2t}	-0,499	0,011	0,588	< 0,001
5-epi-5-F_{2t}	-0,506	0,009	0,552	0,004
Isoprostanos derivados del ácido dihomo-γ-linolénico				
8-iso-PGE₁	-0,496	0,011	0,560	0,003
Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico				
8-F_{3t}	-0,459	0,020	0,634	< 0,001
8-epi-8-F_{3t}	-0,592	0,002	0,724	< 0,001

^aSolo se representan los isoprostanos en los que encontramos diferencias significativas.

Con respecto al cociente PtO CrO⁻¹, se encontraron correlaciones significativas con los mismos IsoPs que con la UrS y con el MDRD en el primer mes postrasplante, en el segundo, en el tercero y en el sexto (**Tabla 4.11**), pero no en los días 5 y 10 postrasplante.

Tabla 4.11. Correlaciones resultantes en algunos de los momentos al comparar el cociente PtO CrO⁻¹ y los isoprostanos.

Isoprostano ^a	Mes 1 p-TR		Mes 2 p-TR		Mes 3 p-TR		Mes 6 p-TR	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p	r _s	p
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15								
8-iso-PGF_{2α}	0,337	0,145	0,714	0,004	0,463	0,034	0,611	0,002
8-iso-15(R)-PGF_{2α}	0,446	0,048	0,807	<0,001	0,505	0,020	0,663	<0,001
2,3-dinor-8-iso-PGF_{2α}	0,438	0,050	0,466	0,090	0,187	0,415	0,426	0,051
15-epi-15F_{2t}	0,556	0,011	0,847	<0,001	0,504	0,002	0,687	<0,001
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 5								
5-F_{2t}	0,398	0,081	0,767	<0,001	0,502	0,020	0,662	<0,001
5-epi-5-F_{2t}	0,443	0,046	0,752	0,001	0,448	0,046	0,609	0,002
Isoprostanos derivados del ácido ácido dihomo-γ-linolénico								
8-iso-PGE₁	0,290	0,214	0,754	0,002	0,448	0,041	0,611	0,003
Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico								
8-F_{3t}	0,707	<0,001	0,759	0,002	0,474	0,029	0,625	0,001
8-epi-8-F_{3t}	0,528	0,029	0,953	<0,001	0,443	0,050	0,707	<0,001

^aSólo se representan los isoprostanos en los que hallamos diferencias estadísticamente significativas en algún momento del estudio. p-TR (Postrasplante renal), PtO (Proteínas en orina), CrO (Creatinina en orina).

4.5.2. Neuroprostanos

Entre los NeuroPs y el MDRD no se hallaron resultados significativos al estudiar la correlación entre ambos en ninguno de los seis momentos postrasplante. Para la UrS se observó una débil correlación en el sexto mes postrasplante con la excreción de 4-epi-4-F_{3t}-NeuroP ($r_s = 0,37$; $p < 0,02$).

Por el contrario, al estudiar la relación existente entre la proteinuria y la excreción de estos metabolitos, se encontraron varias correlaciones significativas entre el cociente PtO CrO⁻¹ y el 4-epi-4-F_{3t}-NeuroP. Dichas correlaciones fueron en el primer mes después del trasplante del órgano ($r_s = 0,534$; $p < 0,02$), a los 2 meses ($r_s = 0,52$;

$p = 0,02$) y a los 6 ($r_s = 0,51$; $p < 0,01$). En los días 5 y 10 postrasplante no se encontró correlación, y en el tercer mes postrasplante se observó una ligera correlación que no alcanzó significación estadística ($r_s = 0,308$; $p = 0,191$).

4.5.3. F₂-dihomo-isoprostanos

Entre los diferentes F₂-dihomo-IsoPs analizados y el MDRD no se hallaron correlaciones significativas. Con la UrS solamente se encontró una correlación débil con el *ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP* ($r_s = 0,452$; $p = 0,004$) y otra moderada con el *ent-7(S)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP* ($r_s = 0,534$; $p = 0,001$), ambas en el sexto mes postrasplante.

En relación a la proteinuria, solo se encontraron correlaciones significativas con el *ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP* al mes postrasplante ($r_s = 0,533$; $p = 0,02$) y la del *ent-7(S)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP* a los 3 meses postrasplante ($r_s = 0,362$; $p = 0,035$).

4.6. Comparación de los diferentes marcadores de estrés oxidativo con los parámetros bioquímicos analizados

4.6.1. Isoprostanos

Se estudió la correlación de los IsoPs con los parámetros empleados para evaluar la inflamación y la función hepática en los diferentes momentos del estudio y no se encontraron resultados significativos.

En el caso de la Glu se encontraron varias correlaciones significativas con los IsoPs en diferentes momentos del estudio, todas ellas positivas. En el día 5 postrasplante con el

8-iso-15-keto-PGF_{2α} ($r_s = 0,601$; $p < 0,05$). En el día 10 postrasplante con el 2,3-dinor-8-iso-PGF_{2α} ($r_s = 0,608$; $p < 0,05$), con el 5-*epi*-5-F_{2t} ($r_s = 0,579$; $p < 0,05$), con el PGE₁ ($r_s = 0,561$; $p < 0,05$) y con el 8-*epi*-8-F_{3t} ($r_s = 0,731$; $p < 0,05$). En el primer mes postrasplante con el 8-F_{3t} ($r_s = 0,422$; $p < 0,05$) y con el 2,3-dinor-8-iso-PGF_{2α} ($r_s = 0,475$; $p < 0,05$). En el sexto mes postrasplante con el *ent*-8-iso-15(*S*)-PGF_{2α} ($r_s = 0,558$; $p = 0,003$). Sin embargo, en el segundo y tercer mes postrasplante no se hallaron resultados significativos.

4.6.2. Neuroprostanos

En el caso de los NeuroPs tampoco se encontraron correlaciones significativas a lo largo del estudio ni con los parámetros de inflamación ni con los de función hepática. Sin embargo, con la Glu, al igual que sucedió con los IsoPs, se encontraron varias correlaciones positivas con los metabolitos derivados del *n*-6 DPA. (**Tabla 4.12**).

Tabla 4.12. Correlaciones resultantes al comparar los neuroprostanos con la glucosa en los diferentes momentos del estudio.

	4- <i>epi</i> -4-F _{3t} -neuroprostano		4-F _{3t} -neuroprostano	
	r_s	p	r_s	p
Día 5 pos-TR	0,671	0,002	--	--
Día 10 pos-TR	0,471	0,045	--	--
1º mes pos-TR	0,363	0,042	0,482	0,006
2º mes pos-TR	--	--	0,403	0,013
3º mes pos-TR	0,481	0,003	--	--
6º mes pos-TR	--	--	--	--

(--):resultados no mostrados por falta de relevancia

4.6.3. F₂-dihomo-isoprostanos

Tampoco se encontraron correlaciones entre los F₂-dihomo-IsoPs y los parámetros de inflamación y de función hepática estudiados. Con respecto a la Glu se observaron ligeras correlaciones significativas con el *ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP* en diferentes momentos del estudio (**Tabla 4.13**).

Tabla 4.13. Correlaciones resultantes al comparar los F₂-dihomo-isoprostanos con la glucosa en los diferentes momentos del estudio.

<i>ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP</i>		
	<i>r_s</i>	<i>p</i>
Día 5 p-TR	0,346	0,146
Día 10 p-TR	0,252	0,312
1° mes p-TR	0,441	0,012
2° mes p-TR	0,258	0,127
3° mes p-TR	0,371	0,024
6° mes p-TR	0,358	0,025

p-TR (Postrasplante renal).

4.7. Diferencias en la excreción de los diferentes marcadores de estrés oxidativo en función de las características del trasplante

4.7.1. En función de si tuvieron retraso en el inicio de la función o no

Al comparar la excreción urinaria de IsoPs en los pacientes trasplantados en los diferentes momentos del estudio, en función de si tuvieron o no retraso en el inicio de la función, no se encontraron resultados significativos ($p > 0,05$ para todos) en los tres primeros meses postrasplante. A pesar de ello, en estos 5 momentos del estudio las concentraciones urinarias de IsoPs fueron en líneas generales mayores en los pacientes

que presentaron RFI. En el sexto mes postrasplante sí se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en varios de los IsoPs analizados, resultando siempre su concentración urinaria menor en los pacientes que no presentaron RFI (**Tabla 4.14**).

En el caso de los NeuroPs y F₂-dihomo-IsoPs no se encontraron resultados significativos en ningún momento del estudio ($p > 0,05$ para todos).

Tabla 4.14. Diferencias encontradas en el sexto mes postrasplante en la concentración urinaria de los isoprostanos en función de si tuvieron o no retraso en la función inicial.

Isoprostano ^a	<i>p</i>	No RFI (ng mg ⁻¹ CrO)	RFI (ng mg ⁻¹ CrO)
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15			
8-iso-PGF _{2α}	0,050	52,7 (34,1-70,6)	85,8 (42,7-116,6)
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	0,030	12,6 (8,4-14,6)	17,5 (11,2-27,6)
2,3-dinor-15- <i>epi</i> -15F _{2t}	0,071	16,7 (12,5-18,4)	22,8 (17,1-29,3)
15- <i>epi</i> -15F _{2t}	0,067	19,5 (14,0-26,4)	28,4 (19,4-44,5)
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 5			
5-F _{2t}	0,019	33,2 (27,0-39,4)	49,1 (32,8-82,2)
5- <i>epi</i> -5-F _{2t}	0,030	69,8 (45,5-92,0)	106,3 (68,3-164,5)
Isoprostanos derivados del ácido dihomo-γ-linolénico			
8-iso-PGE ₁	0,027	21,1 (15,0-24,4)	37,3 (19,2-49,7)
Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico			
8- <i>epi</i> -8-F _{3t}	0,040	3,6 (2,9-5,3)	6,8 (3,5-9,7)

^aSolo se representan los isoprostanos en los que encontramos diferencias relevantes. Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartílico) expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina. RFI (Retraso en la función inicial del injerto), CrO (Creatinina en orina).

4.7.2. En función del tipo de muerte del donante

Según el tipo de muerte del donante se separaron los pacientes trasplantados en dos grupos, dependiendo de si recibieron un injerto de un donante fallecido por TCE, o por anoxia cerebral o ACV. Entre ambos grupos se compararon los niveles urinarios de los diferentes marcadores de estrés oxidativo en los diferentes momentos del estudio.

En el caso de los IsoPs se observó que en el grupo de TCE la concentración urinaria de IsoPs era más alta en todos los casos en los tres primeros meses del estudio, sin embargo solo se encontraron diferencias significativas en algunos momentos postrasplante (**Tabla 4.15**). En el sexto mes postrasplante se encontraron diferencias estadísticas en varios de los IsoPs analizados, resultando siempre su concentración urinaria más alta en los pacientes del grupo de TCE (**Tabla 4.15**).

Por el contrario, ni en los NeuroPs ni en los F₂-dihomo-IsoPs se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0,05$ para todos), pero al observar su evolución se pudo apreciar como en todos los momentos la concentración del 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP y la del *ent*-7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP fue mayor en el grupo de TCE.

Tabla 4.15. Diferencias encontradas durante el estudio en la concentración urinaria de los isoprostanos en función del tipo de muerte del donante (TCE *versus* ACV/anoxia cerebral)

	Día 5	Día 10	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 6
	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR
Isoprostano ^a	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15						
8-iso-PGF _{2α}	0,209	0,562	0,257	0,381	0,221	0,027
8-iso-15keto-PGF _{2α}	0,005	0,039	0,219	0,587	0,354	0,011
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	0,040	0,290	0,140	0,212	0,060	0,014
2,3-dinor-8-iso-PGF _{2α}	0,137	0,342	0,170	0,185	0,531	0,015
<i>ent</i> -8-iso-15(S)-PGF _{2α}	0,129	0,009	0,204	0,011	0,277	0,041
15- <i>epi</i> -15F _{2t}	0,040	0,043	0,082	0,436	0,144	0,020
2,3-dinor-15- <i>epi</i> -15F _{2t}	0,304	0,174	0,102	0,185	0,034	<0,001
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 5						
5-F _{2t}	0,086	0,571	0,205	0,161	0,244	0,011
5- <i>epi</i> -5-F _{2t}	0,070	0,892	0,246	0,311	0,345	0,027
Isoprostanos derivados del ácido dihomo-γ-linolénico						
8-iso-PGE ₁	0,114	0,205	0,170	0,242	0,325	0,020
Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico						
8-F _{3t}	0,009	0,225	0,047	0,086	0,070	0,021
8- <i>epi</i> -8-F _{3t}	0,003	0,892	0,044	0,125	0,313	0,023

^aSolo se representan los isoprostanos en los que se hallaron diferencias en algún momento del estudio. p-TR (Postrasplante renal), TCE (Traumatismo craneoencefálico), ACV (Accidente cerebrovascular).

4.7.3. En función de la edad del donante

Se estudió la correlación entre los niveles urinarios de los metabolitos de lipoperoxidación y la edad del donante, resultando en el sexto mes postrasplante una correlación positiva en los metabolitos incluidos en la **Tabla 4.16**. Este hallazgo nos indicó que a mayor edad del donante, la excreción urinaria de los marcadores de estrés

oxidativo era mayor, y permitirá a los especialistas abordar el proceso de trasplante desde otro punto de vista con el objetivo de aumentar la tasa de éxito del mismo.

Tabla 4.16. Correlaciones resultantes en el sexto mes postrasplante al comparar la edad del donante y los isoprostanos.

Isoprostano ^a	Edad del donante	
	r _s	p
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15		
8-iso-PGF _{2α}	0,481	0,015
8-iso-15keto-PGF _{2α}	0,446	0,045
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	0,509	0,009
2,3-dinor-8-iso-PGF _{2α}	0,412	0,040
15- <i>epi</i> -15F _{2t}	0,577	0,002
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 5		
5-F _{2t}	0,517	0,008
5- <i>epi</i> -5-F _{2t}	0,489	0,013
E₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15		
8-iso-15keto-PGE ₂	0,846	0,016
Isoprostanos derivados del ácido dihomo-γ-linolénico		
8-iso-PGE ₁	0,470	0,017
8-iso-PGF ₁	0,900	0,037
Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico		
8-F _{3t}	0,539	0,049
8- <i>epi</i> -8-F _{3t}	0,565	0,005

^aSolo se representan los isoprostanos en los que se hallaron resultados significativos.

4.7.4. En función del tiempo de isquemia fría del órgano trasplantado

Se estudió la influencia del tiempo de isquemia fría del órgano trasplantado en la excreción urinaria de todos los metabolitos lipídicos, encontrándose resultados significativos en algunos IsoPs en los diferentes momentos del estudio (**Tabla 4.17**).

Tabla 4.17. Correlaciones resultantes al comparar el tiempo de isquemia fría del órgano trasplantado y los isoprostanos urinarios en los diferentes momentos del estudio.

Isoprostano ^a		Día 5	Día 10	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 6
		p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR	p-TR
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 15							
8-iso-PGF_{2α}	r _s	0,365	--	0,335	0,554	--	0,352
	p	0,047	--	0,094	0,009	--	0,082
8-iso-15keto-PGF_{2α}	r _s	0,340	--	--	--	--	0,586
	p	0,065	--	--	--	--	0,013
8-iso-15(R)-PGF_{2α}	r _s	0,390	--	0,363	0,547	0,351	0,370
	p	0,032	--	0,068	0,010	0,092	0,068
2,3-dinor-8-iso-PGF_{2α}	r _s	0,317	--	--	0,418	--	0,367
	p	0,087	--	--	0,059	--	0,060
ent-8-iso-15(S)-PGF_{2α}	r _s	0,343	--	--	0,461	--	--
	p	0,073	--	--	0,042	--	--
8-iso-PGF_{2β}	r _s	0,409	--	--	--	--	--
	p	0,022	--	--	--	--	--
15-epi-15F_{2t}	r _s	0,418	--	0,483	0,555	--	0,347
	p	0,021	--	0,012	0,009	--	0,089
2,3-dinor-15-epi-15F_{2t}	r _s	0,347	0,359	0,416	--	--	0,607
	p	0,060	0,078	0,034	--	--	0,001
F₂-isoprostanos derivados del ácido araquidónico: Serie 5							
5-F_{2t}	r _s	0,364	--	--	0,535	--	0,395
	p	0,047	--	--	0,012	--	0,050
5-epi-5-F_{2t}	r _s	0,370	--	--	0,500	--	0,348
	p	0,044	--	--	0,020	--	0,087
Isoprostanos derivados del ácido dihomo-γ-linolénico							
8-iso-PGE₁	r _s	0,345	--	--	0,539	--	0,317
	p	0,061	--	--	0,011	--	0,122
Isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico							
8-F_{3t}	r _s	0,380	--	0,398	0,475	--	0,296
	p	0,038	--	0,043	0,029	--	0,150
8-epi-8-F_{3t}	r _s	0,465	--	--	0,515	--	0,377
	p	0,014	--	--	0,049	--	0,076

^aSolo se representan los isoprostanos en los que se hallaron resultados significativos en algún momento del estudio. p-TR (Postrasplante renal). (--): resultados no mostrados por falta de relevancia estadística.

4.8. Comportamiento y valor predictor de los marcadores de estrés oxidativo en los pacientes con rechazo

Se estudiaron los niveles urinarios de los diferentes marcadores de estrés oxidativo analizados (IsoPs, NeuroPs y F₂-dihomo-IsoPs) en los pacientes que presentaron un rechazo confirmado por biopsia y se compararon con los de los trasplantados que no presentaron rechazo en los diferentes momentos del estudio, observando que no seguían un patrón común si no uno fluctuante con aumentos y disminuciones no explicables. Además de esto, no se pudieron comparar estadísticamente ambos grupos mediante el test no paramétrico *U de Mann-Whitney* debido al bajo número de rechazos encontrados en el estudio.

4.9. Diferencias en los niveles de neuroprostanos y de F₂-dihomo-isoprostanos entre el grupo control y los trasplantados

Debido a la novedad de dichos metabolitos, unida a la escasez de estudios en la bibliografía actual que emplean los NeuroPs y F₂-Dihomo-IsoPs como marcadores de lipoperoxidación, nos planteamos la comparación de los niveles urinarios de estos compuestos entre los pacientes trasplantados y los del grupo de sujetos sanos, nunca antes investigado. Dicha comparativa se hizo con el objetivo de observar las diferencias en su excreción entre ambos grupos, lo que nos permitirá investigar desde un punto de vista fisiopatológico como afecta el EO a los AGP de los que proceden tras un trasplante renal.

A nivel cualitativo se observó que los F₂-dihomo-IsoPs se detectaron en ambos grupos de pacientes. Por el contrario los NeuroPs solo se detectaron en los receptores de

trasplante renal, siendo el 4-F_{3t}-NeuroP el único detectado en el grupo de sujetos sanos (Tabla 4.8). Cabe destacar que su epímero, el 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP, no se detectó, probablemente debido al mayor LOD/LOQ de nuestro método analítico para este metabolito (87).

Al comparar la concentración urinaria de estos metabolitos en los sujetos sanos y en los pacientes trasplantados en el día cinco y en el sexto mes postrasplante (correspondiente a los momentos con peor y mejor función renal respectivamente), se observó que en ambos momentos la concentración del 4-F_{3t}-NeuroP era más baja en los sujetos sanos ($p < 0,05$ para ambas comparaciones). En el caso de los F₂-dihomo-IsoPs se detectó que en ambos momentos los niveles urinarios de 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo-IsoP, 17-F_{2t}-dihomo-IsoP y *ent*-7(*S*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP eran significativamente menores en los pacientes trasplantados ($p < 0,05$ para todos los casos). Por el contrario los niveles del otro F₂-dihomo-IsoP analizado, el *ent*-7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP, fueron significativamente más altos en el quinto día postrasplante ($p < 0,05$), y similares al sexto mes postrasplante (Tabla 4.9).

4.10. Prostanoides: prostaglandinas y tromboxanos

4.10.1. Evolución de los prostanoides durante los seis meses postrasplante

4.10.1.1. Evolución individual de los diferentes prostanoides analizados

Se analizaron un total de **23 PTs** procedentes de diferentes ácidos grasos poliinsaturados y generados por diferentes vías de síntesis: **22 PGs** y **un TX**. La mayoría se detectaron en todos los momentos del estudio, excepto el 6-keto-PGF_{1 α} y el 20-OH-PGE₂ que no se detectaron en ningún momento del mismo. El

2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} solo se detectó a partir del primer mes postrasplante, y el tetranor-PGJM se halló en todos los momentos excepto en el día 5 postrasplante (**Tabla 4.18**).

Al observar la evolución de los diferentes PTs analizados de manera individual se pudo apreciar de manera general que la mayoría de los compuestos disminuían entre el inicio y el final del estudio, encontrando diferencias significativas en el metabolito 15-keto-PGF_{2α}. Los que no disminuyeron son el 2,3-dinor-11-β-PGF_{2α}, el tetranor-PGJM, el 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, el 20-OH-PGF_{2α} y en el 17-*trans*-PGF_{3α}. De estos el 2,3-dinor-11-β-PGF_{2α} y el 17-*trans*-PGF_{3α} presentaron diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$ para ambos).

A lo largo del estudio, se pudo observar como casi todos presentaban fluctuaciones no significativas entre los diferentes momentos consecutivos, aumentando muchos de ellos entre los días 5 y 10 postrasplante de forma no significativa ($p > 0,05$). Posteriormente, entre el día 10 y el primer mes postrasplante, algunos de ellos disminuyeron significativamente (**Tabla 4.18**). Los únicos compuestos que presentaron un patrón continuo durante los seis meses postrasplante son el 11-dehidro-TXB₂ y el 17-*trans*-PGF_{3α}, analitos que descendieron y aumentaron respectivamente.

Tabla 4.18. Concentración de los prostanoideos analizados en los seis momentos del estudio.

	Cinco días p-TR	Diez días p-TR	Un mes p-TR	Dos meses p-TR	Tres meses p-TR	Seis meses p-TR
AA: Vía de síntesis H						
U-44619	47,1 (36,6-79,9)	53,8 (33,1-79,8)	58,6 (28,8-83,5)	40,4 (25,5-77,5)	43,2 (24,9-73,8)	39,9 (26,1-68,2)
U-44069	25,5 (12,5-50,0)	32,2 (12,4-44,4)	40,3 (15,8-53,9)	24,6 (10,7-54,7)	26,2 (12,8-51,0)	24,1 (12,4-37,5)
AA: Vía de síntesis D						
PGD₂*	5,97 (4,71-8,27)	4,95 (4,12-7,95)	3,68 (3,03-5,89)	4,28 (3,22-6,78)	4,96 (3,16-8,41)	5,39 (2,95-8,88)
PGDM*	8,83 (7,28-15,2)	9,02 (7,38-12,1)	7,04 (5,73-9,14)	7,34 (5,27-11,5)	8,37 (5,54-11,6)	7,31 (4,93-10,3)
Tetranor- PGDM- lactona*	16,4 (12,1-32,0)	22,5 (16,2-29,6)	14,9 (12,9-17,1)	16,8 (11,4-21,4)	15,6 (10,8-26,3)	15,1 (9,86-28,6)
11-β-PGF_{2α}*	12,3 (9,76-16,3)	11,9 (9,45-14,7)	8,53 (7,21-11,6)	9,27 (6,57-14,2)	8,86 (6,37-15,5)	9,84 (6,45-14,7)
2,3-dinor-11- β-PGF_{2α}	46,3 (36,5-77,0)	54,3 (33,6-83,4)	58,6 (32,2-76,7)	78,9 (50,4-142,9)	65,2 (40,0-118,9)	74,2 (60,1-114,9)
Tetranor- PGDM	17,8 (13,9-27,8)	19,4 (13,9-24,4)	14,8 (12,5-21,2)	13,98 (10,2-23,5)	13,8 (11,7-22,7)	16,7 (9,8-23,6)
Tetranor- PGJM	ND	113,4 (93,2-171,7)	112,9 (80,4-155,5)	116,6 (95,2-207,8)	154,8 (97,8-265,3)	133,6 (90,6-238,4)
AA: Vía de síntesis E						
PGE₂*	14,8 (11,6-20,2)	14,3 (11,5-19,5)	10,7 (9,05-14,5)	11,7 (7,81-18,7)	11,5 (7,55-18,2)	11,6 (7,6-18,8)
20-OH-PGE₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tetranor- PGEM*	9,17 (5,82-21,5)	14,1 (6,96-17,5)	7,21 (5,30-10,9)	5,79 (4,54-21,6)	9,18 (5,39-16,6)	10,9 (6,25-15,7)
Tetranor- PGAM	20,9 (10,6-39,2)	17,8 (13,7-22,2)	14,9 (12,9-19,2)	21,6 (14,9-30,6)	17,4 (12,4-21,8)	18,7 (10,2-32,1)

Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartílico). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina. AA (Ácido araquidónico), ND (No detectados). p-TR (Postrasplante renal). *Prostanoideos que presentaron una disminución significativa ($p < 0,05$) entre el día 10 y el primer mes postrasplante.

Tabla 4.18. (Continuación) Concentración de los prostanoides analizados en los seis momentos del estudio.

	Cinco días p-TR	Diez días p-TR	Un mes p-TR	Dos meses p-TR	Tres meses p-TR	Seis meses p-TR
AA: Vía de síntesis F						
20-OH-PGF_{2α}	555,8 (328,6-834,1)	480,1 (389,2-769,4)	501,3 (349,5-707,4)	508,3 (343,3-764,9)	597,7 (395,9-908,2)	644,9 (395,9-852,8)
19(R)-OH-PGF_{2α}	370,1 (181,2-621,1)	252,8 (188,0-502,5)	308,4 (233,6-370,4)	259,2 (174,3-397,9)	292,5 (186,9-497,3)	373,7 (247,5-454,2)
15-keto-PGF_{2α}*	69,7 (6,61-229,2)	3,98 (1,72-45,7)	2,32 (0,78-2,23)	2,08 (0,88-3,95)	3,09 (1,66-5,60)	2,69 (1,70-5,37)
Tetranor-PGFM	37,8 (18,5-119,3)	31,4 (25,2-55,8)	23,3 (19,4-28,6)	31,2 (22,3-48,3)	19,8 (16,4-21,9)	23,08 (16,7-43,7)
AA: Vía de síntesis I						
2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}	ND	ND	177,4 (87,7-253,8)	162,9 (100,4-295,0)	195,2 (139,8-292,9)	260,3 (148,5-458,5)
6-keto-PGF_{1α}	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AA: Tromboxanos						
11-dehidro-TXB₂	14,8 (10,6-26,9)	14,3 (11,5-18,4)	12,2 (10,1-15,7)	11,3 (8,22-18,5)	10,8 (7,66-15,3)	9,42 (7,74-26,5)
Prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-γ-linolénico						
PGE_{1α}*	5,80 (3,2-8,9)	4,97 (4,07-7,80)	3,53 (2,59-5,09)	4,03 (2,70-6,55)	3,94 (2,24-7,78)	4,29 (2,48-6,78)
PGF_{1α}*	15,3 (10,2-26,6)	12,9 (10,1-20,8)	9,15 (7,42-16,5)	9,48 (6,11-16,1)	13,4 (8,59-20,0)	10,6 (6,86-17,2)
Prostaglandinas derivadas del ácido eicosapentaenoico						
17-trans-PGF_{3α}*	5,06 (2,70-9,48)	5,44 (2,08-11,9)	6,25 (3,67-9,75)	6,47 (2,39-11,5)	9,27 (4,70-15,9)	13,2 (7,80-19,7)

Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartílico). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina. AA (Ácido araquidónico), ND (No detectados). p-TR (Postrasplante renal). *Prostanoides que presentaron una disminución significativa ($p < 0,05$) entre el día 10 y el primer mes postrasplante.

4.10.1.2. Evolución de los diferentes prostanoides agrupados por familias

Los PTs derivados del AA se dividen en cinco grupos según su vía de síntesis:

PTs de la vía H, PTs de la vía D, PTs de la vía E, PTs de la vía F, y TXs.

Los PTs de la vía H presentaron oscilaciones no significativas entre los diferentes momentos del estudio, con una ligera disminución entre el inicio y el final que no alcanzó significación estadística (**Figura 4.15**).

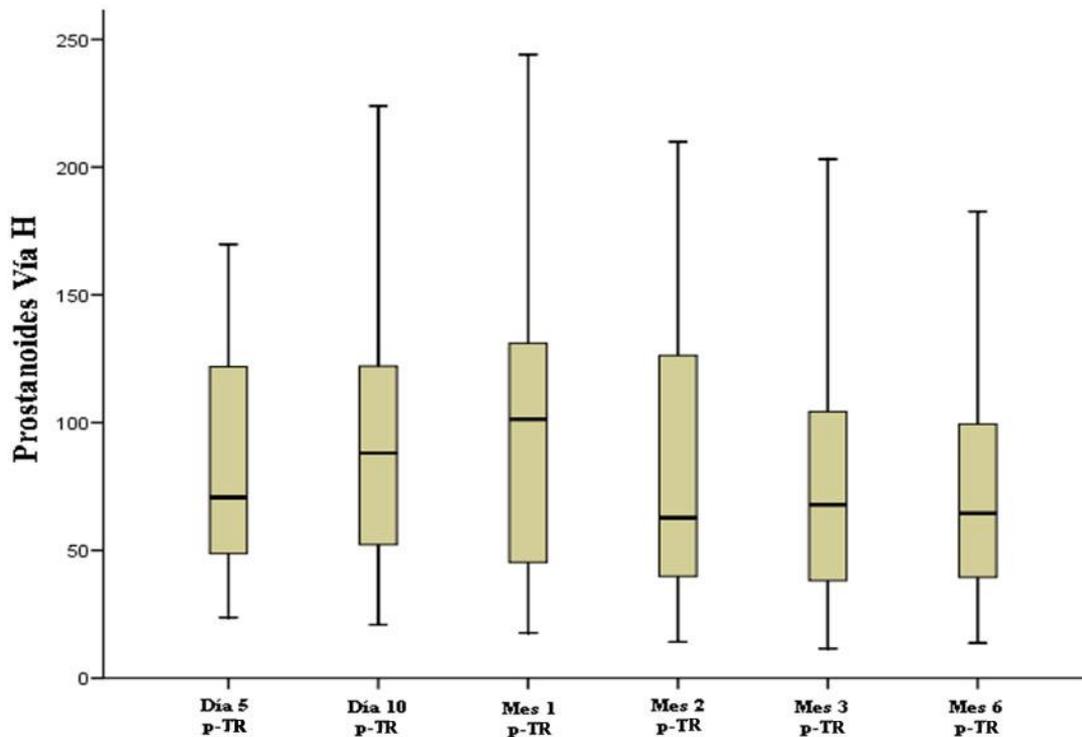


Figura 4.15. Evolución de los prostanooides de la vía H derivados del ácido araquidónico. p-TR (Postrasplante renal). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

Los PTs de la vía D, al estudiarlos de manera conjunta, presentaron oscilaciones entre los diferentes momentos con una tendencia al aumento, reflejando diferencias significativas entre el mes 1 y el mes 2 postrasplante ($p < 0,05$), y entre el inicio y el final del estudio ($p < 0,001$) (**Figura 4.16**).

Los PTs de la vía E disminuyeron significativamente entre el día 10 y el primer mes postrasplante ($p < 0,05$), y entre el mes 1 y el 2 postrasplante ($p < 0,05$). Entre el resto de momentos consecutivos presentaron oscilaciones no significativas. Entre el inicio y el final del estudio tampoco se hallaron diferencias significativas (**Figura 4.17**).

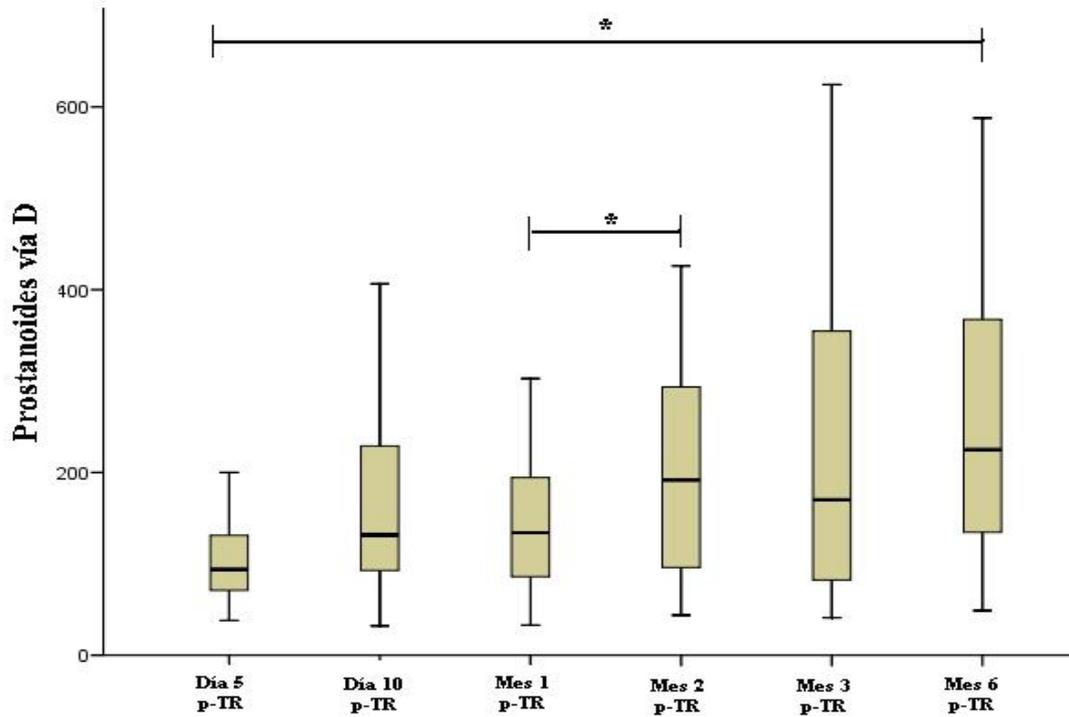


Figura 4.16. Evolución de los prostanooides de la vía D derivados del ácido araquidónico. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

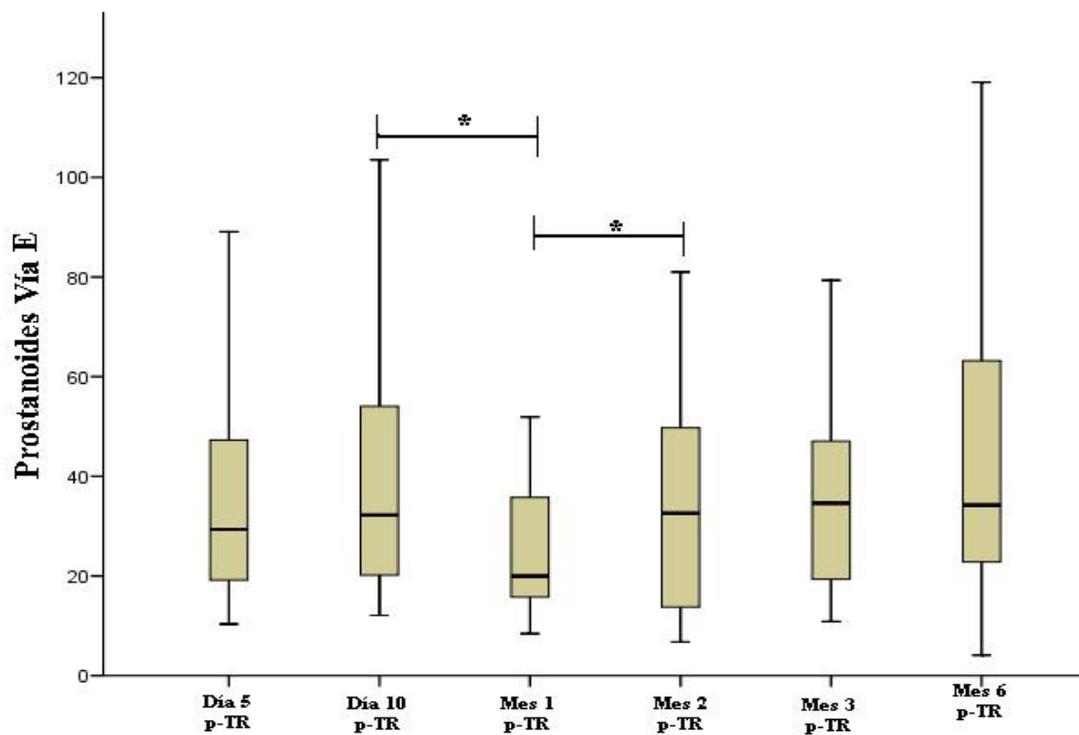


Figura 4.17. Evolución de los prostanooides de la vía E derivados del ácido araquidónico. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

Los derivados de la PGF_2 presentaron oscilaciones no significativas a lo largo del estudio, con concentraciones similares al inicio y al final del mismo (**Figura 4.18**).

En el caso de los derivados de la PGI_2 se observó que el 2,3-dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ se empezó a detectar en el momento 3 del estudio, con una tendencia al aumento hasta el final del mismo. Entre los diferentes momentos consecutivos no hubo diferencias significativas, pero al comparar su concentración en los meses uno y seis postrasplante se halló un aumento considerable pero no significativo ($p = 0,067$). El otro compuesto de esta familia, el 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, no se detectó a lo largo del estudio.

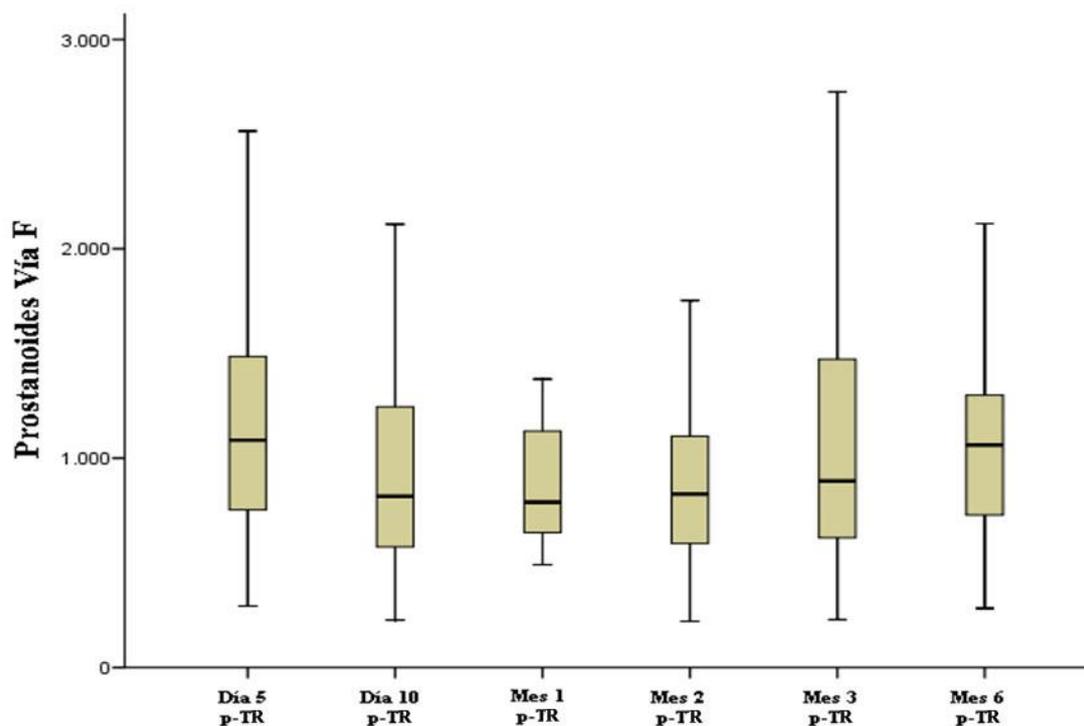


Figura 4.18. Evolución de los prostanooides de la vía F derivados del ácido araquidónico. p-TR (Postrasplante renal). Datos expresados en ng mg^{-1} creatinina en orina.

En el caso del único tromboxano analizado, el 11-dehidro- TXB_2 , observamos como disminuía progresivamente a lo largo del estudio sin presentar diferencias significativas ni entre el inicio y el final, ni entre los diferentes momentos consecutivos (**Figura 4.19**).

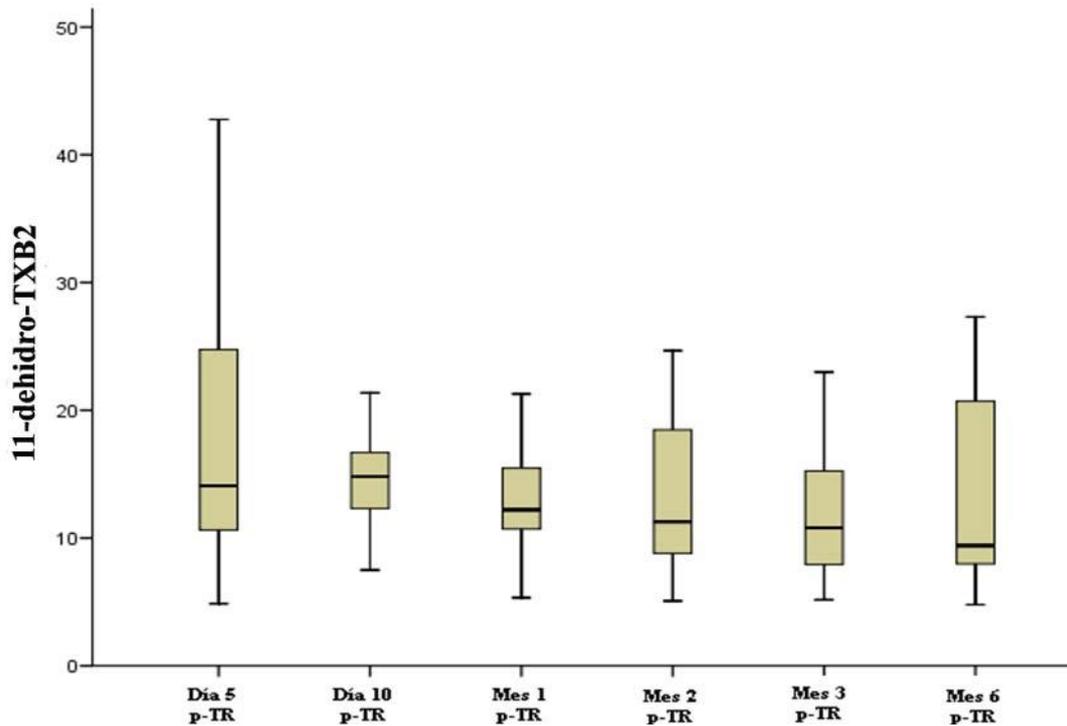


Figura 4.19. Evolución del 11-dehidro-TXB₂ derivado del ácido araquidónico. p-TR (Postrasplante renal). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina.

Además de los PTs derivados del AA, se analizaron dos PTs derivados del GLA y un metabolito derivado del EPA. Los primeros, al agruparlos en conjunto, vimos que presentaban ligeras oscilaciones entre los diferentes momentos del estudio con una tendencia al descenso. La disminución entre el día 10 y el primer mes postrasplante alcanzó el nivel de significancia establecido ($p < 0,05$), pero no entre el inicio y el final de la etapa estudiada (**Figura 4.20**).

En el caso del 17-*trans*-PGF_{3 α} , único PT analizado derivado del EPA observamos como seguía un patrón continuo ascendente, presentando diferencias significativas entre el inicio y el final del estudio, y entre los meses 3 y 6 postrasplante ($p < 0,05$ para ambos) (**Figura 4.21**).

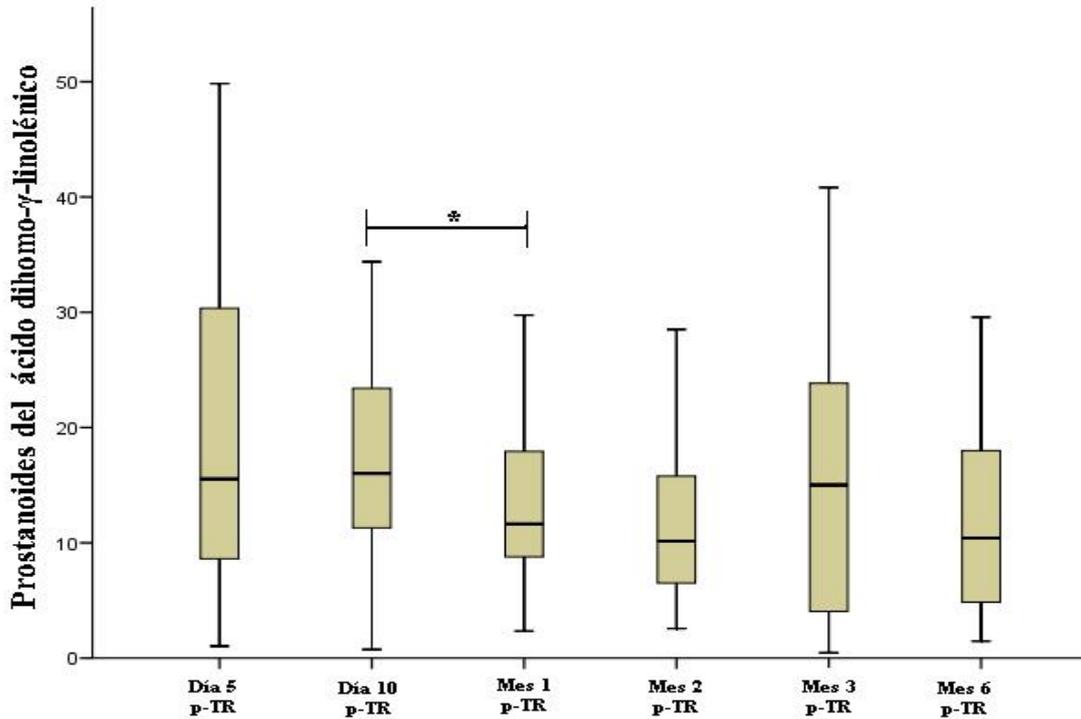


Figura 4.20. Evolución de los prostanooides derivados del ácido dihomo- γ -linolénico. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina.

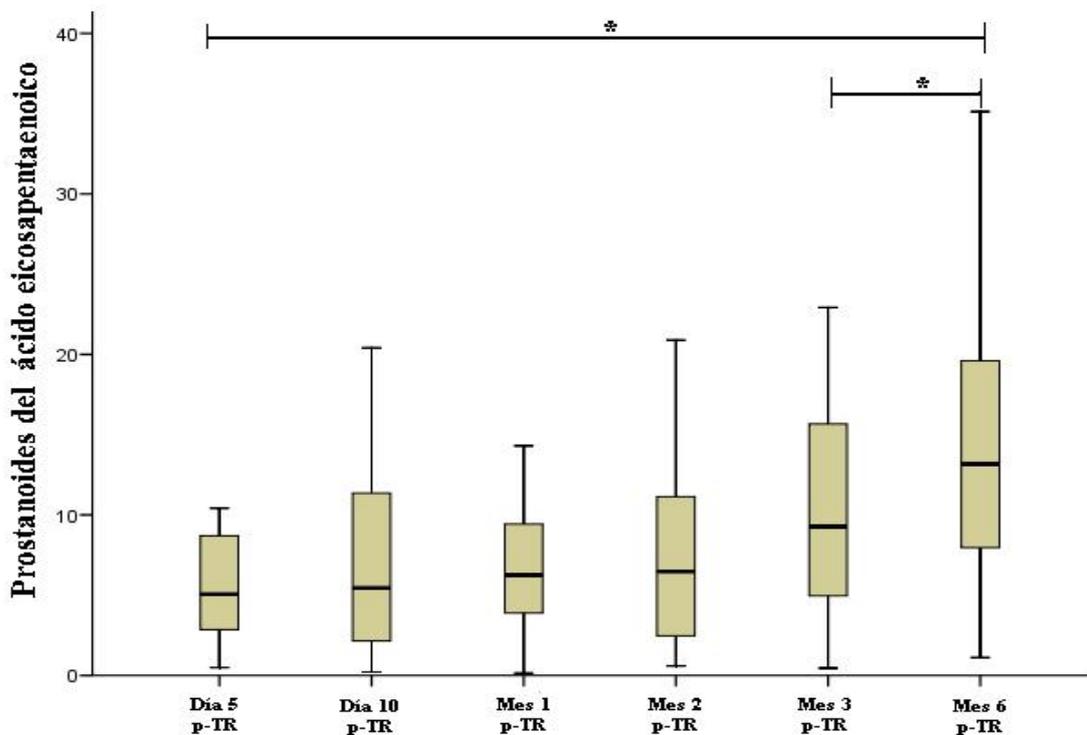


Figura 4.21. Evolución de los prostanooides derivados del ácido eicosapentaenoico. p-TR (Postrasplante renal). *Diferencias significativas entre ambos momentos ($p < 0,05$). Datos expresados en ng mg⁻¹ creatinina en orina.

4.10.2. Correlación de los prostanoideos con la función renal

Se estudió la correlación de la concentración urinaria de los PTs analizados con los parámetros utilizados para evaluar la función renal. En el caso de la UrS y del MDRD se hallaron correlaciones significativas en el sexto mes postrasplante, siendo positivas y negativas respectivamente (**Tabla 4.19**).

Tabla 4.19. Correlaciones resultantes en el sexto mes postrasplante al comparar los prostanoideos con la urea sérica y con el MDRD.

	Nivel de correlación	Urea sérica	MDRD
AA: Vía de síntesis H			
U-44619	r_s	0,541	--
	p	0,007	
AA: Vía de síntesis D			
PGD₂	r_s	0.503	-0,544
	p	0,039	0,023
PGDM	r_s	0,661	-0,422
	p	0,002	0,044
Tetranor-PGDM-lactona	r_s	0,651	-0,631
	p	0,002	0,003
Tetranor-PGDM	r_s	0,725	-0,603
	p	<0,001	0,007
11-β-PGF_{2α}	r_s	0,626	-0,475
	p	<0,001	0,016
Tetranor-PGJM	r_s	0,742	-0,661
	p	<0,001	0,003
AA: Vía de síntesis E			
PGE₂	r_s	0,636	-0,465
	p	<0,001	0,018
Tetranor-PGEM	r_s	0,617	-0,421
	p	0,001	0,040

AA (Ácido araquidónico). (--): resultados no mostrados por falta de relevancia estadística.

Tabla 4.19. (Continuación). Correlaciones resultantes en el sexto mes postrasplante al comparar los prostanoïdes con la urea sérica y con el MDRD.

	Nivel de correlación	Urea sérica	MDRD
AA: Vía de síntesis F			
20-OH-PGF_{2α}	r _s	0,403	--
	p	0,045	--
19(R)-OH-PGF_{2α}	r _s	--	--
	p	--	--
Tetranor-PGFM	r _s	0,562	-0,596
	p	0,036	0,024
AA: Vía de síntesis I			
2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}	r _s	0,591	--
	p	0,045	--
AA: Tromboxano			
11-dehidro-TXB₂	r _s	0,808	-0,721
	p	<0,001	0,002
Prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-γ-linolénico			
PGE₁	r _s	0,558	-0,492
	p	0,003	0,012
PGF_{1α}	r _s	0,707	-0,623
	p	<0,001	0,007

AA (Ácido araquidónico). (--): resultados no mostrados por falta de relevancia estadística.

Al estudiar la relación existente entre la excreción de estos metabolitos y la proteinuria, se obtuvieron correlaciones significativas positivas en todos los momentos del estudio con algunos de los diferentes PTs analizados (**Tabla 4.20**).

Tabla 4.20. Correlaciones resultantes en los diferentes momentos del estudio al comparar los prostanoides y el cociente PtO CrO⁻¹.

		Cinco días p-TR	Diez días p-TR	Un mes p-TR	Dos meses p-TR	Tres meses p-TR	Seis meses p-TR
AA: Vía de síntesis H							
U-44619	<i>r_s</i>	0,456	--	--	--	--	0,514
	<i>p</i>	0,047					0,014
U-44069	<i>r_s</i>	0,644	--	--	--	--	0,562
	<i>p</i>	0,009					0,006
AA: Vía de síntesis D							
PGD₂	<i>r_s</i>	--	--	--	0,889	--	0,683
	<i>p</i>				<0,001		0,007
PGD	<i>r_s</i>	0,709	--	0,529	--	0,601	0,577
	<i>p</i>	0,006		0,016		0,006	0,007
Tetranor-PGDM	<i>r_s</i>	0,575	0,761	0,641	--	--	0,475
	<i>p</i>	0,081	0,028	0,009			0,073
Tetranor-PGDM-lactona	<i>r_s</i>	--	--	--	--	0,627	0,700
	<i>p</i>					0,038	0,001
11-β-PGF_{2α}	<i>r_s</i>	0,675	--	0,535	0,823	0,498	0,669
	<i>p</i>	0,006		0,015	<0,001	0,021	<0,001
Tetranor-PGJM	<i>r_s</i>	--	--	--	--	--	0,757
	<i>p</i>						0,001
AA: Vía de síntesis E							
PGE₂	<i>r_s</i>	0,657	--	0,551	0,839	0,489	0,699
	<i>p</i>	0,007		0,011	<0,001	0,024	<0,001
Tetranor-PGEM	<i>r_s</i>	0,486	--	--	--	0,429	--
	<i>p</i>	0,065				0,050	
Tetranor-PGAM	<i>r_s</i>	0,943	0,857	--	0,838	--	--
	<i>p</i>	0,005	0,013		0,037		
AA: Vía de síntesis F							
20-OH-PGF_{2α}	<i>r_s</i>	--	--	0,505	0,595	--	0,416
	<i>p</i>			0,023	0,024		0,056
19(R)-OH-PGF_{2α}	<i>r_s</i>	--	--	--	0,552	--	0,448
	<i>p</i>				0,039		0,036
Tetranor-PGFM	<i>r_s</i>	--	--	--	--	--	0,636
	<i>p</i>						0,026
AA: Vía de síntesis I							
2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}	<i>r_s</i>	--	--	--	0,901	0,785	--
	<i>p</i>				0,030	0,020	

AA (Ácido araquidónico). (--): resultados no mostrados por falta de relevancia. p-TR (Postrasplante).

Tabla 4.20. (Continuación). Correlaciones resultantes en los diferentes momentos del estudio al comparar los prostanoïdes y el cociente PtO CrO⁻¹.

		Cinco días p-TR	Diez días p-TR	Un mes p-TR	Dos meses p-TR	Tres meses p-TR	Seis meses p-TR
AA: Tromboxano							
11-dehidro-TXB₂	<i>r_s</i>	0,986	--	--	--	--	0,828
	<i>p</i>	0,013					<0,001
Prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-γ-linolénico							
PGE₁	<i>r_s</i>	0,542	0,456	--	0,712	0,520	0,585
	<i>p</i>	0,036	0,111		0,004	0,015	0,004
PGF_{1α}	<i>r_s</i>	0,410	--	--	0,769	0,448	0,600
	<i>p</i>	0,128			0,005	0,070	0,018

AA (Ácido araquidónico). (--): resultados no mostrados por falta de relevancia estadística. p-TR (Postrasplante renal).

4.10.3. Comparación de los prostanoïdes con los diferentes parámetros bioquímicos analizados

Se estudiaron las correlaciones entre los PTs y diferentes parámetros bioquímicos analizados, no hallándose resultados significativos ni con los parámetros de inflamación, ni con los parámetros evaluadoras de función hepática y ni con la glucosa.

4.10.4. Diferencias en la excreción urinaria de prostanoïdes en función de las características del trasplante

- *En función de si tuvieron o no retraso en el inicio de la función*

En este caso, solamente se hallaron diferencias significativas en el sexto mes postrasplante en algunos de los PTs analizados (**Tabla 4.21**), momento en el que todos estos compuestos se detectaron a una mayor concentración en los pacientes con RFI, incluso los que no presentaron diferencias significativas.

Tabla 4.21. Diferencias encontradas en el sexto mes postrasplante en los prostanoideos urinarios según si tuvieron o no retraso en la función inicial los pacientes trasplantados.

Prostanoide ^a	<i>p</i>	No RFI	RFI
AA: Vía de síntesis D			
PGD₂	0,016	3,96 (2,15-5,22)	7,92 (5,39-9,61)
Tetranor-PGDM-lactona	0,069	13,4 (10,1-20,3)	22,3 (13,9-36,2)
11-β-PGF_{2α}	0,085	8,82 (6,52-11,5)	11,6 (8,10-19,7)
Tetranor-PGJM	0,050	129,8 (96,5-195,4)	254,2 (135,9-356,5)
AA: Vía de síntesis E			
PGE₂	0,049	260,3 (211,1-419,0)	363,4 (233,3-465,6)
Tetranor-PGJM	0,050	129,8 (96,5-195,4)	254,2 (135,9-356,5)
AA: Vía de síntesis F			
20-OH-PGF_{2α}	0,046	21,2 (16,0-30,4)	49,7 (32,8-104,1)
Tetranor-PGFM	0,013	10,2 (8,02-57,1)	27,9 (19,4-33,1)
Prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-γ-linolénico			
PGE1	0,026	3,7 (2,7-5,1)	6,7 (4,0-10,0)

^aSolo se representan los prostanoideos en los que se hallaron diferencias relevantes. Concentraciones en ng mg⁻¹. RFI (Retraso en la función inicial del injerto), CrO (Creatinina en orina), AA (Ácido araquidónico).

Igualmente, a pesar de no presentar diferencias significativas, las concentraciones de los PTs fueron en todos los casos mayores en los pacientes con RFI en los meses 1, 2 y 3 postrasplante. Por el contrario, en los dos primeros momentos del estudio, días 5 y 10

postrasplante, las medianas de las concentraciones de los PTs no siguieron un patrón común, siendo en algunos casos mayores y en otros menores.

- Según el tipo de muerte del donante

Se separaron los pacientes trasplantados en dos grupos, por un lado los que recibieron un injerto de un donante fallecido por TCE, y por otro los de anoxia cerebral o ACV, observándose entre ambos grupos un comportamiento similar al encontrado con los IsoPs, en el que las medianas de la concentración urinaria de los PTs fueron más altas en el grupo de TCE en los seis momentos del estudio. Sin embargo, a pesar de esta mayor concentración hallada en el grupo de TCE, en los tres primeros meses postrasplante solo se detectaron diferencias significativas aisladas, siendo el sexto mes postrasplante el momento donde las diferencias fueron mayores (**Tabla 4.22**).

Tabla 4.22. Diferencias encontradas en el 6° mes postrasplante en los prostanoídes urinarios según si el donante había fallecido por TCE o por ACV/anoxia cerebral.

Prostanoide ^a	<i>p</i>	TCE (ng mg ⁻¹ CrO)	ACV/AC (ng mg ⁻¹ CrO)
Ácido araquidónico: Vía de síntesis D			
PGD₂	0,001	9,53 (7,74-12,3)	4,48 (2,47-5,93)
PGDM	0,012	15,4 (7,75-20,4)	6,68 (5,22-9,38)
Tetranor-PGDM-lactona	0,076	32,6 (13,9-44,2)	15,1 (10,2-22,0)
11-β-PGF_{2α}	0,024	18,9 (9,02-22,5)	9,58 (5,88-11,5)
2,3-dinor-11-β-PGF_{2α}	0,015	175,1 (81,6-214,2)	74,2 (67,6-105,4)
Tetranor-PGJM	0,069	254,2 (161,1-302,4)	129,8 (88,6-217,1)
Ácido araquidónico: Vía de síntesis E			
PGE₂	0,020	22,0 (11,1-29,8)	11,2 (7,33-14,9)
Tetranor-PGEM	0,046	15,8 (9,96-43,8)	10,1 (6,15-13,3)
Ácido araquidónico: Vía de síntesis F			
Tetranor-PGFM	0,014	65,8 (37,8-114,1)	22,1 (16,2-31,3)
20-OH-PGF_{2α}	0,003	902,8 (738-1565)	491,3 (389,9-743,1)
15-keto-PGF_{2α}	0,009	7,08 (5,61-8,22)	1,81 (1,24-2,80)
Ácido araquidónico: Tromboxanos			
11-dehidro-TXB₂	0,059	26,5 (10,1-38,9)	8,85 (7,66-10,3)
Prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-γ-linolénico			
PGE₁	0,047	9,59 (4,10-10,1)	4,59 (2,63-6,06)
PGF_{1α}	0,042	14,3 (10,2-23,6)	8,09 (6,48-14,5)

^aSolo se representan los isoprostanos en los que se hallaron diferencias relevantes. Concentraciones en ng mg⁻¹. TCE (Traumatismo craneoencefálico), ACV (Accidente cerebrovascular), AC (Anoxia cerebral), CrO (Creatinina en orina).

- Según la edad del donante

Se estudió la correlación entre los niveles urinarios de los prostanoides y la edad del donante, encontrándose varios resultados significativos en el sexto mes postrasplante (**Tabla 4.23**). En el resto de momentos del estudio también se halló alguna correlación significativa aislada, siendo positiva en todos los casos.

- En función del tiempo de isquemia fría del órgano trasplantado

Se estudió la influencia del tiempo de isquemia fría del órgano trasplantado en la excreción urinaria de PTs tanto al inicio como al final del estudio, obteniéndose correlaciones positivas significativas en ambos momentos, pero mayoritariamente en el quinto día postrasplante (**Tabla 4.24**).

Tabla 4.23. Correlaciones resultantes en el sexto mes postrasplante al comparar la edad del donante y los prostanoideos.

Prostanoide ^a	Edad del donante	
	r _s	P
AA: Vía de síntesis H		
U-446919	0,563	0,003
U-44069	0,551	0,004
AA: Vía de síntesis D		
PGD ₂	0,451	0,068
PGDM	0,549	0,006
Tetranor-PGDM	0,456	0,056
Tetranor-PGDM-lactona	0,521	0,022
11-β-PGF _{2α}	0,579	0,002
Tetranor-PGJM	0,674	0,003
AA: Vía de síntesis E		
PGE ₂	0,579	0,002
Tetranor-PGEM	0,426	0,037
Tetranor-PGAM	0,544	0,050
AA: Vía de síntesis F		
Tetranor-PGFM	0,392	0,164
20-OH-PGF _{2α}	0,361	0,075
AA: Vía de síntesis I		
2,3-dinor-6-keto-PGF _{1α}	0,554	0,061
AA: Tromboxanos		
11-dehidro-TXB ₂	0,512	0,042
Prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-γ-linolénico		
PGE ₁	0,480	0,015

^aSolo se representan los prostanoideos en los que se hallaron resultados relevantes en alguno de los dos momentos estudiados. AA (Ácido araquidónico).

Tabla 4.24. Correlaciones resultantes al comparar el tiempo de isquemia fría y los prostanoideos al inicio y al final del estudio.

Prostanoide ^a	Día 5 postrasplante		Sexto mes postrasplante	
	r_s	p	r_s	p
AA: Vía de síntesis H				
U-446919	0,419	0,018	0,171	0,400
U-44069	0,405	0,023	0,129	0,536
AA: Vía de síntesis D				
PGD ₂	0,518	0,023	0,531	0,028
PGDM	0,405	0,040	0,221	0,310
11- β -PGF _{2α}	0,421	0,018	0,332	0,103
2,3-dinor-11- β -PGF _{2α}	0,283	0,121	0,474	0,016
AA: Vía de síntesis E				
PGE ₂	0,399	0,026	0,357	0,079
Tetranor-PGAM	0,582	0,036	0,074	0,808
AA: Vía de síntesis F				
15-keto-PGF _{2α}	0,490	0,006	0,422	0,102
AA: Tromboxanos				
11-dehidro-TXB ₂	0,636	0,026	0,232	0,385
Prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-γ-linolénico				
PGE ₁	0,358	0,050	0,333	0,100
PGF ₁	0,448	0,024	0,252	0,327

^aSolo se representan los prostanoideos en los que se hallaron resultados relevantes en alguno de los dos momentos estudiados. AA (Ácido araquidónico).

4.10.5. Prostanoides en los pacientes con rechazo

Se estudió la diferencia entre los niveles de PTs urinarios en los pacientes que presentaron un rechazo confirmado por biopsia y los de los trasplantados que no presentaron rechazo en los diferentes momentos del estudio, observando que los primeros no seguían un patrón común, siendo en unos casos mayores y en otros menores. La comparación entre ambos grupos no se pudo realizar mediante el test no paramétrico *U de Mann-Whitney* debido al bajo número de rechazos encontrados en el estudio.

5. DISCUSIÓN

5.1. Trasplante renal. Estudio descriptivo de la población estudiada y de los trasplantes realizados

El estilo de vida actual de las sociedades occidentales está causando un aumento en la incidencia de trastornos metabólicos que desencadenan enfermedades crónicas a largo plazo como la enfermedad renal crónica (105). El mejor tratamiento para esta patología es el trasplante de riñón, ya que mejora la calidad de vida del paciente y disminuye las numerosas complicaciones asociadas a la diálisis (12).

El adecuado seguimiento de la función del injerto es clave para optimizar este tipo de terapia y además permite adaptar la pauta del tratamiento de forma individualizada según las características de cada paciente, intentando así evitar la pérdida del órgano trasplantado.

El rechazo del injerto es una de las complicaciones más graves en este tipo de pacientes y supone un notablemente empeoramiento de su pronóstico a largo plazo, causando incluso en ocasiones la pérdida completa del mismo. Gracias a los nuevos inmunosupresores, este tipo de eventos, a pesar de ser cada día una complicación menos frecuente, sigue siendo un hecho relativamente frecuente entre los receptores de un TR (114).

5.1.1. Características de la población estudiada

El TR, a pesar de ser una intervención compleja, se ha convertido en un procedimiento rutinario y habitual en los grandes hospitales de España gracias a la amplia experiencia adquirida por los equipos de trasplante de los mismos, que solo se ve limitado por la baja disponibilidad de riñones aptos para el trasplante en relación con el

aumento de la demanda de pacientes que lo necesitan, desequilibrio que aumenta año tras año (15).

Dada esta limitación, el número de pacientes que se someten a un TR no es tan alto como el de otras patologías más frecuentes, hecho que nos hubiese permitido aumentar el número de participantes incluidos en este estudio.

Coincidiendo con los datos observados en la bibliografía consultada, la frecuencia de hombres trasplantados renales en este estudio es más alta que la de mujeres (65,8 % de hombres frente a 34,2 % de mujeres), hecho lógico debido a la mayor frecuencia de pacientes de sexo masculino que padecen ERC (115,116).

Con respecto a la edad, según los datos aportados por el informe de la Organización Nacional de Trasplante (13), el grupo de pacientes trasplantados del estudio fue relativamente más joven ($53,3 \pm 15,3$ años) que los pacientes trasplantados en España durante el año 2014 ($64,2 \pm 15,1$ años). Esto se debe probablemente, a la intención de los equipos de trasplante de equiparar en la medida de lo posible la edad del donante y la del receptor con el objetivo de igualar al máximo la masa nefronal (117), y en este caso debido a la mayor edad encontrada en los donantes hizo que la edad de los receptores aumentase.

En relación al número de rechazos confirmados, se observó que fue ligeramente menor que la media descrita en otros estudios recientes como el de Rosique y colaboradores (7,3% frente a 15-20%) (117), debido probablemente a que no todos los casos de rechazo se confirmaron con biopsia, ya que en muchas ocasiones se consigue controlar el rechazo con cambios en la terapia inmunosupresora.

El 60,9 % de los pacientes presentaba obesidad, sabiéndose hoy día que este tipo de pacientes tienen una incidencia más alta de ERC que la población con normopeso, con una aumentada incidencia de glomerulomegalia y glomeruloesclerosis focal y segmentaria (118). Varios son los mecanismos propuestos para este aumento de frecuencia de ERC en este tipo de pacientes, incluyendo entre ellos un estado de retención hidrosalina, los efectos directos o indirectos de la hiperinsulinemia/resistencia insulínica y la lipotoxicidad, así como el aumento de la carga de trabajo en los riñones debido al incremento en el volumen de distribución que presentan estos pacientes (119).

Entre los pacientes del estudio, un porcentaje considerable era diabético o intolerante a la glucosa, algo que concuerda con los datos aportados por los estudios previos como el de Kurokawa y colaboradores que sitúan a la diabetes como la principal causa de ERC en los países desarrollados (4). Además, el 14,6 % de los pacientes de este estudio desarrolló intolerancia a la glucosa tras el trasplante, debido probablemente al efecto diabetógeno de los inmunosupresores empleados en la terapia postrasplante (120).

5.1.2. Características de los trasplantes realizados

La bibliografía reporta que ciertas características del trasplante influyen en su evolución y resultados a corto plazo, como son la edad del donante, la causa de su muerte, el tiempo de isquemia fría y si presentan o no retraso en la función inicial tras el trasplante (117).

La edad media de los donantes se ha visto incrementada en los últimos años debido al envejecimiento poblacional y a la baja oferta de órganos disponibles con respecto a la cada vez mayor demanda, que hace que se utilicen órganos cada vez más añosos para

los trasplantes (15). En este estudio, la edad media de los donantes fue de $52,75 \pm 13,7$ años, ligeramente inferior a la presentada por la ONT en 2014 de $59,6 \pm 16,7$ años (121), debido probablemente al limitado número de pacientes del mismo.

Con respecto al tiempo de isquemia fría del órgano antes del trasplante, se sabe que a mayor tiempo de isquemia, peor evolución y peor supervivencia del injerto (122). En este estudio, el tiempo de isquemia ($9,66 \pm 4,5$ horas) fue menor que en otro estudio reciente ($17,6 \pm 7,1$ horas) realizado en el mismo hospital Rosique y colaboradores (117), gracias a la constante insistencia de los nefrólogos del hospital Virgen de la Arrixaca para que este tiempo de isquemia se reduzca al mínimo en cada intervención.

Igualmente, algunos estudios reflejan diferencias en la evolución del órgano trasplantado según el tipo de muerte del donante, refiriendo estas diferencias a la mayor edad de los fallecidos por ACV y a las peores condiciones fisiológicas del órgano en este tipo de donantes por los cambios hemodinámicos que sufre hasta que se decide extirparlo (117). En el presente estudio, la mayoría de los donantes falleció por ACV, siendo este grupo menos añoso que el de TCE ($53,0 \pm 18,6$ años en ACV frente a $62,1 \pm 15,2$ años en TCE). La menor edad encontrada en el grupo de ACV es un hallazgo fuera de lo normal, debido probablemente a una asociación casual por el reducido número de pacientes incluidos en el estudio, que tal y como se expone el **apartado 5.1.1** se debe al limitado número de trasplantes que se pudieron incluir en el mismo.

Otra de las características que influye en la evolución del trasplante es el retraso en la función inicial, que se define como la necesidad del empleo de diálisis antes de los 7 días postrasplante (123). Ésta es una complicación frecuente del período postrasplante inmediato que afecta principalmente a los trasplantes con donante cadáver, y que se

relaciona con una mayor edad del donante, un prolongado tiempo de isquemia fría y con los donantes fallecidos por ACV (117). A largo plazo los pacientes que han presentado RFI tienen mayor riesgo de nefropatía crónica, habiéndose señalado en estudios previos como un factor de riesgo independiente en la supervivencia del injerto (124). En este estudio, a pesar de la baja edad media de los donantes y de un tiempo de isquemia fría moderado, la incidencia de RFI fue elevada (46,5 %) con respecto a lo descrito por Marrero y colaboradores (30-40 %) (18), o si lo comparamos con la tasa de RFI del estudio mencionado anteriormente (26,9 %) realizado en este mismo hospital (117).

5.2. Evolución de los diferentes marcadores analizados a lo largo del estudio

5.2.1. Evolución del estado general de los pacientes según los parámetros bioquímicos analizados

Tras el trasplante renal la mejora del paciente suele ser a corto-medio plazo y de forma progresiva según se restablece la función renal. En este estudio, y tal y como se expone en el **apartado 4.3.2**, se observó como la función renal mejoró notablemente tras el trasplante, aumentando el FG, y disminuyendo la UrS y la proteinuria a lo largo del estudio. Igualmente mejoró el estado nutricional de los pacientes, con un claro aumento de la AlbS y del HTO, así como un aumento no significativo de CT. El aumento de AlbS se asocia a la disminución de su pérdida por vía renal y a la mejora del estado nutricional del paciente. En el caso del HTO, disminuido notablemente al inicio como consecuencia de una anemia multifactorial, el aumento se debe al progresivo incremento de síntesis de eritropoyetina que tiene lugar en el injerto y que es paralelo a la mejora de su función, además de a la repleción vitamínica y férrica que se da tras el trasplante con la mejora del estado nutricional (125).

Esta mejoría en la función renal, que suprime la necesidad de los pacientes de acudir a diálisis, les permite mejorar su calidad de vida y con ello su condición física y nutricional, llegando estos a llevar en la mayoría de los casos una vida casi como la de un sujeto sano, hechos que refuerzan día tras día la utilidad este tipo de terapia (12).

En la fase postrasplante también se observó una mejora del estado inflamatorio, mediante la disminución de los parámetros utilizados para evaluarlo. Este estado inflamatorio, consecuencia del rechazo desencadenado por el sistema inmune del receptor contra el injerto, disminuye a medida que pasan los días tras el trasplante debido al mecanismo de tolerancia que desarrolla este mismo sistema (126). Para moderarlo y evitar la pérdida del órgano trasplantado, se utilizan potentes inmunosupresores que disminuyen la respuesta inmunitaria, reduciendo posteriormente tanto la dosis como los fármacos empleados según se va implantando el mecanismo de tolerancia (127).

A nivel hepático no se observó ninguna variación a lo largo del estudio, pero sí se halló un aumento no significativo ($p > 0,05$) en la glucemia y en el número de pacientes con criterio de intolerancia a la glucosa (112), consecuencia del efecto diabetógeno de los inmunosupresores empleados en la terapia postrasplante (120).

5.2.2. Evolución de los marcadores de estrés oxidativo en los pacientes trasplantados renales en los seis meses postrasplante y su correlación con la función renal

El estrés oxidativo es un estado en el que se genera un desequilibrio entre la producción de RL y la capacidad de defensa frente a los mismos del sistema

antioxidante del organismo. Este sistema tiene una capacidad limitada de neutralización de RL que cuando se agota se produce un daño celular que afecta a las proteínas, los lípidos y el ADN, llegando a producir la apoptosis e incluso la necrosis de la célula (42).

Son diversas las patologías relacionadas con dicho mecanismo, entre ellas la patología renal, donde se ha visto un aumento de EO en pacientes con ERC (47), en sujetos sometidos a diálisis (48), en el retraso del inicio de la función tras el trasplante renal (49) y en el rechazo del injerto tras un trasplante (50).

En este estudio, se analizaron un total de 26 metabolitos de lipoperoxidación que se agruparon en tres grupos: IsoPs, NeuroPs y F₂-dihomo-IsoPs. Además dentro de cada grupo se clasificaron según el AGP del que proceden y según su vía de síntesis. Al observar los resultados expuestos a lo largo del **apartado 4.4** sobre la evolución de estos metabolitos se puede observar que, de forma generalizada, se produce una disminución del EO tal y como describen Cerrillos y colaboradores en 2016 (128). De forma paralela a la disminución del EO se observó una mejora en la función renal con aumento del MDRD y un descenso de la proteinuria, motivo por el cual se estudió la correlación de estos metabolitos lipídicos con los parámetros bioquímicos empleados para analizar la función del injerto en la etapa postrasplante.

A raíz de ello se observó una correlación inversa significativa ($p < 0,05$) entre el MDRD y algunos de los IsoPs analizados en el sexto mes postrasplante, resultado que no se halló ni en los NeuroPs ni en los F₂-dihomo-IsoPs a lo largo del estudio.

Con la UrS se encontraron correlaciones significativas positivas ($p < 0,05$) en el sexto mes postrasplante con diferentes IsoPs, con el 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP y con los dos

F₂-dihomo-IsoP que disminuían según avanzaba la fase postrasplante (*ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP* y *ent-7(S)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP*).

En el caso de la proteinuria, analizada mediante el cociente PtO CrO⁻¹, según consenso de las sociedades de nefrología (1), se obtuvieron correlaciones significativas positivas ($p < 0,05$) tanto con diferentes IsoPs, como con el 4-*epi-4-F_{3t}-NeuroP* a partir del primer mes postrasplante. Con los dos F₂-dihomo-IsoPs descritos en el párrafo anterior, también se encontraron correlaciones significativas positivas ($p < 0,05$), pero en este caso solo en alguno de los momentos postrasplante estudiados. Todos los resultados significativos encontrados en dichas correlaciones fueron positivos, reflejando cómo disminuyó el EO en los pacientes al disminuir la proteinuria (resultados expuestos en el **apartado 4.5**). En los dos primeros momentos del estudio, días 5 y 10 postrasplante, no se observaron resultados significativos, probablemente debido a la gran variabilidad que hay en la función renal en estos días, motivo por el cual la proteinuria no se empieza a valorar en pacientes trasplantados hasta las 4 semanas de la intervención. Además, se observó una correlación inversa entre la proteinuria y el FGe en los meses 3 y 6 postrasplante, algo ya descrito anteriormente en un trabajo realizado por Ruggenti y colaboradores, quienes informaron que al disminuir la carga de proteínas urinarias disminuye el EO en la nefrona y mejora su función, aumentando así el FGe y disminuyendo la UrS (129).

Tal y como ya expusieron Ruiz y colaboradores, se ha demostrado que la reducción de la proteinuria presenta un claro efecto beneficioso en la función renal y en la supervivencia de los pacientes con ERC, pero desafortunadamente aún no se ha podido demostrar lo mismo en pacientes trasplantados renales (29). La aparición de proteinuria tras el trasplante es un factor de mal pronóstico, pudiendo ser el aumento del EO la

causa del mismo, aunque el mecanismo de acción no está todavía del todo esclarecido (130,131).

En el mismo sentido, Bruzzi y colaboradores asociaron la presencia de proteínas en orina con un aumento del consumo de oxígeno de las células de la nefrona, debido al proceso de reabsorción de albúmina urinaria que se da en la misma (132,133). Este proceso, mediado por las proteínas megalina y cubilina que actúan como receptores de captación, se da por endocitosis en el borde en cepillo de la cara apical del túbulo proximal (134–136). Una vez unida la albúmina a estas proteínas, los complejos receptor-albúmina activan las vías de señalización de la proteína quinasa C, que conducen a la generación de EROs por la acción de la NAD(P)H oxidasa (137–139). Así, cuanto mayor sea la proteinuria, mayor será la concentración de EROs en las células tubulares proximales, moléculas que se han descrito como algunos de los factores más tóxicos que inducen directamente la lesión intersticial de los túbulos renales (47).

Por otra parte, en este estudio observamos cómo tres de los metabolitos analizados aumentaron de forma no significativa entre el inicio y el final del estudio, el 8-iso-PGF_{1 α} , el 2,3-dinor-15-*epi*-15-F_{2t} y el 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP. A pesar de su tendencia a aumentar sin alcanzar el nivel de significado estadístico establecido ($p < 0,05$) y de no correlacionar con ninguno de los parámetros utilizados para evaluar la función renal, habría que estudiarlos a largo plazo para observar su evolución, ya que la función de estos compuestos es aún un campo desconocido y su aumento podría reflejar algún mecanismo patogénico de rechazo crónico.

5.2.3. Evolución de la excreción de prostanoides en los pacientes trasplantados renales en los seis meses postrasplante y su correlación con la función renal

Los PTs son un grupo de sustancias metabólicamente activas que actúan en diferentes localizaciones celulares y que pertenecen a la familia de los eicosanoides. En este estudio se analizaron 23 PTs procedentes de diferentes AGP (AA, GLA y EPA) y generados por diferentes vías de síntesis.

Entre los derivados del AA estudiados, encontramos cinco familias de PGs y una de TXs. En la primera de ellas englobamos dos análogos estables de la PGH_2 , el U-44069 y el U-46619 (140). Ambos desarrollaron un patrón similar a lo largo del estudio con incrementos y descensos no significativos entre los diferentes momentos, y presentaron una concentración final ligeramente inferior a la inicial. Se ha visto que tanto la PGH_2 como sus análogos tienen un efecto vasoconstrictor en las arteriolas renales que disminuiría el flujo sanguíneo renal con una consecuente disminución del FG (141–143). Por tanto, esa ligera disminución podría influir de forma positiva en la función renal tal y como se observó a lo largo del estudio.

Otro grupo derivado del AA, el de las PGs de la vía D generadas mediante la acción de la ciclooxigenasa sobre este AGP, actúan sobre los receptores de PTs tipo D, modulando la función vascular, plaquetaria y leucocitaria *in vitro* (144). Por otra parte, participan tanto en el desarrollo de la inflamación como en su resolución (144). Sobre la función renal su influencia no está del todo clara, habiendo observado Zaher y colaboradores en 2012 que la administración de PGD_2 en mamíferos (perros) aumenta el flujo arterial y el aclaramiento de creatinina (145).

En este estudio la PGD_2 y sus metabolitos oscilaron entre los diferentes momentos. Dicha PG y cuatro de los metabolitos presentaron una ligera disminución entre el inicio

y el final del estudio, pudiendo conllevar con ello una modulación del proceso inflamatorio postrasplante. Los dos restantes el tetranor-PGJM, derivado del tetranor-PGDM, y el 2,3-dinor-11- β -PGF_{2 α} aumentaron progresivamente, haciéndolo el segundo de forma significativa. Este aumento podría estar relacionado con la mejora observada en la función renal, que concuerda con los resultados descritos por Zaher y colaboradores (145).

Otro grupo de PGs derivadas del AA son la PGE₂ y sus metabolitos. Dentro de este grupo se detectaron todas las PGs estudiadas, excepto la 20-OH-PGE₂. Está documentado que la PGE₂ participa tanto en los mecanismos que desencadenan la inflamación como en su resolución (142). A nivel renal, un reciente estudio *in vivo*, la ha relacionado con numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, en los cuales participa con diferentes funciones según con cuál de los 4 subtipos de receptor tipo E interaccione, algo que dependerá de las condiciones fisiológicas del organismo en ese momento (146). Uno de los efectos en los que interviene es mediante su acción moduladora de la vasopresina, controlando así la reabsorción de agua en las células del conducto colector (101,147). Esta PG compite a su vez con la PGE₁ en su unión a los receptores tipo E, hecho que modulará sus efectos pero que a día de hoy no se conoce con exactitud su mecanismo de acción (148). Los pequeños cambios encontrados en la evolución de sus concentraciones y los diferentes patrones encontrados, acompañado de la variabilidad de funciones que presentan según interaccionen con un receptor u otro (146), hace que estos compuestos no aporten una información concluyente al estudio.

Con respecto a los metabolitos de la PGF_{2 α} , se observa que el 15-keto-PGF_{2 α} , su principal metabolito, disminuyó significativamente entre el inicio y el final del estudio. Este descenso en su concentración urinaria podría tener relación con el efecto conocido como mediadores de la inflamación que presentan las PGs de esta serie, papel que

ejercen tanto en procesos agudos como en crónicos (142), ya que se vio que disminuía de forma paralela a la mejora del estado inflamatorio de los pacientes. Además, este compuesto se ha visto que presenta una acción moduladora en el riñón de mamíferos (ratones) sobre el transporte salino, acción que realiza mediante su interacción con los receptores FP del túbulo contorneado distal (149). Su actividad sobre la función renal en humanos no está del todo clara y, a pesar de que en nuestro estudio este compuesto disminuye según mejora el filtrado glomerular, se necesitarían más estudios para poder sacar conclusiones al respecto. El resto de metabolitos estudiados derivados de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ no aportaron información adicional, ya que ni cumplieron un patrón constante ni presentaron diferencias significativas entre el inicio y el final del estudio.

En otro de los grupos de PGs, las derivadas de la PGI_2 , solo se detectó a partir del primer mes postrasplante el metabolito 2,3-dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, compuesto que presentó una tendencia significativa positiva hasta el final del estudio. La PGI_2 , de la que procede este metabolito, es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria, adhesión leucocitaria y proliferación de las células del músculo liso vascular (150), que además participa en el desarrollo de edema y dolor en la inflamación (142). Por otra parte, es uno de los principales prostanoides en la regulación de la homeostasis vascular al interaccionar con receptores específicos IP (142) situados en riñón, hígado, pulmón, plaquetas y aorta (151). Fallos en su vía de síntesis se han relacionado con la patología renal, debido a la pérdida de su efecto vasodilatador y regulador de la fibrosis y apoptosis en este órgano (152). En el caso de sus metabolitos, 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ y 2,3-dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (principal metabolito urinario de PGI_2 generado a partir de la β -oxidación de 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$), a día de hoy, sus funciones no están del todo esclarecidas (153). No obstante, el incremento encontrado en los niveles del 2,3-dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$

podría ser consecuencia de un aumento de PGI_2 que vendría acompañado de una mejora en la función renal, tal y como se observó en el presente estudio.

Dentro del grupo de PTs derivados del AA, también se analizó un metabolito derivado del TXB_2 , el 11-dehidro- TXB_2 . Al observar su evolución, se pudo ver que a pesar de no encontrar diferencias significativas, el 11-dehidro- TXB_2 disminuía progresivamente, encontrando un mínimo en el momento de mayor FGe. En este tipo de compuestos, estudios previos, como el que realizaron Benigni y colaboradores, han visto una clara asociación entre su concentración y la disminución del FG (154), debido entre otros factores al potente efecto vasoconstrictor que ejercen sobre la arteriola renal aferente (155).

Por otra parte, se analizaron PGs de la serie 1, generadas por las enzimas ciclooxigenasa tipo 1 y tipo 2 a partir del GLA. Este grupo de PGs presentan un notable efecto antiinflamatorio y anticancerígeno (148), habiéndose observado en el caso de la PGE_1 una acción antiinflamatoria y moduladora de la reactividad vascular, con un efecto antiagregante más potente que la PGE_2 (156). Al observar su evolución se vio que tanto la $\text{PGF}_{1\alpha}$ como la PGE_1 disminuyeron a lo largo del estudio pero sin diferencias significativas entre el inicio y el final del mismo, ni al estudiarlas de forma individual ni agrupadas por familia. Este descenso en su concentración podría deberse, además de a la disminución del estado inflamatorio, a algún mecanismo de retroinhibición de su síntesis como el que expresaron en 1980 Horribon y colaboradores, en el cual explicaban como la producción de este grupo de PGs se encuentra equilibrado con la de PGs de la serie 2 (157). No obstante, para poder sacar conclusiones sobre la evolución de este grupo de PGs serían necesarios más estudios al respecto, ya que el número de trabajos relacionados con dicha temática es muy limitado.

El último grupo de PTs analizados en el estudio son los de la serie 3, sintetizados principalmente por la ciclooxigenasa-2 a partir del ácido EPA (158). En este caso se monitorizó la 17-*trans*-PGF_{3α}, metabolito con doble enlace de la PGF_{3α} (159). Este compuesto aumentó progresivamente ($p < 0,05$) a lo largo del estudio con diferencias significativas entre el inicio y el final del mismo. Dicha evolución podría aportar nuevos conocimientos sobre el papel de dicho metabolito en la patología renal, pero debido a que hasta la fecha de hoy éste es el primer y único estudio que ha obtenido resultados significativos, serían necesarios más ensayos en humanos para poder sacar conclusiones sobre su actividad biológica (159,160). Se cree que este grupo de compuestos presentan propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas derivadas del ácido graso del que proceden, no obstante, las funciones específicas de la PGF_{3α} no han sido aún corroboradas (62).

Tras analizar el conjunto de resultados del **apartado 4.10.1** sobre la evolución de los PTs analizados en la fase postrasplante, se observó que, a pesar de no encontrar diferencias significativas entre el inicio y el final del estudio, la mayoría de las PGs disminuían entre ambos momentos. Varias se mantuvieron y otras aumentaron, ofreciendo en su conjunto diferentes patrones de comportamiento asociados probablemente a la diversidad de funciones que desempeñan estos compuestos (algunas de ellas antagónicas entre sí) y a su amplia variabilidad según el estado fisiológico del individuo (89).

De igual forma que se hizo con los marcadores de EO, se estudió su relación con los marcadores de función renal utilizados en el estudio, correlacionándolos con el MDRD, la UrS y el cociente PtO CrO⁻¹ (resultados mostrados en el **apartado 4.10.2**).

La mayoría de los PTs correlacionaron de forma positiva en el sexto mes postrasplante con la UrS, y de forma inversa con el MDRD. Además se observó una correlación directa entre el aumento del cociente PtO CrO^{-1} y la excreción urinaria de PTs en los diferentes momentos del estudio.

La aparición de proteinuria en los pacientes trasplantados renales es un factor de mal pronóstico, habiéndose demostrado en pacientes con ERC que su reducción presenta un claro efecto beneficioso en la función renal y en la supervivencia de los pacientes (29). Uno de los principales mecanismos patogénicos propuestos por los que la proteinuria empeora la función renal es el mecanismo inflamatorio que se desencadena en el epitelio tubular por la presencia de la albúmina (130,131).

Varios son los mecanismos propuestos para el desarrollo de la inflamación, como son el aumento de los factores de transcripción de fibrosis e inflamación (131), la activación del complemento en el túbulo proximal (162) o la apoptosis celular en el túbulo contorneado distal (163). Algunos autores defienden que estos efectos no son por la albúmina en sí, si no por los compuestos asociados a ella, como los ácidos grasos (164), que promueven el mecanismo inflamatorio y el aumento del EO (165). Este aumento de la inflamación vendría acompañado de un aumento en la secreción de PGs inflamatorias que podría explicar la correlación con la proteinuria durante el estudio.

Tanto la inflamación como el EO suponen una influencia negativa sobre las células del injerto, aminorando así su función con la consecuente disminución del MDRD y el aumento de la UrS, algo que explicaría las correlaciones negativas y positivas, respectivamente, encontradas en el sexto mes postrasplante con los PTs. Probablemente en el resto de momentos del estudio no se hallaron correlaciones con estos dos

parámetros debido a la alta variabilidad que presentan este tipo de pacientes tras el trasplante, la cual disminuyó según avanzaba la etapa postrasplante.

5.3. Diferencias entre los pacientes trasplantados y el grupo control

5.3.1. Estado general

En el grupo de pacientes trasplantados, la función renal, a pesar de mejorar tras la intervención, fue significativamente peor durante todo el estudio que la de los sujetos sanos, con una menor tasa de FGe y una mayor proteinuria. Este hallazgo es lógico, ya que a pesar de conseguirse una función renal estable en los pacientes trasplantados, nunca podrá llegar a ser óptima como lo es en los individuos sanos, debido a que los primeros son monorrenos y su injerto sufre un continuo ataque por su propio sistema inmune como mecanismo de rechazo (166).

A nivel nutricional, se comprobó una clara mejoría después del trasplante, encontrando diferencias significativas entre los sanos y los trasplantados al inicio pero no al final del estudio, tanto en la AlbS ($p = 0,006$), como en el CT ($p < 0,01$). Esto se debe a la mejora en la calidad de vida que experimentan los pacientes que hace que mejoren su condición física y nutricional llegando a ser casi como la de una persona sana (12). En el caso de la AlbS también contribuye a esta mejora la notable disminución de su pérdida por vía urinaria. En el HTO, a pesar de su progresivo aumento, se observaron diferencias con los sujetos sanos tanto al inicio ($p < 0,001$) como al final ($p < 0,01$) del estudio, ya que aunque aumenta la síntesis de eritropoyetina por el injerto según mejora su función (125), ésta no llega a ser óptima tal y como describimos en el párrafo anterior.

Con respecto al estado inflamatorio, se observó que al principio del estudio había grandes diferencias entre ambos grupos ($p < 0,01$), sin embargo no se hallaron diferencias al final del mismo. Esto se podría explicar por el descenso inflamatorio que se da tras la instauración del mecanismo de tolerancia inmunitaria, además de la disminución de las complicaciones según avanza la etapa postrasplante (126).

En cuanto a la mejor función hepática encontrada en los pacientes trasplantados encontramos discrepancias con respecto a lo descrito en la bibliografía (167), donde se establece que la patología hepática representa la cuarta causa de muerte a largo plazo en paciente trasplantados. Este hecho se ha considerado como algo aislado y fortuito, ya que en ningún estudio encontramos resultados similares. Además, no tiene ninguna implicación sobre el resto de resultados del estudio, asociándose por tanto al limitado número de pacientes del mismo.

Los niveles de glucemia presentaron diferencias entre ambos grupos al final del estudio ($p = 0,008$), pero no al inicio. Esto se debe probablemente al aumento no significativo observado en los niveles de Glu en los pacientes trasplantados, consecuencia del tratamiento inmunosupresor que tienen pautado y que se ha demostrado que afecta al metabolismo glucémico (120).

5.3.2. Estrés oxidativo

Debido a la novedad de los NeuroPs y F₂-dihomo-IsoPs, y a la escasez de referencias bibliográficas que los incluyen, se estudiaron estos metabolitos en los sujetos sanos con el objetivo de analizar la diferencia entre su concentración urinaria en este grupo y en los pacientes trasplantados de riñón, mostrándose los resultados en el

apartado 4.9. Por el contrario, debido a la mayor evidencia científica existente en torno a los IsoPs (77) y los PTs (103,168), estos dos grupos de metabolitos solo se analizaron en los sujetos trasplantados.

Los niveles de NeuroPs en los pacientes sanos permanecieron indetectables durante todo el estudio, exceptuando el 4-F_{3t}-NeuroP que se detectó en la mayoría de los sujetos de este grupo. Por el contrario, estos metabolitos se detectaron en los trasplantados en todo momento, reflejando esto el aumento de EO que presentan estos pacientes (77).

Los F₂-dihomo-IsoPs se detectaron en ambos grupos, presentando concentraciones significativamente mayores en los sujetos sanos respecto a los trasplantados tanto al inicio como al final del estudio en el 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo-IsoP, 17-F_{2t}-dihomo-IsoP y *ent*-7(*S*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP ($p < 0,05$ para todos los casos). Sin embargo el *ent*-7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP disminuyó a lo largo de la etapa postrasplante, presentando niveles significativamente mayores en los pacientes trasplantados al inicio del estudio ($p < 0,05$), y que posteriormente se igualaron con los valores obtenidos para los individuos sanos.

La menor concentración urinaria de estos tres F₂-dihomo-IsoPs en los pacientes trasplantados, que podría reflejar un menor EO en estos pacientes, no se asemeja con los datos aportados por la bibliografía, donde se declara lo contrario (77). Esto podría deberse al tratamiento que tienen pautado estos pacientes y que incluye altas dosis de corticosteroides. Dicho grupo terapéutico tiene una amplia gama de efectos, entre los cuales está la inhibición de la fosfolipasa A2 (50). Estos isómeros, a diferencia de los prostanoïdes convencionales, se forman por el efecto de los RL sobre el AdA de las membranas celulares, liberándose posteriormente mediante la acción de la fosfolipasa (169). La inhibición de esta enzima mediada por los corticosteroides incluidos en su

terapia podría disminuir su concentración urinaria, posible motivo por el cual los encontramos disminuidos en los pacientes trasplantados.

En el caso del otro compuesto de esta clase, el *ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP*, en el cual se observó un patrón diferente, podría ser que en determinadas condiciones fisiológicas se libere en mayor medida que el resto de su homólogos, algo que no se puede demostrar debido a que el metabolismo de estos compuestos no se conoce con exactitud en la actualidad. Las diferencias encontradas en su concentración entre ambos grupos al inicio del estudio pero no al final, reflejaría la disminución del EO en los pacientes a lo largo de la etapa postrasplante, hallazgo que podría abrir nuevas puertas a la investigación en este campo.

5.4. Función renal en los pacientes trasplantados según las características del trasplante

Tal y como se expuso en el **capítulo 5.2.1**, se sabe que ciertas características del trasplante como la edad del donante, el tipo de muerte, el tiempo de isquemia fría del injerto, la presencia o no de retraso en la función inicial tras el trasplante, influyen en la evolución y resultados del mismo a largo plazo (117).

5.4.1. Diferencias relacionadas con la función inicial del injerto

El RFI del injerto es un hecho frecuente en la fase postrasplante inmediata que afecta principalmente a los trasplantes con donante cadáver, y que se relaciona con un peor pronóstico a largo plazo (117). Este fenómeno se produce por el daño causado en

el órgano a través del fenómeno de isquemia-reperfusión, o por el patrón inflamatorio desencadenado por el sistema inmune del receptor como mecanismo de rechazo (123).

Los pacientes que presentan RFI tienen mayor riesgo de nefropatía crónica del injerto (124), habiéndolos relacionado con un aumento de la proteinuria, principalmente a partir del tercer mes postrasplante, que es consecuencia de la alteración funcional generada (130,170).

En el estudio se separó a la población trasplantada en dos grupos en función de si presentaron o no RFI, y se compararon entre ambos los diferentes parámetros analizados en el mismo.

La función renal se vio que era significativamente mejor en los que no sufrieron RFI durante todo el estudio, presentando estos además una menor proteinuria. Así mismo, se encontró una concentración urinaria de IsoPs en el sexto mes postrasplante significativamente menor. En el caso de los PTs, se observó que su concentración en este grupo era menor desde el primer mes hasta el sexto, encontrando diferencias significativas solo al final del estudio.

Por tanto, en el grupo de pacientes que presentó RFI, se halló una peor función renal y un aumento de los marcadores de EO y de los PTs. Esto viene desencadenado por la alteración funcional que genera el RFI y que empeora la función renal de estos pacientes (123,124), además del aumento de proteinuria postrasplante que los acompaña (170) y la consecuente inflamación y EO que se generan (162–165).

5.4.2. Diferencias en función de la edad del donante

La edad del donante es otro de los factores a tener en cuenta a la hora de hacer un trasplante, que se ha visto que influye en la aparición de nefropatía crónica del injerto y en la supervivencia del mismo a largo plazo (171–173).

Los riñones de personas de mayor edad poseen menor masa de nefronas y, a consecuencia de ello y como mecanismo compensatorio, los glomérulos se hipertrofian generando un estado de hiperfiltración glomerular tras el trasplante, que desencadena una excesiva filtración de proteínas (171,173).

Es este estudio se observó que los pacientes que recibieron un trasplante de donantes de mayor edad tenían peor función renal que aquellos que lo hicieron de donantes más jóvenes, encontrando una correlación inversa entre la edad del donante y el MDRD a partir del primer mes postrasplante, y otra directa con la proteinuria en el sexto mes del estudio, y como consecuencia con los IsoPs y algunos PTs.

Por tanto, en este estudio se observó que a mayor edad del donante, peor función renal por la menor masa nefronal del injerto, algo que disminuirá el FG y que con el tiempo, debido a la hiperfiltración compensatoria, aumentará la proteinuria, la cual a su vez aumentará el estado inflamatorio y el EO, afectando así negativamente a su función.

5.4.3. Diferencias en función del tipo de muerte del donante

En líneas generales sobreviven más y tienen mejor función renal los injertos procedentes de donantes cuya muerte fue por causa traumática. Este hecho se podría explicar porque los pacientes que han fallecido por causa cerebrovascular suelen ser

pacientes de mayor edad y presentan un daño renal directo por la misma, habiendo además estado sometidos a mayor número de factores de estrés durante su ingreso en UCI como son el daño por isquemia-reperfusión y las condiciones en las que se mantiene al donante hasta que se extirpa el órgano (117).

Los datos de este estudio se mostraron contrarios al realizado por Rosique y colaboradores (117) y a la revisión realizada por el Halloran y colaboradores (174), donde los riñones de donantes fallecidos por causa cerebrovascular tuvieron peor función renal que los riñones de donantes fallecidos por causa traumática.

En este estudio se observó como el grupo de pacientes que recibió un trasplante de donantes muertos por TCE presentaba una mayor proteinuria y un menor FGe, pero sin alcanzar el nivel de significancia estadístico establecido ($p < 0.05$). Además, se observó que estos pacientes presentaban concentraciones urinarias significativamente más altas de algunos IsoPs y de algunos PTs en el sexto mes postrasplante, momento en el que la diferencia en la proteinuria entre ambos grupos fue mayor, asociando por tanto este aumento al incremento de dicha proteinuria.

Tras analizar estos datos y no llegar a un resultado concluyente, estudiamos las características de los pacientes de ambos grupos, observando que, casualmente, la media de edad de los pacientes del grupo de TCE era mayor que la de los del grupo de ACV. Esto no suele suceder así, puesto que los pacientes muertos por ACV suelen ser pacientes con mayor edad que los de TCE. Dicho hallazgo nos llevó a la conclusión de que las diferencias encontradas entre nuestro estudio y los datos aportados por la literatura científica (117,174), se debían a la edad anormalmente alta del grupo de TCE del estudio, probablemente debido a la reducida población del mismo, tal y como comentábamos en el **apartado 5.1.1**. Además, teniendo en cuenta que si hubiésemos

tenido un mayor número poblacional, estos resultados se habrían normalizado y estarían en concordancia con los descritos en la bibliografía consultada.

5.4.4. Diferencias en función del tiempo de isquemia fría del injerto

El tiempo de isquemia fría de un órgano se define como el intervalo transcurrido, en horas, entre la perfusión del órgano con la solución de preservación fría a 4° C, y el desclampaje arterial en el receptor (175). En este periodo, se produce una necrosis tubular aguda, consecuencia del daño causado por el estrés oxidativo sobre el glomérulo renal, siendo mayor éste cuanto más se prolonga la isquemia, debido al agotamiento que se da en los mecanismos de defensa antioxidantes del tejido renal (55).

La alteración causada en este periodo en el glicocálix endotelial de los capilares glomerulares aumentará la permeabilidad de los mismos, desencadenando un incremento de la proteinuria (176) que posteriormente se estabilizará con la perfusión del órgano y la reparación parcial de los daños ocasionados.

En este estudio, se halló una gran disminución en la proteinuria entre el inicio y el final del mismo, y una correlación positiva entre el cociente $PtO\ CrO^{-1}$ y el tiempo de isquemia fría al sexto mes postrasplante. Este hecho nos llevó a pensar que solo se encontró correlación significativa en este momento debido a la gran variabilidad que presentan estos pacientes y a las alteraciones que les acompañan durante esta etapa, siendo mayor la estabilidad y homogeneidad a medida que avanza la fase postrasplante.

Con el MDRD se obtuvo una correlación inversa en todos los meses del estudio, hecho que podría reflejar la restauración incompleta de los daños ocasionados por la isquemia.

Además se observó una correlación positiva con algunos de los IsoPs en diferentes momentos del estudio, así como con algunos PTs, siendo mayoritarias éstas en el día 5 postrasplante. La mayor correlación encontrada en los momentos iniciales del estudio entre el tiempo de isquemia fría y el EO y los PTs, con respecto a los momentos finales, refleja la reparación del daño causado por la isquemia y la reposición en el tejido renal de los mecanismos antioxidantes agotados durante el periodo de hipoxia (55).

5.5. Correlación de otros parámetros bioquímicos analizados con los eicosanoides

Al estudiar la correlación entre los diferentes parámetros bioquímicos del estudio y los marcadores de estrés oxidativo y de función vascular, se observaron diferentes resultados.

En primer lugar, los parámetros inflamatorios no correlacionaron de forma significativa ($p > 0.05$) con los marcadores de EO, pero sí con algunos PTs ($p < 0.05$) en diferentes momentos del estudio, hecho atribuido al papel de los PTs como mediadores del proceso inflamatorio descrito anteriormente (162–164).

Por otra parte, en relación con los parámetros bioquímicos de función hepática no se encontró correlación alguna, ni con los metabolitos de peroxidación lipídica ni con los PTs. Con la glucosa si se obtuvieron resultados significativos ($p < 0,05$), observándose una correlación positiva con los IsoPs, algún NeuroP y un F₂-dihomo-IsoP, pero no con los PTs. Estos resultados reflejan el aumento de EO que desencadena la hiperglucemia, datos que concuerdan con los descritos por Rosado-Pérez y colaboradores (40).

5.6. Estudio de los eicosanoides analizados en los pacientes que presentaron un rechazo confirmado por biopsia

El rechazo de un órgano sólido es un complejo proceso fisiopatológico que va más allá del rechazo inmunológico y al que contribuyen muchos factores, incluyendo entre ellos el estrés oxidativo (51,105). Un desequilibrio oxidativo, causado por un aumento en la generación de radicales libres y una disminución de la capacidad para restaurar el equilibrio REDOX del cuerpo, producirá efectos negativos en la célula que empeoran su función y acortan su ciclo de vida (42). Este efecto adverso del EO sobre las células se debe, en parte, a la destrucción de los AGP que integran la membrana celular (177).

Tres de las principales dianas de peroxidación lipídica son el cerebro, el riñón y el hígado, implicando esto neurotoxicidad, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad (54) cuando se produce un excesivo EO. El riñón es un órgano muy vulnerable al daño oxidativo debido a la abundancia de AGP de cadena larga que componen los lípidos renales, siendo por tanto un sitio de producción y eliminación de estos metabolitos. Algunos estudios han relacionado el EO con el daño renal (178), pero son muy limitados los estudios realizados en pacientes trasplantados renales que hayan sufrido un rechazo.

En este estudio se analizó el comportamiento de los marcadores de EO y PTs en la fase postrasplante en aquellos pacientes que presentaron un rechazo confirmado por biopsia, observando que no presentaron un patrón común, encontrándolos en unos casos elevados y en otros disminuidos con respecto a los pacientes trasplantados que no sufrieron rechazo. Para esta comparativa no se pudo emplear el test no paramétrico *U de Mann-Whitney* debido al bajo número de rechazos que se encontraron en el estudio.

Por lo tanto, no se pudo llegar a una conclusión certera con respecto al rechazo renal, ni sobre las diferencias sobre estos metabolitos entre pacientes que sufrieron rechazo y los que no, ni sobre su posible valor biológico como predictores de rechazo. Sin embargo, estos resultados aportan una valiosa información preliminar que servirá de base para futuras investigaciones en el campo de la fisiopatología renal.

6. CONCLUSIONES

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones generales:

Conclusión 1:

- Durante el periodo postrasplante se constató una mejora en la función renal y en el estado nutricional, así como una disminución en la inflamación. Referente a la función hepática, no se observó alteración alguna durante el estudio.

Conclusión 2:

- El estado nutricional y la función renal de los trasplantados mejoraron a lo largo del estudio, llegando los parámetros nutricionales a alcanzar valores similares a los del grupo control. Por el contrario, a pesar de la mejora, la función renal de los trasplantados no se consiguió equiparar con la de los sanos en su totalidad.
- Los marcadores de lipoperoxidación analizados en ambos grupos, los F₂-dihomo isoprostanos y neuroprostanos, se mantuvieron elevados durante los seis meses postrasplante en los pacientes trasplantados con respecto a los voluntarios sanos, hecho que nos indica un aumento del estrés oxidativo en los pacientes trasplantados.

Conclusión 3:

- En los pacientes trasplantados, el estrés oxidativo disminuyó a lo largo de la etapa postrasplante, acompañado de un aumento del filtrado glomerular estimado y una disminución de la proteinuria.
- Se halló una correlación directa entre la excreción de proteínas urinarias y la excreción de metabolitos de lipoperoxidación, hecho que nos indica el aumento

de estrés oxidativo al aumentar la carga de proteínas en la nefrona y que desencadena un deterioro de la función renal.

- El aumento de la excreción de proteínas en paralelo con los metabolitos de peroxidación, con el consiguiente incremento del estrés oxidativo, nos lleva a plantear la disyuntiva de si sería interesante o no el tratamiento con antioxidantes de los pacientes con proteinuria para disminuir el daño oxidativo y con ello moderar el deterioro del injerto, buscando con ello una mayor supervivencia del mismo y una menor tasa de rechazo.
- Entre los 26 metabolitos de peroxidación lipídica analizados, los que mejor correlación presentaron con la proteinuria y que podrían emplearse como marcadores de daño renal tras el trasplante son los siguientes:
 - a. Isoprostanos: 8-iso-15(*R*)-PGF_{2α}; 15-*epi*-15F_{2t}; 5-F_{2t}; 5-*epi*-5-F_{2t}; 8-F_{3t}
 - b. Neuroprostanos: 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP

Conclusión 4:

- Se constató que según mejoraba la función renal con un aumento del filtrado glomerular estimado y una disminución de la proteinuria, la excreción de prostaglandinas inflamatorias en líneas generales disminuía, indicando con ello una disminución del estado inflamatorio al disminuir la excreción renal de proteínas.

Conclusión 5:

- Aquellos pacientes que presentaron retraso en la función inicial tuvieron una peor función renal durante todo el estudio, con un aumento de la excreción urinaria de proteínas, de metabolitos de lipoperoxidación y de prostanoides

inflamatorios, parámetros que probablemente ayudarán en un futuro próximo al seguimiento del proceso del trasplante renal.

- Tanto la edad del donante como el tiempo de isquemia fría del órgano trasplantado se correlacionan positivamente con una función renal deficiente, donde la proteinuria y la excreción de eicosanoides y marcadores de estrés oxidativo se ven aumentadas. Este hallazgo amplía nuestro conocimiento acerca de la compleja fisiopatología renal y podrá ser aplicado para mejorar el proceso del trasplante.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, et al. Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrología* [Internet]. 2014;34(3):302–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798565>
2. Rashad S, Barsoum M. Chronic Kidney Disease in the Developing World. *N Engl J Med*. 2006;354:997–9.
3. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree S, King H. Global Prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047–53.
4. Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, Inagi R, Miyata T. Current Issues and Future Perspectives of Chronic Renal Failure. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(1):3–6.
5. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, et al. Systematic Review: Kidney Transplantation Compared With Dialysis in Clinically Relevant Outcomes. *Am J Transpl*. 2011;11(10):2093–109.
6. Torres Zambudio C. Insuficiencia renal crónica. *Rev Med Hered*. 2003;14(1):1–4.
7. Sociedad Española de Nefrología. Informe de Diálisis y Trasplante 2014. SEN [Internet]. 2014; Available from: http://www.senefro.org/contents/webstructure/REER_Cong_SEN_2015.pdf
8. Ritz E, Schömig M. The diabetic patient with renal failure. *Nefrología*. 2000;20(3):16–24.
9. Iseki K. Chronic Kidney Disease in Japan. *Inter Med*. 2008;47(8):681–9.
10. NIDDK. Kidney Disease Statistics for the United States [Internet]. 2016. Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/health-statistics/Pages/kidney-disease-statistics-united-states.aspx#top>
11. Documento Marco sobre Enfermedad Renal Crónica (ERC) dentro de la Estrategia de Abordaje a la Cronicidad en el SNS [Internet]. Consejería de Sanidad. 2015. p. 1–55. Available from: http://www.msssi.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/Enfermedad_Renal_Cronica_2015.pdf
12. Valdés C, Ortega F. Avances en la calidad de vida relacionada con la salud y trasplante renal. *Nefrología*. 2006;26(2):157–62.
13. Informe de Diálisis y Trasplante 2014. XLV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. 2015. p. 1–73.

14. Tratado de trasplante de órganos. Aran. 2006. 107-109 p.
15. Alonso M, Álvarez Miranda M, Benito J, Blanco C. El modelo Español de Coordinación y Trasplantes. 2nd ed. 2008.
16. La Arrixaca , hospital con mayor número de donantes a nivel nacional. La Opinión de Murcia [Internet]. 2016; Available from: <http://www.laopiniondemurcia.es/comunidad/2016/01/12/arrixaca-hospital-mayor-numero-donantes/705425.html>
17. Robert A, Valarie B, Edgar L, Akinlolu O, Robert E. Comparison on Mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999;341(23):1725–30.
18. Marrero DH, Alcaide MG. Resultados globales del trasplante renal. *Nefrología* [Internet]. 2010;80. Available from: <http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefrologia-articulo-resultados-globales-del-trasplante-renal-XX342164212000058>
19. Pilmore H, Dent H, Chang S, McDonald S, Chadban SJ. Reduction in Cardiovascular Death After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2010;89(7):851–7.
20. Campistol J., Morales J. Manejo de tumores tras el trasplante renal. *Nefrología*. 2009;29(2):33–45.
21. Maluccio M, Sharma V, Lagman M, Vyas S, Yang H, Li B, et al. Tacrolimus enhances transforming growth factor-beta1 expression and promotes tumor progression. *Transplantation*. 2003;76(3):597–602.
22. Dharnidharka VR, Lamb KE, Gregg JA. Associations Between EBV Serostatus and Organ Transplant Type in PTLD Risk: An Analysis of the SRTR National Registry Data in the United States. *Am J Transplant*. 2012;12:976–83.
23. Cervera C, Moreno A. Infecciones en el paciente con trasplante renal y pancreático. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(5):345–55.
24. Moreso F, Alonso A, Gentil MA, Gonza M, Marce R. Improvement in late renal allograft survival between 1990 and 2002 in Spain: results from a multicentre case – control study. *Transpl Int*. 2010;23:907–13.
25. Sola E, Gonzalez-Molina M, Cabello M, Burgos D, Ramos J, Gutierrez C, et al. Long-term improvement of deceased donor renal allograft survival since 1996: a single transplant center study. *Transplantation*. 2010;89(6):714–20.
26. Pascual M, Theruvath T, Tolkoff-rubin N, Cosimi AB. Strategies to Improve Long-Term Outcomes after Renal Transplantation. *N Engl J Med*. 2002;346:580–90.

27. Cruz D, Geus H, Bagshaw S. Biomarker strategies to predict need for renal replacement therapy in acute kidney injury. *Semin Dial.* 2011;24(2):124–31.
28. Delanghe J, Speeckaert M. Preanalytical requirements of urinalysis. *Biochem Medica.* 2014;24(1):89–104.
29. Ruiz JC, Sancez-Fructuoso A, Zárrega S. Management of proteinuria in clinical practice after kidney transplantation. *Transplant Rev.* 2012;26(1):36–43.
30. Soler MJ, Riera M, Pascual J. New options and perspectives for proteinuria management after kidney transplantation. *Transplant Rev.* 2016;26(1):44–52.
31. Williams WW, Taheri D, Tolkoff-Rubin N, Colvin R. Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(2):110–21.
32. Rivera F. Biopsia renal. *NefroPlus* [Internet]. 2009;2:1–8. Available from: <http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefroplus-articulo-biopsia-renal-X1888970009000371>
33. Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World J Urol.* 2007;25:445–55.
34. Salaman JR. Monitoring of rejection in renal transplantation. *Immunol Lett.* 1991;29(1):139–42.
35. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et al. Urinary-Cell mRNA Profile and Acute Cellular Rejection in Kidney Allografts. *N Engl J Med* [Internet]. 2013;369:20–31. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1215555>
36. Xuefeng B L, Tara K S, Kenneth L, Ying L, Lau I, Schilling J, et al. Integrative Urinary Peptidomics in Renal Transplantation Identifies Biomarkers for Acute Rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(4):646–53.
37. Ochoa B. La lipidómica , una nueva herramienta al servicio de la salud . *Gac Med Bilbao.* 2006;103:101–2.
38. Yan Z, Mas E, Mori TA, Croft KD, Barden AE. A significant proportion of F2-isoprostanes in human urine are excreted as glucuronide conjugates. *Anal Biochem.* 2010;403(1-2):126–8.
39. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298–300.
40. Rosado-Pérez J, Mendoza-Núñez VM. Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 2007;32(2):58–69.

41. Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In: Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms [Internet]. 2007. p. 1–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3869/>
42. Corrales LC, Ariza MMM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas*. 2012;10(18):135–250.
43. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* [Internet]. 2003;552(2):335–44. Available from: <Go to ISI>://WOS:000186328100002
44. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47–95.
45. Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids*. 2012;165(6):638–47.
46. Gastell PLP, De Alejo JLP. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cuba Med Mil*. 2000;29(3):192–8.
47. Heredia D, Fernández D, Alfonso J, Ballesteros M. El estrés oxidativo en la insuficiencia renal asociada con hipertensión. *Rev Cuba Investig Biomédicas*. 2012;31(1):16–25.
48. González M, Puchades MJ, García R, Sáez G, Tormos MC, Miguel A. Efecto del tratamiento con hemodiálisis sobre el estrés oxidativo en pacientes con insuficiencia renal crónica. *Nefrología* [Internet]. 2006;26(2):218–25. Available from: <http://www.revistanefrologia.com/mostrarfile.asp?ID=163>
49. Fonseca I, Reguengo H, Almeida M, Dias L, Martins LS, Pedroso S, et al. Oxidative stress in kidney transplantation: malondialdehyde is an early predictive marker of graft dysfunction. *Transplantation* [Internet]. 2014;97:1058–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406454>
50. Cracowski J, Souvignet C, Quirin N, Grosbois X, Bayle F. Urinary F₂-isoprostanes formation in kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2001;15:58–62.
51. Saldaña A, Garcia B, Enamorado A, Garcia JC. El estrés oxidativo en la fisiopatología del trasplante renal. *Rev Cuba Investig Biomédicas*. 1999;18(3):225–30.
52. Simic-Ogrizovic S, Simic T, Reljic Z, Markovic S, Blagojevic R, Radivojevic D, et al. Markers of oxidative stress after renal transplantation. *Transpl Int* [Internet]. 1998;11(1):125–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9664961>
53. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. 2007.

54. Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: Lipid Peroxidation [Internet]. 2012. p. 3–30. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-chemical-mechanism-biological-implications-and-analytical-determination>
55. Céspedes Miranda E, Castillo Herrera J. La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito? *Rev Cuba Investig Biomédicas* [Internet]. 2008;27(2):2–8. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002008000200003
56. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:9383–7.
57. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med*. 1995;332:1198–203.
58. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res*. 1997;36(1):1–21.
59. Medina S, Domínguez-Perles R, Gil JI, Ferreres F. A ultra-pressure liquid chromatography / triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2012;26:1249–57.
60. Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol*. 2001;280:1067–82.
61. Roberts II LJ, Morrow JD. Measurement of F₂ isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(4):505–13.
62. González Luis GE, Villamor Zambrano E, Jimenez R. Efecto de los Isoprostanos en la Reactividad Vascular Pulmonar y Sistémica durante el Período Neonatal [Internet]. Facultad de Medicina de Barcelona; 2005. Available from: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2465/GGL_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
63. Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins*. 1997;53(2):63–7.
64. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, Fitzgerald GA. The isoprostanes: A perspective. *Prostaglandins*. 1997;54(6):823–51.

65. Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, Hayashidani S, Suematsu N, Tsuchihashi M, et al. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:438–42.
66. Helmersson J, Mattsson P, Basu S. Prostaglandin F(2alpha) metabolite and F(2)-isoprostane excretion rates in migraine. *Clin Sci.* 2002;102(1):39–43.
67. Gopaul N, Zacharowski K, Halliwell B, Anggard E. Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F2-isoprostane levels. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(5):806–14.
68. Richelle M, Turini ME, Guidoux R, Tavazzi I, Métaïron S, Fay LB. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett.* 1999;459:259–62.
69. Mastaloudis A, Leonard S, Traber M. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(7):911–22.
70. Fernandez JM, Da Silva-Grigoletto ME, Túnñez I. Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev Andal Med Deport.* 2009;2(1):19–34.
71. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* [Internet]. 1994;46(2):205–29. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/46/2/205.full.pdf> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7938166>
72. Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, et al. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13605–12.
73. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* [Internet]. 1999;99:224–9. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/99/2/224.full.pdf>
74. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:279–86.
75. Casadesus G, Smith M a, Basu S, Hua J, Capobianco DE, Siedlak SL, et al. Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2007;2(2):1–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1785381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

76. Díaz-Hung ML, González Fragueta ME. El estrés oxidativo en las enfermedades neurológicas: ¿causa o consecuencia?. *Neurologia*. 2014;29(8):451–2.
77. Lauzurica R, Pastor MC, Bayes B, Hernandez JM, Bonet J, Llopis MA, et al. F2-isoprostanes in kidney transplant patients: relationship with inflammatory markers. *Transpl Proc* [Internet]. 2005;37(9):3842–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386558>
78. Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation—a review. *Curr Med Chem* [Internet]. 2003;10(17):1723–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871112>
79. Cottone S, Mulè G, Guarneri M, Palermo A, Lorito MC, Riccobene R, et al. Endothelin-1 and F2-isoprostane relate to and predict renal dysfunction in hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:497–503.
80. Musiek ES, Brooks JD, Joo M, Brunoldi E, Porta A, Zanoni G, et al. Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory mediators formed from the peroxidation of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *J Biol Chem*. 2008;283(29):19927–35.
81. Valenzuela R, Tapia G, Gonzalez M, Valenzuela A. Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Rev Chil Nutr*. 2011;38(3):356–67.
82. Lauretani F, Maggio M, Pizzarelli F, Michelassi M. Omega-3 and Renal Function in Older Adults. *Curr Pharm Des*. 2009;15(36):4149–56.
83. Sastry PS. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Prog Lipid Res*. 1985;24(2):69–176.
84. VanRollins M, Woltjer RL, Yin H, Morrow JD, Montine TJ. F2-dihomo-isoprostanes arise from free radical attack on adrenic acid. *J Lipid Res*. 2008;49:995–1005.
85. De Felice C, Signorini C, Durand T, Oger C, Guy A, Bultel-Poncé V, et al. F2-dihomo-isoprostanes as potential early biomarkers of lipid oxidative damage in Rett syndrome. *J Lipid Res* [Internet]. 2011;52:2287–97. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3283260&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
86. Kopf PG, Zhang DX, Gauthier KM, Campbell WB. Adrenic Acid Metabolites as Endogenous Endothelium-and Zona Glomerulosa-Derived Hyperpolarizing Factors. *Hypertension*. 2010;55(2):547–64.
87. Medina S, De Miguel-Eliazaga I, Oger C, Galano J-M. Dihomo-isoprostanes as potential biomarkers of oxidative injury in epilepsy by a new and robust UHPLC-QqQ-MS/MS method. *Free Radic Biol Med*. 2015;79:154–63.

88. García-Flores LA, Medina S, Cejuela R, Martínez-Sanz JM, Oger C, Galano J-M, et al. Assessment oxidative stress biomarkers –neuroprostanes and dihomio-isoprostanes- in elite triathletes urine after two weeks of moderate altitude training. *Free Radic Res* [Internet]. 2016;50(5):485–94. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2015.1111514>
89. Dominguez Z. Los prostanoides, una revolución autacoide. *An Venez Nutr*. 2006;19(2):1–11.
90. Kurzrok R, Lieb CC. Biochemical Studies of Human Semen. II. The Action of Semen on the Human Uterus. *Exp Biol Med* [Internet]. 1930;28(3):268–72. Available from: <http://ebm.sagepub.com/content/28/3/268.abstract>
91. Bergström S, Samuelsson B. Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. *J Biol Chem* [Internet]. 1962;237(9):3005–6. Available from: <http://www.jbc.org/content/237/9/PC3005.short>
92. Olley P, Coceani F. The Prostaglandins. *Am J Dis Child*. 1980;134(7):688–96.
93. Strange JW, Wharton J, Phillips PG, M.R. W. Recent insights into the pathogenesis and therapeutics of pulmonary hypertension. *Clin Sci* [Internet]. 2002;102:253–68. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002097768>
94. Gyires K. Gastric mucosal protection: from prostaglandins to gene-therapy. *Curr Med Chem*. 2005;12(2):203–15.
95. Prostaglandinas [Internet]. 2007. Available from: <http://medmol.es/glosario/62/>
96. Salomón R. Enfermedad inflamatoria del intestino: colitis ulcerativa. *Gac Medica Caracas* [Internet]. 2007;115(3):1–27. Available from: http://vereda.ula.ve/gaccuv/wp-content/uploads/2009/11/EnfermedadInflamatorisdelInstestino_RicardoSalomon_-GacetaMedicaCaracas_GACCUV_2009.pdf
97. Stamatakis K, Jimenez-Martinez M, Jimenez-Segovia A, Chico-Calero I, Conde E, Galán-Martínez J, et al. Prostaglandins induce early growth response 1 transcription factor mediated microsomal prostaglandin E2 synthase up-regulation for colorectal cancer progression. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(37):39941–59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4741871&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
98. Montero JG. Manejo de las Prostaglandinas en el recién nacido con cardiopatía [Internet]. *Sociedad Española de Cardiología Pedriátrica y Carsiopatías Congénitas*. p. 163–9. Available from: [file:///C:/Documents and Settings/Jose Luis/Mis documentos/Downloads/lp_cap12.pdf](file:///C:/Documents%20and%20Settings/Jose%20Luis/Mis%20documentos/Downloads/lp_cap12.pdf)

99. Uranga AI, Barrueta OI, Ibáñez MO, Etxebarria UL, Santiago BC, Lambarri AI, et al. Tratamiento de la hipertensión pulmonar. *Farm Hosp.* 2004;28(4):275–85.
100. Perez G. Usos farmacológicos de las prostaglandinas [Internet]. Available from: http://www.prostaglandina.com/usos_farmacologicos_de_las_prostaglandinas
101. Kim GH. Renal effects of prostaglandins and cyclooxygenase-2 inhibitors. *Electrolyte Blood Press.* 2008;6:35–41.
102. Paller MS, Manivel JC. Prostaglandins protect kidneys against ischemic and toxic injury by a cellular effect. *Kidney Int.* 1992;42:1345–54.
103. Mark Moran MD, Martin F, Mozes M, Michael S, Col E. Prevention of acute graft rejection by the prostaglandin E1 analogue misoprostol in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and prednisone. *N Engl J Med.* 1990;322(17):1183–8.
104. AINEs en la Insuficiencia Renal Avanzada. [Internet]. Murcia Salud. 2015. Available from: http://www.murciasalud.es/preevid.php?op=mostrar_pregunta&id=14835&idsec=453#
105. Arulkumaran N, Annear NMP, Singer M. Patients with end-stage renal disease admitted to the intensive care unit: systematic review. *Br J Anaesth.* 2013;110(1):13–20.
106. Lu X, Perkins D. A systems biology view of allograft rejection. *Organ Transplant.* 2005;10(1):28–34.
107. Declaration of Helsinki World Medical Association Declaration of Helsinki. *Bull World Health Organ.* 2001;79:373–4.
108. Althof S, Kindler J. El sedimento urinario. Atlas, técnicas de estudio y valoración. E.M. Panam. 2003.
109. Auvinet A-L, Eignerova B, Guy A, Kotora M, Durand T. Total synthesis of 4-F 3t - neuroprostane and its 4-epimer. *Tetrahedron Lett.* 2009;50(13):1498–500.
110. Guy A, Oger C, Heppekausen J, Signorini C, De Felice C, Fürstner A, et al. Oxygenated metabolites of n-3 polyunsaturated fatty acids as potential oxidative stress biomarkers: total synthesis of 8-F3t-IsoP, 10-F4t-NeuroP and [D4]-10-F4t-NeuroP. *Chem Eur J.* 2014;20:6374–80.
111. Arrizabalaga J, Calañas-Contiente A, Vidal J, Masmiguel L. Clinical Practice Guideline for the Management of Overweight. *Endocrinol y Nutr.* 2003;50(4):1–38.

112. García de Guadiana L, González Morales M, Albaladejo Otón MD, Martín García E, Martín-Ondarza González MDC, Nuevo García J, et al. Utilidad de la hemoglobina A1c en el diagnóstico de diabetes mellitus y otras alteraciones del metabolismo glucídico en mujeres con diabetes mellitus gestacional reciente. *Endocrinol y Nutr.* 2012;59(6):362–6.
113. Delgado JM, Perez Tamajón L, Marrero Miranda D, Álvarez González A, González Rinne A. Complicaciones médicas precoces tras el trasplante renal. *Nefrología [Internet].* 2010;80:769–94. Available from: <http://www.revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-complicaciones-medicas-precoces-tras-el-trasplante-renal-65>
114. Lu X, Perkins DL. A systems biology view of allograft rejection. *Organ Transplant.* 2005;10(1):28–34.
115. Lim DST, Kee TYS, Fook-Chong S, Zhang RF, Chandran M. Prevalence and patterns of bone loss in the first year after renal transplant in South East asian patients. *Transplantation.* 2011;92(5):557–63.
116. Martínez-Castelao A, Bonal I, Troya M, Cases A, Vallès M. Registro de enfermos renales de Cataluña [Internet]. *IdesCat.* 2010. p. 1–6. Available from: <http://www.idescat.cat/cat/idescat/biblioteca/docs/pec/paae2011/gi04652010.pdf>
117. Rosique López F. Factores pronósticos que influyen en la supervivencia del injerto renal a largo plazo en la Región de Murcia [Internet]. Universidad de Murcia. 2013. Available from: <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf>
118. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D’Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. *Kidney Int.* 2001;59:1498–509.
119. [Internet]. 2015;143:77–84. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872015000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
120. Gentil M, López M, Algarra R, Pereira P, González Roncero F, Toro J. Coste de los fármacos inmunosupresores de mantenimiento en el trasplante renal. *Nefrologia.* 2002;22(3):269–76.
121. Memoria donantes 2014 [Internet]. *ONT.* 2015. p. 1–8. Available from: [http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria donantes 2014.pdf](http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20donantes%202014.pdf)
122. Kälble T, Alcaraz A, Budde K, Humke U, Karam G, Lucan M, et al. Guía clínica sobre el trasplante renal. *Eur Assoc Urol [Internet].* 2010;1073–178. Available from: <http://uroweb.org/wp-content/uploads/15-GUIA-CLINICA-SOBRE-TRANSPLANTE-RENAL.pdf>
123. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J*

- Transplant [Internet]. 2011;11(11):2279–96. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-6143.2011.03754.x/full> \n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3280444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
124. Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol*. 1996;155(6):1831–40.
 125. Arroyo D. Control de la anemia en el postrasplante renal precoz. *Nefrología*. 2012;3(5):31–6.
 126. Herrera-Gómez F, Nocito-Colón M, Martín-García D, Herrera-Bugnazet R, Navarebollo Á, Andrés-martín B, et al. Tolerancia inmunológica y trasplante renal. *NefroPlus* [Internet]. 2014;6(1):15–9. Available from: <http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefroplus-articulo-tolerancia-inmunologica-trasplante-renal-X1888970014001514>
 127. Abedini S, Holme I, März W, Weihrauch G, Fellström B, Jardine A, et al. Inflammation in renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(7):1246–54.
 128. Cerrillos-Gutiérrez JI, Miranda-Díaz AG, Preciado-Rojas P, Gómez-Navarro B, Sifuentes-Franco S, Carrillo-Ibarra S, et al. The Beneficial Effects of Renal Transplantation on Altered Oxidative Status of ESRD Patients. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016;1–6. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L611653352> \n<http://dx.doi.org/10.1155/2016/5757645> \n<http://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=19420994&id=doi:10.1155/2016/5757645&atitle=The+Beneficial+Effects+o>
 129. Ruggenti P, Perna A, Remuzzi G. Retarding progression of chronic renal disease: The neglected issue of residual proteinuria. *Kidney Int* [Internet]. 2003;63:2254–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00033.x>
 130. Halimi JM, Laouad I, Buchler M, Al-Najjar A, Chatelet V, Houssaini TS, et al. Early low-grade proteinuria: Causes, short-term evolution and long-term consequences in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2005;5(9):2281–8.
 131. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2974–84.
 132. Bruzzi I, Benigni A, Remuzzi G. Role of increased glomerular protein traffic in the progression of renal failure. *Kidney Int Suppl* [Internet]. 1997;62:29–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9350674>
 133. Walsh ME, Shi Y, Van Remmen H. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2014;66:88–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23743291> \n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

23743291

134. Ulate G. Fisiología renal. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2006.
135. Ganong W. Review of Medical Physiology. 22nd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2005.
136. Escalante-Gómez C, Zeledón-Sánchez F, Ulate-Montero G. Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. *Acta Med Costarric* [Internet]. 2007;49(2):83–9. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022007000200004&lng=en
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022007000200004
137. Gekle M. Renal Tubule Albumin Transport. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:573–94.
138. Arici M, Brown J, Williams M, Harris KPG, Walls J, Brunskill NJ. Fatty acids carried on albumin modulate proximal tubular cell fibronectin production: a role for protein kinase C. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2002;17(10):1751–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270980>
139. Morigi M, Macconi D, Zoja C, Donadelli R, Buelli S, Zanchi C, et al. Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2002;13:1179–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11961005>
140. Oliw EH, Stark K, Bylund J. Oxidation of prostaglandin H₂ and prostaglandin H₂ analogues by human cytochromes P450: Analysis of n-side chain hydroxy metabolites and four stereoisomers of 5-hydroxyprostaglandin II by mass spectrometry. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(4):407–15.
141. Gambaro G, Perazella MA. Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors. *J Intern Med* [Internet]. 2003;253:643–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12755960>
142. Ricciotti E, Fitzgerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):986–1000.
143. Caton MPL, Stuttle KAJ, Tuffin DP, Ansell MF. Comparative action of carbocyclic thromboxane A₂ stereoisomers on platelets. *Eur J Med Chem*. 2000;35(12):1099–107.
144. Song WL, Wang M, Ricciotti E, Fries S, Yu Y, Grosser T, et al. Tetranor PGDM, an abundant urinary metabolite reflects biosynthesis of prostaglandin D₂ in mice and humans. *J Biol Chem*. 2008;283(2):1179–88.
145. Zaher R. Comparative Pathophysiology and Toxicology of Cyclooxygenases. 1st ed.

Wiley; 2012.

146. Olesen ET, Fenton RA. Is there a role for PGE₂ in urinary concentration? *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013;24:169–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23160514>
147. Norregaard R, Kwon T-H, Frokiær J. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *Kidney Res ClinPract*. 2015;34(4):194–200.
148. Wang X, Lin H, Gu Y. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2012;11–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3295719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract><http://www.lipidworld.com/content/11/1/25>
149. Breyer MD, Breyer RM. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *AnnuRevPhysiol* [Internet]. 2001;63(1):579–605. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.63.1.579>
150. Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, et al. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *J Neurochem*. 2007;101(2):397–410.
151. Smyth EM, Fitzgerald GA. Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm*. 2002;65:149–65.
152. Nasrallah R, Hébert RL, He RL. Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2005;289:235–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006589>
153. Rosenkranz B, Fischer C, Reimann I, Ke W, Beck G, Jc F. Identification of the major metabolite of prostacyclin and 6-ketoprostaglandin F₁ alpha in man. *Biochim Biophys Acta*. 1980;619(2):207–13.
154. Benigni A, Chiabrando C, Piccinelli A, Perico N, Gavinelli M, Furci L, et al. Increased urinary excretion of thromboxane B₂ and 2,3-dinor-TxB₂ in cyclosporin A nephrotoxicity. *Kidney Int*. Elsevier Masson SAS; 1988;34:164–74.
155. Kaplan R, Aynedjian HS, Schlondorff D, Bank N. Renal vasoconstriction caused by short-term cholesterol feeding is corrected by thromboxane antagonist or probucol. *J Clin Invest*. 1990;1707–14.
156. Levin G, Duffin KL, Obukowicz MG, Hummert SL, Fujiwara H, Needleman P, et al. Differential metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E₁ and prostaglandin E₂. *Biochem J* [Internet]. 2002;365(2):489–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222686/><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC1222686/pdf/11939906.pdf>

157. Horrobin DF. The regulation of prostaglandin biosynthesis: negative feedback mechanisms and the selective control of formation of 1 and 2 series prostaglandins: relevance to inflammation and immunity. *MedHypotheses*. 1980;687–709.
158. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22254–66.
159. 17-trans-PGF3 α [Internet]. Bertin Pharma. Available from: <http://bioreagent.bertinpharma.com/pr19125/17-wbr-em-trans-em-prostaglandin-f-sub-3-sub>
160. Prostaglandin F [Internet]. CaymanChem. Available from: <https://www.caymanchem.com/product/16995>
161. Tanaka N, Yamaguchi H, Mano N. Transport of eicosapentaenoic acid-derived PGE3, PGF3 α , and TXB3 by ABCC4. *PLoS One*. 2014;9(10).
162. Tang S, Sheerin NS, Zhou W, Brown Z, Sacks SH. Apical proteins stimulate complement synthesis by cultured human proximal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 1999;10(1):69–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890311>
163. Morais C, Westhuyzen J, Metharom P, Healy H. High molecular weight plasma proteins induce apoptosis and Fas / FasL expression in human proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transpl*. 2005;20:50–8.
164. Schreiner G. Renal toxicity of albumin and other lipoproteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1995;4:369–73.
165. Tang S, Leung JCK, Abe K, Chan KW, Chan LYY, Chan TM, et al. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 2003;111(4):515–27.
166. Sacristán PG, Ortega AO, Sánchez TM, Bayo MP, Manuel J, Moratalla O. Estudio de la función renal a largo plazo en 53 pacientes con nefrectomía por diversas causas. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2005;125(3):81–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1157/13076738>
167. Cerdán Morales JM, Domínguez Gil B, Alexandru S, Martínez A, Bengoa I, Ruizdelgado FC, et al. Hepatopatía postrasplante renal. *Nefrología* [Internet]. 2010;80. Available from: <http://www.revistanefrologia.com/en-monografias-nefrologia-dia-articulo-hepatopatia-postrasplante-renal-69>
168. Rocha PN, Carvalho EM. Prostanoids modulate inflammation and alloimmune responses during graft rejection. *Brazilian J Med Biol Res*. 2005;38:1759–68.

169. Guijas C, Astudillo AM, Gil-De-Gómez L, Rubio JM, Balboa MA, Balsinde J. Phospholipid sources for adrenergic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages. Comparison with arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2012;1821(11):1386–93.
170. Pérez Fontán M, Rodríguez-Carmona A, García Falcón T, Valdés F. Early proteinuria in renal transplant recipients treated with cyclosporin. *Transplantation* [Internet]. 1999;67(4):561–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10071028>
171. Oppenheimer F, Aljama P, Asensio Peinado C, Bustamante Bustamante J, Crespo Albiach JF, Guirado Perich L. The impact of donor age on the results of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(33):11–5.
172. Andrés A, Herrero JC, Praga M, Segura J, Morales JLRJM. Trasplante renal con donantes de edad avanzada. *Nefrología*. 1998;18(4):50–8.
173. Alexander JW, Bennett LE, Breen TJ. Effect of donor age on outcome of kidney transplantation. *Transplantation* [Internet]. 1994;57(6):871–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8154034>
174. HALLORAN PF, MELK A, BARTH C. Rethinking Chronic Allograft Nephropathy: The Concept of Accelerated Senescence. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(1):167–81.
175. ¿Qué es tiempo de isquemia fría? [Internet]. Universidad de Navarra. 2017. Available from: <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/tiempo-isquemia-fria>
176. Platts SH, Linden J, Duling BR. Rapid modification of the glycocalyx caused by ischemia-reperfusion is inhibited by adenosine A2A receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2003;284(6):2360–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560210>
177. Coronado M, Vega S, Gutiérrez R, García B, Díaz G. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. *REB*. 2006;25(3):72–9.
178. Castillo R, Huerta P, Carrasco R, Rodrigo R. Estrés oxidativo y daño renal. *CIMEL*. 2003;8(1):43–52.



Original article

Potential applications of lipid peroxidation products – F₄-neuroprostanes, F₃-neuroprostanes_{n-6} DPA, F₂-dihomo-isoprostanes and F₂-isoprostanes - in the evaluation of the allograft function in renal transplantation



Ignacio De las Heras-Gómez^a, Sonia Medina^b, Teresa Casas-Pina^{a,*}, Lidia Marín-Soler^b, Anna Tomás^b, Pedro Martínez-Hernández^a, Camille Oger^d, Jean-Marie Galano^d, Thierry Durand^d, Luisa Jimeno^c, Santiago Llorente^c, Elena Lozoya^a, Federico Ferreres^b, Ángel Gil-Izquierdo^{b,*}

^a Clinical Analysis Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena, s/n, 30120, El Palmar, Murcia, Spain

^b Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), P.O. Box 164, 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain

^c Nephrology Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena, s/n, 30120, El Palmar, Murcia, Spain

^d Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 - CNRS - University of Montpellier - ENSCM, Faculty of Pharmacy, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Renal transplant
Renal rejection
UHPLC-QqQ-MS/MS
Oxidative stress
Dihomo-isoprostanes
Neuroprostanes
Free radicals
Urine
Biomarkers

ABSTRACT

F₄-neuroprostanes, F₃-neuroprostanes_{n-6} DPA, and F₂-dihomo-isoprostanes, metabolites of non-enzymatic lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids [docosahexaenoic acid, n-6 docosapentanoic acid, and adrenic acid respectively], have become important biomarkers for oxidative stress in several diseases like epilepsy and alzheimer. These biomarkers and the 15-F_{2t}-isoprostane (also known as 8-iso-PGF_{2α}), a F₂-isoprostane isomer measured as reference oxidative marker at systemic level, were analyzed by UHPLC-QqQ-MS/MS in the urine of 60 renal recipients from cadaveric donors of the Nephrology Unit of the University Hospital Virgen de la Arrixaca, at six different times during the first six months after renal transplantation, and were compared with a control group of 60 healthy subjects from the same hospital. A total of 11 metabolites were analyzed and different patterns were observed. A tendency to decrease was observed in three metabolites (4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP_{n-6} DPA, *ent*-7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP, and *ent*-7(*S*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP) and in our reference oxidative marker (15-F_{2t}-IsoP) when kidney function improved and the excretion of urine proteins decreased. These results suggest that these three biomarkers of oxidative stress could be useful to assess renal function in the posttransplant phase. Unfortunately, little is known about this kind of biomarker in this cohort of patients, so further investigation would be required in the clinical field to clarify the relationship between oxidative stress and the graft function, as well as the usefulness of these biomarkers as rejection markers.

1. Introduction

Kidney transplantation is considered the best available treatment for patients with end-stage renal disease. In recent decades, there has been an increased demand for this kind of transplantation. This can be attributed to the increasing number of patients with this pathology - which may result from chronic diseases such as metabolic disorders, diabetes mellitus, and hypertension [1], as a result of the new lifestyle acquired in western countries.

Although short-term renal allograft survival has recently increased

due to new immunosuppressive therapies, allograft renal rejection is still one of the most important complications after renal transplantation, directly leads to allograft loss, and is detrimental to long-term survival. Graft rejection is a complex pathophysiological process that requires analyses at different levels for its complete understanding [2] and undermines the full benefits of the transplant [3]. Consequently, timely detection and treatment of rejection is an important goal in the posttransplant surveillance.

The standard care with serum creatinine (CrS) measurements and biopsy upon allograft dysfunction implies that rejection is detected at

Abbreviations: CrS, Serum creatinine; OS, Oxidative stress; ROS, Reactive oxygen species; UHPLC-QqQ-MS/MS, Ultra High Pressure Liquid Chromatography-triple quadrupole-Tandem Mass Spectrometry; F₃-NeuroPs_{n-6} DPA, F₃-Neuroprostanes_{n-6} DPA; F₄-NeuroPs, F₄-Neuroprostanes; F₂-dihomo-IsoPs, F₂-dihomo-isoprostanes; n-6 DPA, n-6 docosapentanoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid; AdA, Adrenic acid; 15-F_{2t}-IsoP, 15-F_{2t}-isoprostane (8-iso-PGF_{2α}); eGFR, Estimated Glomerular Renal Filtration; BUN, Blood Urea Nitrogen; Albs, Serum Albumin; Hct, Hematocrit levels; Prot/Creat ratio, Protein/creatinine ratio; ISE, Internal standard element; BTR, Below test range; LOD/LOQ, Limit of detection and/or quantification

* Corresponding author.

E-mail addresses: tcasaspina@gmail.com (T. Casas-Pina), angelgil@cebas.csic.es (Á. Gil-Izquierdo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.019>

Received 25 July 2016; Received in revised form 1 January 2017; Accepted 12 January 2017

Available online 12 January 2017

0891-5849/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

an advanced stage. CrS concentrations are dependent upon age, gender, muscle mass, medication, and hydration status and may not be altered until a significant amount of kidney function is lost [4]. Therefore, the measurement of only the CrS as the gold standard marker of kidney function carries the risk of missing an important therapeutic window because of the time lag between the inciting insult and the diagnostic elevation of creatinine. On the other hand, biopsy is an invasive procedure and, although it has become safer and its interpretation more standardized [5], bleeding and subsequent graft loss still occur, while sampling errors and interobserver variability in biopsy reading remain problematic.

Metabolomics, a relatively new tool for the investigation of metabolic changes, is concerned with the high throughput measurement of all the small-molecule metabolites in the metabolome of a system [6]. This capacity to measure hundreds of thousands of important metabolites quickly has opened the door to many potential applications in a large number of areas, including plant research [7], nutrition [8], pharmaceutical research [9], cardiovascular disease [10], and organ transplantation [11].

Metabolites measurements have been part of organ transplant monitoring for more than 60 years [12]. While most measurements have been restricted to just a few well known compounds - such as creatinine, glucose, and urea - there is a large body of lesser known metabolites involved in pathophysiological process which remain to be discovered.

Oxidative stress (OS) is a biochemical state in which reactive oxygen species (ROS) are generated and it has been associated with several pathological states, including renal transplantation [13]. The ROS are extremely unstable and highly reactive metabolites, which makes them difficult to detect *in vivo*. Oxidative damage in humans can be measured as the oxidation of different biomolecules - such as lipids, proteins, or nucleic acids - using metabolomics tools. In particular, lipidomics (targeted metabolomics) might be used with the hope of both identifying a biomarker of lipid oxidation that could reflect kidney function and, in the future, seeking its involvement in rejections, thereby trying to avoid the high risk associated with the graft biopsy.

Using a Ultra High Pressure Liquid Chromatography-triple quadrupole-Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-QqQ-MS/MS), we measured F₃-neuroprostanes *n*-6 DPA (F₃-NeuroPs *n*-6 DPA), F₄-neuroprostanes (F₄-NeuroPs), and F₂-dihomo-isoprostanes (F₂-dihomo-IsoPs), biomarkers of the non-enzymatic lipid peroxidation of *n*-6 docosapentaenoic acid (*n*-6 DPA), docosahexaenoic acid (DHA), and adrenic acid (AdA), respectively. Furthermore we measured the 15-F_{2t}-isoprostane (15-F_{2t}-IsoP or also known as 8-iso-PGF_{2α}), derived from arachidonic acid, as reference oxidative marker at systemic level.

Thus, the main aim of our study was to evaluate the changes in the evolution of these metabolites of lipid peroxidation during the short-term posttransplantation period, in comparison with a healthy group, in order to identify potential biomarkers of prognosis and their applications in the evaluation of graft function after transplantation.

2. Subjects and methods

2.1. Selection of study participants

In a prospective longitudinal study between October 2013 and May 2015, we followed up 60 kidney transplant recipients from the Nephrology Unit of the University Hospital Virgen de la Arrixaca, aged between 16 and 72 years old. Sixteen of them were excluded from the final data analysis since the technicians could not collect blood and urine samples in a timely manner because of missed clinic appointments, two of them died, and another one had an acute cellular rejection with allograft loss, leaving a final study population of 41 patients. Forty-eight percent of them suffered delayed kidney function after the transplant and 13 were biopsied because of a worsening renal function. Those patients with acute illnesses or a previous renal

transplant were excluded from the study. All the transplanted kidneys were from cadaveric donors: 46 died from cerebrovascular accidents and 14 from traumatic brain injury. Every patient selected received anticalcineurinic drugs, steroids, and mycophenolate mofetyl as immunosuppressive therapy. In addition, we recruited 60 healthy subjects from the same hospital, aged between 24 and 67 years old. All patients gave written informed consent for the experiment and the study was approved by the Bioethics Committee of the University Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia, Spain), and the research was carried out in compliance with the Declaration of Helsinki [14].

2.2. Blood samples

Blood samples were collected from the patients group at six different times after transplantation: five days post transplant, ten days post transplant, and at clinic visits at one month post transplant, two months post transplant, three months post transplant, and six months post transplant, according to the renal-transplant clinic schedules. From the control group, only one blood sample was collected. Venous blood was drawn into Vacutainer tubes (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) containing ethyldiaminetetraacetic acid, for whole blood, and into serum separator tubes for serum.

Hematological parameters were immediately determined using an XE-5100 automatic analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). The serum in the tubes was allowed to clot at room temperature before centrifugation. The tubes were centrifuged at 4 °C, at 2500 rpm, for 10 min. Biochemical parameters were measured in the serum by colorimetric and turbidimetric assays, in a Cobas 8100 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), performed according to the manufacturer's instructions [15]. For the evaluation of renal function we used: CrS, estimated Glomerular Renal Filtration (eGFR) by the MDRD equation, and Blood Urea Nitrogen (BUN). Moreover, the Serum Albumin (AlbS) and Hematocrit levels (Hct) were considered for the evaluation of nutritional status.

2.3. Urine sampling

First-morning urine samples were collected from the patients group at the six different and consecutive posttransplant moments. From the control group, only one first-morning urine sample was collected. They were collected in sterile, dark polystyrene pots with screw caps. The urine samples from all patients and the control group were centrifuged, aliquoted into Eppendorf tubes, and stored at -80 °C. To standardize the results, we measured first-morning creatinine and protein levels by colorimetry in a Cobas 8100 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions [15], and we calculated the protein/creatinine ratio (Prot/Creat ratio). The urinary excretion of F₄-NeuroPs, F₃-NeuroPs_{*n*-6 DPA}, and F₂-dihomo-IsoPs was analyzed using the method described below. This method pointed out the importance of enzymatic hydrolysis of the urine samples, since F₄-NeuroPs, F₃-NeuroPs_{*n*-6 DPA}, and F₂-dihomo-IsoPs are excreted in urine as glucuronide and sulfate conjugates [16]. On the other hand, we measured the concentration of 15-F_{2t}-IsoP, in order to compare its evolution with F₄-neuroprostanes, F₃-neuroprostanes_{*n*-6 DPA} and F₂-dihomo-isoprostanes. This F₂-isoprostane isomer is the most frequently metabolite measured in the clinical assays, for this reason, it used as the oxylipin reference compound for a lot of types of pathophysiological disorders.

2.4. Chemicals and reagents

Nine NeuroPs - 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP_{*n*-6 DPA}; 4-F_{3t}-NeuroP_{*n*-6 DPA}; 4-(RS)-F_{4t}-NeuroP; 4-F_{4t}-NeuroP; 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP; 10-F_{4t}-NeuroP; d₄-4-(RS)-F_{4t}-NeuroP (Internal standard element (ISE 1); d₄-10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP (ISE 2); and d₄-10-F_{4t}-NeuroP (ISE 3) - as well as four F₂-dihomo-IsoPs - 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo-IsoP; 17-F_{2t}-dihomo-

IsoP; *ent*-7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP; and *ent*-7(*S*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP - were synthesized by Durand's team at the Institute des Biomolécules Max Mosseron (IBMM) (Montpellier, France) [7–19]. The 15-F_{2t}-IsoP (8-iso-PGF_{2α}) were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA). The β-glucuronidase, type H2, from *Helix pomatia* and BIS-TRIS (Bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)-methane) used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All LC-MS grade solvents were obtained from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Chlorhydric acid was purchased from Panreac (Castellar del Vallés, Barcelona, Spain) and the Strata X-AW, 100 mg.3 mL⁻¹ solid phase extraction cartridges from Phenomenex (Torrance, CA, USA).

2.5. UHPLC-QqQ-MS/MS analysis of neuroprostanes and F₂-dihomo-isoprostanes

The separation and quantification of the F₄-NeuroPs, F₃-NeuroPs_{n-6 DPA}, and F₂-dihomo-IsoPs in the urine were performed using a UHPLC coupled with a 6460 QqQ-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), and the analytical method previously described [16]. The chromatographic separation was carried out on an ACQUITY BEH C₁₈ column (2.1 × 50 mm, 1.7 μm pore size) (Waters, MA, USA). The mass spectrometry analysis was performed by multiple reaction monitoring in the negative ionization mode. The mobile phases were solvent A (Milli-Q water/acetic acid, 99.99:0.01, v/v) and solvent B (methanol/acetic acid, 99.99:0.01, v/v). The flow rate was 0.2 mL min⁻¹ using a linear gradient scheme: (t; %B): (0.0; 60.00), (7.00; 70.00), (7.01; 90.00), (10.00; 90.00), (10.01; 60.00). The electrospray ionization conditions and ion optics were those previously described [16]. The separation and quantification of 15-F_{2t}-IsoP was performed by the analytical method previously described [20]. Data acquisition and processing were performed using MassHunter software version B.04.00 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The metabolites concentrations were calculated from standard curves freshly prepared each day.

2.6. Statistical analyses

Quantitative data are presented as the median and interquartile range for non-normally distributed data, and as the mean and standard deviation for normally distributed data. Each metabolite measured was analyzed after normalization with urinary creatinine and expressed as ng mg creatinine⁻¹. The analyses of the different variables at the different posttransplant moments were performed using the Wilcoxon test. The comparison of groups at each evaluation was performed using Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests. The correlations among the study variables were performed by the Spearman rank-order correlation. For continuous variables, univariate comparisons of the study population and healthy controls were carried out using the Mann–Whitney *U* test. The statistical analyses were performed using the SPSS 15.0 software package (LEAD Technologies Inc., Chicago, USA) and the level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Biochemical parameters evolution

In Table 1 the values of the different parameters measured at the six posttransplant moments, for the evaluation of kidney function and nutritional status, are shown.

In this study, we compared the biochemical parameters measured for the evaluation of allograft function at each moment with the consecutive one and we expected changes in their evolution. Thus, the serum levels of CrS and MDRD improved significantly between 5 and 10 days post transplant and between 10 days and 1 month post transplant ($P < 0.05$ for all), with a maximum for MDRD and a

minimum for CrS at 6 months post transplant. Although BUN decreased progressively at the six different moments after transplantation, we only found a significant difference between 10 days and 1 month post transplant ($P < 0.001$). The reduction between the others consecutive moment was not statistically significant ($P > 0.05$). The Prot/Creat ratio in urine decreased between 5 days and 3 months post transplant, with significant differences between 5 and 10 days post transplant and 10 days and 1 month post transplant ($P < 0.05$ for all), and with a minimum at 3 months post transplant. In addition we observed a significant increases for AlbS and Hct between 10 days and 1 month post transplant, and between 1 and 2 months post transplant ($P < 0.05$ for all), with a maximum for both at 6 months post transplant.

When we compared the study variables between 5 days and 6 months post transplant (corresponding to the worst and best eGFR, respectively), we observed significant differences in all the biochemical parameters measured ($P < 0.001$ for all).

3.2. Metabolites in renal recipients and healthy subjects

Concerning the qualitative profiles of the OS biomarkers of the healthy and renal transplant patients of this study, NeuroPs were mainly detected in renal recipients and not in healthy subjects, because they were present at very low levels, below the limit of detection and/or quantification (LOD/LOQ). In the control group, we only detected one NeuroP, 4-F_{3t}-NeuroP_{n-6 DPA}, but we didn't detect its 4-epimer, 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP_{n-6 DPA}, maybe due to the higher LOD/LOQ that we obtained in our assay [16]. The F₂-dihomo-isoprostanes were detected in patients and healthy subjects. So, we compared the study variables in the 41 renal recipients between five days and 6 months post transplant, (corresponding to the worst and best eGFR, respectively), and with those of healthy subjects. When a comparison was developed at five days post transplant with the control group, the patients showed significantly higher levels of *ent*-7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP ($P < 0.05$) and significantly lower levels of 4-F_{3t}-NeuroP_{n-6 DPA} ($P < 0.05$), 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo-IsoP ($P < 0.01$), 17-F_{2t}-dihomo-IsoP ($P < 0.001$), and *ent*-7(*S*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP ($P < 0.001$). At 6 months post transplant, significantly lower levels of 4-F_{3t}-NeuroP_{n-6 DPA} ($P < 0.05$), 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo-IsoP ($P < 0.05$), 17-F_{2t}-dihomo-IsoP ($P < 0.05$), and *ent*-7(*S*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP ($P < 0.001$) were detected in the patients. Furthermore, *ent*-7(*RS*)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP did not differ significantly between renal recipients and healthy subjects at 6 months posttransplant (Fig. 1).

3.3. Qualitative and quantitative profiles of F₄-NeuroPs, F₃-NeuroPs_{n-6 DPA}, and F₂-dihomo-isoprostanes in the transplant recipients

Eleven metabolites were analyzed in the urine of the volunteers. Their identification was carried out according to their molecular mass, tandem mass spectrometry fragmentation pattern, and retention time.

For three of the F₄-NeuroPs from DHA measured, 4(*RS*)-F_{4t}-NeuroP, 4-F_{4t}-NeuroP, and 10-F_{4t}-NeuroP, we observed oscillations at the different moments and no correlation with renal function. On the other hand, 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP, the other F₄-NeuroP derived from this fatty acid, increased over the posttransplant stage. However, there were no statistically significant differences when comparing the concentrations of 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP at the different consecutive moments ($P > 0.05$ for all the comparisons) or when comparing day 5 and month 6 post transplant ($P = 0.182$) (Fig. 2).

The F₃-NeuroPs_{n-6 DPA} metabolites derived from *n*-6 DPA, differed in their evolution over the six posttransplant moments. For example, 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP_{n-6 DPA} decreased in a concomitant manner with the improvement of the kidney function, with a minimum at 6 months post transplant - which showed the best glomerular filtration and the minimum Prot/Creat ratio. Despite this progressive decline, we did not find statistically significant differences when we compared the concentrations of this NeuroP between different consecutive moments

Table 1
Evolution of biochemical parameters for six moments after transplantation.

	Five days posttransplant	Ten days posttransplant	One month posttransplant	Two months posttransplant	Three months posttransplant	Six months posttransplant	Healthy subjects
CrS (mg dL ⁻¹)	4.75 (2.40–6.03)	3.29 (2.01–5.33)	1.76 (1.64–2.22)	1.67 (1.55–1.97)	1.72 (1.56–2.07)	1.61 (1.42–2.06)	0.81 (0.73–0.93)
MDRD(mL/min/1.73 m ²)	13.71 (9.01–30.42)	19.81 (10.12–34.71)	41.04 (31.51–48.92)	40.54 (35.91–51.79)	41.42 (33.94–51.56)	45.91 (34.52–55.50)	88.50 (69.31–112.12)
BUN (mg dL ⁻¹)	141.00 (88.50–182.50)	168.00 (96.02–214.58)	71.50 (54.57–103.33)	66.54 (50.71–85.02)	68.07 (52.04–99.56)	61.01 (46.02–85.55)	31.00 (23.50–39.56)
Prot/creat ratio (mg g ⁻¹ creat)	827.42 (507.03–2441.05)	295.22 (205.25–943.02)	167.81 (128.03–248.52)	156.81 (95.12–312.41)	146.46 (84.58–280.16)	146.54 (81.56–279.62)	BTR
Albs (g dL ⁻¹)	3.40 (3.00–3.80)	3.50 (3.20–3.78)	4.10 (3.65–4.45)	4.25 (3.98–4.53)	4.40 (4.15–4.60)	4.50 (4.10–4.63)	4.54 (4.12–4.96)
Hct (%)	30.82 (28.01–34.52)	29.92 (27.21–34.36)	34.34 (30.82–39.63)	37.77 (33.42–41.71)	40.12 (36.83–43.96)	40.74 (36.55–45.91)	42.92 (40.41–47.12)

Data are presented as median and (interquartile range). BTR (Below test range). CrS (Serum creatinine). Urea Nitrogen (BUN). Prot/creat ratio (Protein/creatinine ratio). Serum Albumin (Albs) and Hematocrit levels (Hct).

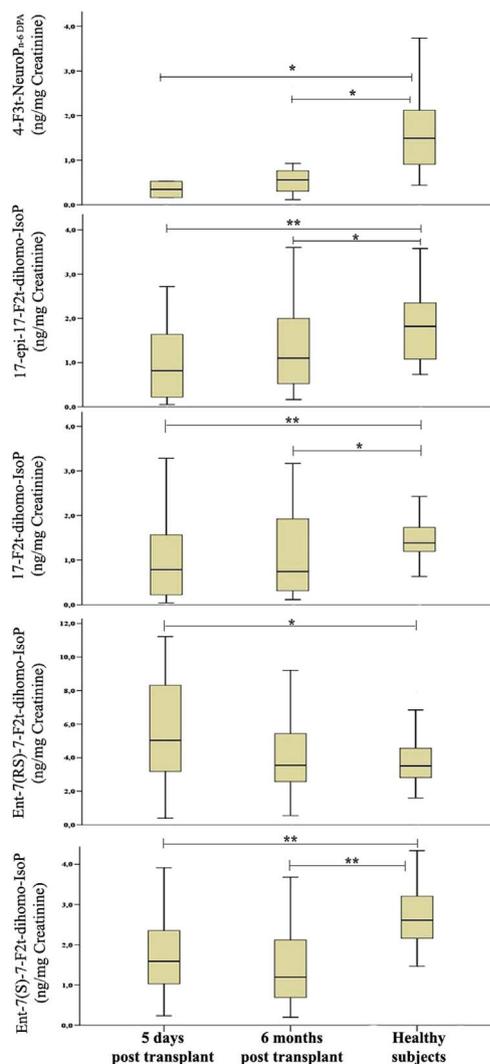


Fig. 1. Comparison at 5 days and 6 months post transplant with healthy subjects. Outlier data points were removed.

($P > 0.05$ for all the comparisons), but we found a significant decrease when we compared it at 5 days and six months post transplant ($P = 0.01$). 4-F_{3t}-NeuroP_{n-6 DPA}, the other F₃-NeuroP_{n-6 DPA} measured, did not have a defined pattern, with oscillations at the different moments and without correlation with renal function. The concentrations of this metabolite were similar at the beginning and end of the

study ($P = 0.655$) (Fig. 2).

In relation to the F₂-dihomo-IsoPs, OS biomarkers of AdA, two different patterns emerged. On the one hand, 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo-IsoP and 17-F_{2t}-dihomo-IsoP presented increases and decreases, with no correlation with renal function; on the other hand, we found a tendency of the amounts of *ent*-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP and *ent*-7(S)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP to decrease during the posttransplant period with a minimum at 3 months post transplant. We compared their concentrations at 5 days and 6 months post transplant, and we found only a trend to decrease ($P = 0.072$ and $P = 0.162$, respectively), but when we compared their concentrations at 5 days and 3 months post transplant, corresponding to the highest and the lowest protein/creatinine ratios respectively, a significant decrease in both metabolites was observed ($P < 0.05$ for both) between these moments (Fig. 2.). Therefore, the *ent*-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP and *ent*-7(S)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP concentrations decreased as renal function improved.

The 15-F_{2t}-IsoP, the F₂-isoprostane isomer measured as reference oxidative marker at systemic level, showed a tendency to decrease during the posttransplant period such as it was detected for the other metabolites. However, there was no statistically significant difference when comparing its concentrations at the different consecutive moments ($P > 0.05$ for all the comparisons). When we compared its amount at day 5 (83,3 ng mg creatinine⁻¹) and month 6 post transplant (62,6 ng mg creatinine⁻¹) only a trend to decrease ($P = 0.170$) was underlined.

When we examined the relationships between the metabolites, F₄-NeuroPs, F₃-NeuroPs_{n-6 DPA}, F₂-dihomo-IsoPs and 15-F_{2t}-IsoP, and eGFR at the six different moments after renal transplantation, no conclusive outcomes were observed.

Among the metabolites and the protein/creatinine ratio at the six different moments after renal transplantation, there were several significant correlations for 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP_{n-6 DPA}: at 1 month post transplant ($r_s = 0.534$; $P < 0.02$), at 2 months post transplant ($r_s = 0.52$; $P = 0.02$), and at 6 months post transplant ($r_s = 0.51$; $P < 0.01$). At 3 months post transplant, there was a slight relationship ($r_s = 0.237$; $P < 0.123$), and at 5 and 10 days post transplant, no correlation with urinary protein excretion was detected. For *ent*-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP we only found a significant correlations at 1 month post transplant ($r_s = 0.533$; $P = 0.02$), and for *ent*-7(S)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP at 2 months post transplant ($r_s = 0.362$; $P = 0.035$). For our reference metabolite, 15-F_{2t}-IsoP, we detected a significant correlation at 3 months post transplant ($r_s = 0.464$; $P < 0.05$), and at 6 months post transplant ($r_s = 0.612$; $P < 0.02$).

Furthermore, we separated the transplantation group, depending on the protein/creatinine ratio, into two groups, group A₁ for patients with a ratio < 30 mg/g and group A₂ for patients with a ratio > 30 mgg⁻¹, and we found no differences between the two groups.

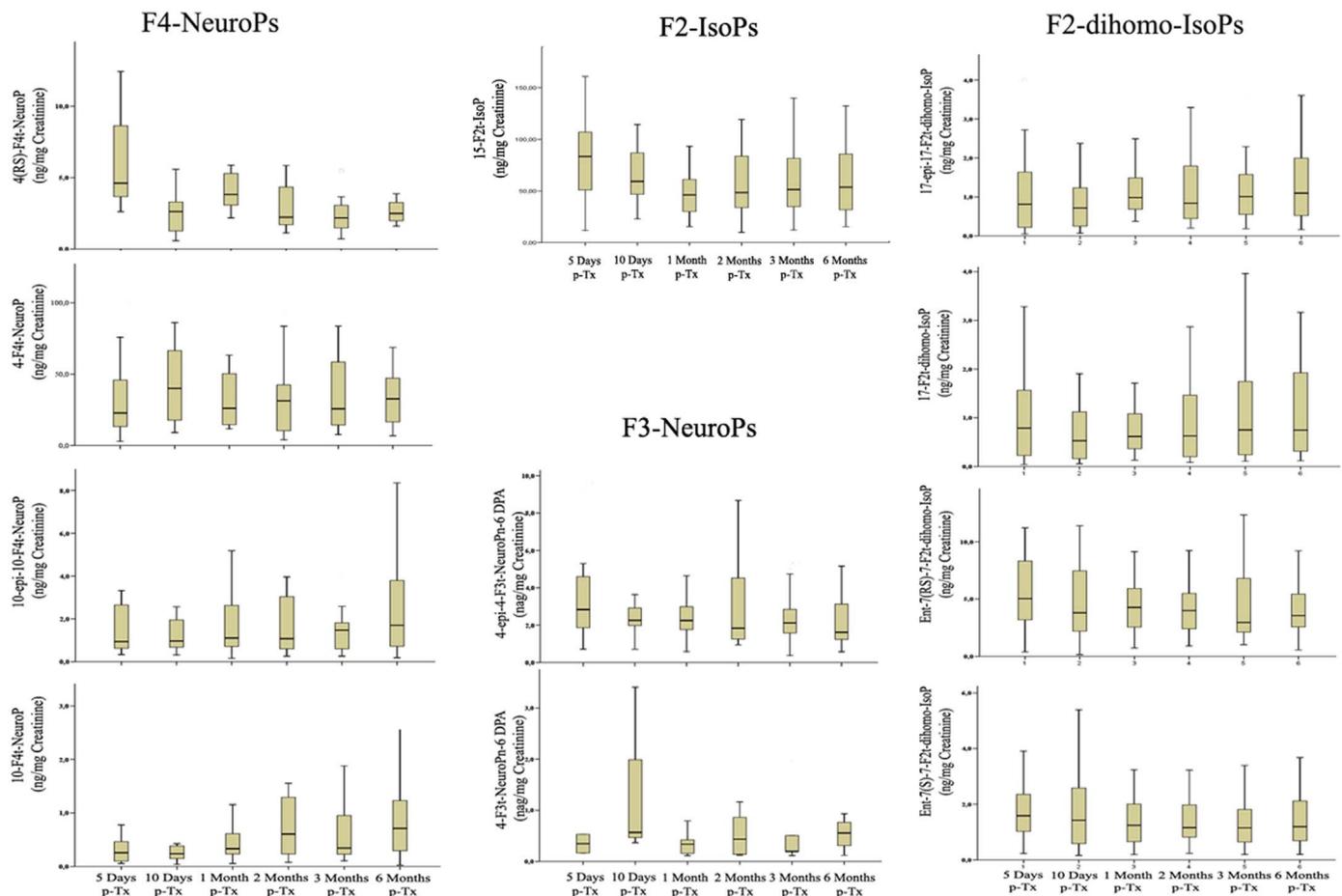


Fig. 2. F4-NeuroPs, F₂-IsoPs, F₃-NeuroPs and F₂-Di-homo-IsoPs evolution in the different posttransplant moments. Outlier data points were removed. p-Tx: posttransplant.

4. Discussion

The current lifestyle of Western societies is causing an increase in the incidence of metabolic disorders [1] that trigger long-term chronic diseases such as chronic renal failure. The best treatment of this disease is a kidney transplant, since it improves the patient's quality of life and decreases the numerous complications associated with dialysis [21]. The rejection of the transplanted organ is one of the most serious complications of this kind of treatment and the graft prognosis gets worse in the long-term, sometimes causing its complete loss. Although this complication is becoming increasingly rare, thanks to new immunosuppressants, it remains a fact among kidney transplant recipients [2].

The rejection of a solid organ is a complex pathophysiological process that goes beyond the immunological rejection and to which many factors contribute [1], including OS [13]. An oxidative imbalance, caused by an increase in the generation of ROS, and a decreased ability to restore the redox balance of the body produce negative effects in cells, worsening their function and shortening life expectancy [22].

This adverse effect of OS on cells is partly due to the destruction of fatty acids that make up the cell membrane, such as DHA, *n*-6 DPA, and AdA [23]. Three of the major targets of the lipid peroxidation process are the brain, kidney, and liver. Thus, the toxicity of lipid peroxidation products in mammals generally involves neurotoxicity, nephrotoxicity, and hepatotoxicity [24]. Additionally, the kidney is very vulnerable to ROS damage because renal lipids are composed of an abundance of long-chain polyunsaturated fatty acids. The kidneys are a site of both the production and clearance of these metabolites, so the best way to explore their production in kidney diseases is through urine samples. Some recent studies related OS to kidney damage [25], but few of them

investigated the OS effect on kidney development after a kidney transplant. Thus, we have studied the OS effect on kidney function by determination of fatty acids metabolites generated by ROS action. In addition, after a thorough bibliographic review, we have not found an article which describes the monitoring of this specific type of metabolite in these patients.

In this regard, OS evaluation in patients receiving transplants has been carried out by monitoring four F₄-NeuroPs, two F₃-NeuroPs_{*n*-6 DPA}, and four F₂-dihomo-IsoPs at six different established times, which highlighted differences in their behaviors.

Focusing on the F₄-NeuroPs, metabolites produced from *n*-3 DHA by OS, all of them were detected only in patients receiving transplants. This shows that these metabolites were produced in higher concentrations than in the control group due to the increased inflammation and OS that this kind of patient exhibits, as observed by Lauzurica et al. [26]. 4(RS)-F_{4t}-NeuroP, 4-F_{4t}-NeuroP, and 10-F_{4t}-NeuroP did not follow a distinct pattern, showing increases and decreases that did not correspond to the kidney function; however, 10-epi-10-F_{4t}-NeuroP -the other NeuroP derived from *n*-3 DHA- showed a non-significant tendency to increase as time elapsed after the operation. We did not expect this tendency as the posttransplant phase progressed, which could reflect some specific pathophysiological mechanism of transplanted organ damage. Clinical appearances of chronic rejection are not noticeable until the existence of an advanced alteration of glomerular structure. Thus, the long-term urinary excretion of this F₄-NeuroP has to be studied in order to establish the relationship between its increase and the chronic rejection of the graft.

The F₃-NeuroPs_{*n*-6 DPA}, 4-epi-4-F_{3t}-NeuroP_{*n*-6 DPA} and 4-F_{3t}-NeuroP_{*n*-6 DPA}, produced from the breakdown of *n*-6 DPA by OS, didn't follow a common pattern. So, 4-F_{3t}-NeuroP_{*n*-6 DPA} increased

and decreased, with no correlation with the kidney function of patients, and showed no differences in concentration between the beginning and the end of the study. Moreover, this metabolite was the only one found in healthy patients, for some of whom it occurred at higher concentrations: this needs to be studied thoroughly, to have a better understanding of the metabolism of this biomarker.

On the other hand, 4-*epi*-4-F_{3 α} -NeuroP_{n-6} DPA was detected only in transplant patients, and its level clearly dropped as kidney function improved, with no significant differences in its concentration at different consecutive moments - whereas we found a significant decrease when comparing the worst and best moments regarding kidney function: 5 days and 6 months post transplant, respectively. In addition, significant and positive correlations were discovered for the 4-*epi*-4-F_{3 α} -NeuroP_{n-6} DPA concentration and Prot/Creat ratio at 1 month, 2 months and 6 months post transplant, as well as a slight relationship at 3 months post transplant. For 5 and 10 days post transplant, no correlation with urinary protein excretion was detected, probably because this parameter is not assessable in the first four weeks posttransplant. We assigned the decrease in the urinary level of 4-*epi*-4-F_{3 α} -NeuroP_{n-6} DPA, which depended on both the posttransplant period and the renal function improvement, to decreased OS in the kidney and to decreased proteinuria when the graft function after the ischemia period suffered at the time of the transplant become steady. The positive correlation between the Prot/Creat ratio and the 4-*epi*-4-F_{3 α} -NeuroP_{n-6} DPA concentration could be explained by increased oxygen consumption by nephron cells when protein charge increases due to absorption process [27,28]. Urinary albumin, the main globular protein in proteinuria, is reabsorbed by endocytosis that is mediated by the proximal tubular scavenger receptors megalin, cubilin, and CD36 [9–33]. Subsequently, these receptor-albumin complexes activate protein kinase C signaling pathways, which lead to NAD(P)H oxidase-mediated ROS generation [34,35]. Thus, the lower the proteinuria the lower the concentration of ROS in proximal tubular cells; these species are among the most toxic cellular factors that directly induce tubule interstitial injury.

In the same sense, the reduction of urinary proteins excretion between the start and the end of the study might be due to the fact that during the transplant, and because of the ischemia-reperfusion phenomenon, in over 90% of transplant patients acute tubular necrosis and a variation of endothelial glycocalyx in the glomerular capillaries happened [36,37]. These variations involved an increase in proteins filtration that usually would be restored. The longer the ischemia period of the organ, the greater the glomerular damage by OS since the antioxidant defence mechanisms of kidney tissue, such as reduced glutathione and vitamin E, were weakened. Hence, the progressive restoration of the necrosis and endothelial damage suffered during transplantation decreased albumin filtration and subsequent reabsorption, with a reduction in ROS levels and therefore decreased damage by OS in proximal tubular cells.

Furthermore, F₂-dihomo-IsoPs, AdA derived metabolites, reflect the breakdown of this fatty acid by OS in the renal cortex and renal medulla [38,39]. This degradation reduces the concentration-dependent function of AdA on maintenance of vascular tone in renal and adrenal circulation, as Zhang et al. observed [39]. Its subsequent breakdown would cause incorrect vascularization of kidney tissue, disrupting its function and decreasing the life expectancy of the graft. We studied four metabolites which were detected in both transplant patients and healthy individuals. Three of them, 17-*epi*-17-F_{2 α} -dihomo-IsoP, 17-F_{2 α} -dihomo-IsoP, and *ent*-7(S)-7-F_{2 α} -dihomo-IsoP were always detected at lower concentrations in transplant patients. This could be explained by the treatment. Kidney transplant patients in our institution are given high doses of corticosteroids. This therapeutic group has a wide range of effects and one of them is the phospholipase A2 inhibition. [40]. Unlike conventional prostanoids, these isomers are formed by OS injury in cell membranes and subsequently released after phospholipase activation [41]. Therefore, the inhibition of the enzyme

decreases the concentration of AdA metabolites.

The metabolites 17-*epi*-17-F_{2 α} -dihomo-IsoP and 17-F_{2 α} -dihomo-IsoP increased and decreased with no correlation with the allograft function. The other two metabolites of AdA studied, *ent*-7(RS)-7-F_{2 α} -dihomo-IsoP and *ent*-7(S)-7-F_{2 α} -dihomo-IsoP, decreased as kidney function improved and urinary proteins excretion decreased, with a minimum for both at 3 months post transplant - which coincided with the lowest proteinuria value. However, we only found a significant correlation between this metabolites and urinary proteins excretion at one of the six moments measured. The concentration of *ent*-7(S)-7-F_{2 α} -dihomo-IsoP was always lower in transplant patients with respect to *ent*-7(RS)-7-F_{2 α} -dihomo-IsoP. The *ent*-7(RS)-7-F_{2 α} -dihomo-IsoP concentration was clearly higher in transplant patients at the beginning of the posttransplant phase, and at 6 months post transplant was similar for both groups. The decline in these two biomarkers shows how OS decreased as renal function improved. This finding could be used for monitoring of the kidney function. Moreover, these compounds should be studied in detail in acute rejection to see their possible predictive value in these events in which OS is increased [42].

On the other hand, our reference metabolite, 15-F_{2 α} -IsoP, provided a similar behavior than the three metabolites of our study which could be considered as candidate indicators to monitor transplanted kidney function: 4-*epi*-4-F_{3 α} -neuroprostane_{n-6} DPA, *ent*-7(RS)-7-F_{2 α} -dihomo-isoprostane, and *ent*-7(S)-7-F_{2 α} -dihomo-isoprostane. We observed than 15-F_{2 α} -IsoP decreased as kidney function improved and urinary proteins excretion decreased, and we discovered several positive correlations for the 15-F_{2 α} -IsoP concentration and Prot/Creat ratio. These outcomes have been discussed before for the other three metabolites.

5. Conclusions

The analysis of F₄-NeuroPs, F₃-NeuroPs_{n-6} DPA, and F₂-dihomo-IsoPs in human urine provides a powerful approach to advance our knowledge of the role of oxidative stress in kidney transplant patients. Among the 11 biomarkers of lipoperoxidation measured, four of them, 4-*epi*-4-F_{3 α} -neuroprostane_{n-6} DPA, *ent*-7(RS)-7-F_{2 α} -dihomo-isoprostane, *ent*-7(S)-7-F_{2 α} -dihomo-isoprostane, and 15-F_{2 α} -IsoP (8-iso-PGF_{2 α}) could be considered as candidate indicators to monitor transplanted kidney development in the short-term period after the surgical intervention. Unfortunately, little is known about these metabolites in this kind of patient and so more studies are needed to explain their influence on graft function and their possible ability to act as rejection predictors.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work has been partially funded by the “Fundación Séneca de la Región de Murcia” Grupo de Excelencia 19900/GERM/15. We are grateful to Dr. David Walker (native English speaker) for your reviews of the English grammar and style of the current report.

References

- [1] N. Arulkumaran, N.M. Annear, M. Singer, Patients with end-stage renal disease admitted to the intensive care unit: systematic review, *Br. J. Anaesth.* 110 (2013) 13–20.
- [2] Lu Xin, David L. Perkins, A systems biology view of allograft rejection, *Curr. Opin. Organ. Transpl.* 10 (2005) 28–34.
- [3] M. Tonelli, N. Wiebe, G. Knoll, et al., Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes, *Am. J. Transplant.* 11 (2011) 2093–2109.

- [4] D.N. Cruz, H.R. de Geus, S.M. Bagshaw, Biomarker strategies to predict need for renal replacement therapy in acute kidney injury, *Semin. Dial.* 24 (2011) 124–131.
- [5] W.W. Williams, D. Taheri, N. Tolkoff-Rubin, R.B. Colvin, Clinical role of the renal transplant biopsy, *Nat. Rev. Nephrol.* 8 (2012) 110–121.
- [6] D.S. Wishart, Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation, *Am. J. Transpl. Sci.* 5 (12) (2005) 2814–2820.
- [7] N. Schauer, A.R. Fernie, Plant metabolomics: towards biological function and mechanism, *Trends Plant. Sci.* 11 (2006) 508–516.
- [8] P.D. Whitfield, A.J. German, P.J. Noble, Metabolomics: an emerging postgenomic tool for nutrition, *Br. J. Nutr.* 92 (4) (2004) 549–555.
- [9] J.C. Lindon, E. Holmes, J.K. Nicholson, Metabolomics: systems biology in pharmaceutical research and development, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 6 (3) (2004) 265–272.
- [10] J.T. Brindle, H. Antti, E. Holmes, et al., Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H NMR-based metabolomics, *Nat. Med.* 8 (12) (2002) 1439–1444.
- [11] N. Serkova, T.F. Fuller, J. Klawitter, C.E. Freise, C.U. Niemann, H NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants, *Kidney Int.* 67 (3) (2005) 1142–1151.
- [12] J.R. Salaman, Monitoring of rejection in renal transplantation, *Immunol. Lett.* 29 (1–2) (1991) 139–142.
- [13] Saldaña Bernabeu Alberto, García Triana Bárbara Elena, Enamorado Casanova Antonio, García Piñeiro José Carlos, El estrés oxidativo en la fisiopatología del trasplante renal, *Rev. Cuba. Invest. Bioméd.* 18 (3) (1999) 225–230.
- [14] World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, WMA, (2008), pp. 1–5 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>.
- [15] E.J. Lamb, C.R.V. Tomson, P.J. Roderick, Estimating kidney function in adults using formulae, *Ann. Clin. Biochem.* 42 (2005) 321–345.
- [16] S. Medina, I. Miguel-Elizaga, C. Oger, J. Galano, T. Durand, M. Martínez-Villanueva, M.L. Castillo, I. Villegas-Martínez, F. Ferreres, P. Martínez-Hernández, A. Gil-Izquierdo, Dihomo-isoprostanes-nonenzymatic metabolites of AdA are higher in epileptic patients compared to healthy individuals by a new ultrahigh pressure liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry method, *Free Radic. Bio Med.* 79 (2015) 154–163.
- [17] A.-L. Auvinet, B. Eignerova, A. Guy, M. Kotora, T. Durand, Total Synthesis of 4-F₃-Neuroprostane and its 4-epimer, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 1498–1500.
- [18] C. Oger, V. Bultel-Poncé, A. Guy, L. Balas, J.-C. Rossi, T. Durand, J.-M. Galano, The handy use of Brown's catalyst for a skipped diyne deuteration: application to the synthesis of a d₄-labeled-F₄t-neuroprostane, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 13976–13980.
- [19] A. Guy, C. Oger, J. Hepekauzen, C. Signorini, T. Durand, C. De Felice, A. Fürstner, J.-M. Galano, Oxygenated metabolites of n-3 polyunsaturated fatty acid as potential oxidative stress biomarkers: total synthesis of 8-F₃-IsoP, 10-F₄-NeuroP, and [D₄] - 10-F₄-NeuroP, *Chem. Eur. J.* 20 (2014) 6374–6380.
- [20] S. Medina, R. Domínguez-Perles, J.I. Gil, F. Ferreres, et al., A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 h values in health, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2016) 1249–1257.
- [21] C.V.F. Ortega, Avances en la calidad de vida relacionada con la salud y trasplante renal, *Nefrología* (2006) 157–162.
- [22] L.C. Corrales, M.M.M. Ariza, Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno, *Cienc. Bioméd.* 10 (2012) 213–225.
- [23] M. Coronado, S. Vega, R. Gutiérrez, B. García, G. Díaz, Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud, *REB* 25 (2006) 72–79.
- [24] M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris, Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination, *InTech* (2012) 3–30.
- [25] R. Castillo, P. Huerta, R. Carrasco, R. Rodrigo, Estrés oxidativo y daño renal, *CIMEL* 8 (1) (2003) 43–52.
- [26] R. Lauzurica, M.C. Pastor, B. Bayés, et al., F₂-isoprostanes in kidney transplant patients: relationship with inflammatory markers, *Transplant. P.* 37 (2005) 3842–3843.
- [27] K.A. Nath, A.J. Croatt, T.H. Hostetter, Effect of dietary protein restriction on oxygen consumption and oxidant stress in the remnant nephron, *Kidney Int.* 33 (1998) 381.
- [28] I. Bruzzi, A. Benigni, G. Remuzzi, Role of increased glomerular protein traffic in the progression of renal failure, *Kidney Int.* 62 (1997) 29–31.
- [29] S. Tang, J.C. Leung, K. Abe, K.W. Chan, L.Y. Chan, T.M. Chan, K.N. Lai, Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells *in vitro* and *in vivo*, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 515–527.
- [30] M. Morigi, D. Macconi, C. Zoja, R. Donadelli, S. Buelli, C. Zanchi, M. Ghilardi, G. Remuzzi, Protein overload-induced NF-κappaB activation in proximal tubular cells requires H(2)O(2) through a PKC-dependent pathway, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 1179–1189.
- [31] M. Abbate, C. Zoja, G. Remuzzi, How does proteinuria cause progressive renal damage?, *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (2006) 2974–2984.
- [32] Y. Iwao, K. Nakajou, R. Nagai, K. Kitamura, M. Anraku, T. Maruyama, M. Otagiri, CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products, *Am. J. Physiol.-Ren.* 295 (2008) 1871–1880.
- [33] M. Li, S. Balamuthusamy, E.E. Simon, V. Batuman, Silencing megalin and cubilin genes inhibits myeloma light chain endocytosis and ameliorates toxicity in human renal proximal tubule epithelial cells, *Am. J. Physiol.-Ren.* 295 (2008) 82–90.
- [34] M. Gekle, Renal tubule albumin transport, *Annu. Rev. Physiol.* 67 (2005) 573–594.
- [35] M. Arici, J. Brown, M. Williams, K.P. Harris, J. Walls, N.J. Brunskill, Fatty acids carried on albumin modulate proximal tubular cell fibronectin production: a role for protein kinase C, *Nephrol. Dial. Transplant.* 17 (2002) 1751–1757.
- [36] P. Martín, P. Errasti, Trasplante renal, *An. del Sist. Sanit. del Navar.* 29 (2006) 79–92.
- [37] S.H. Platts, J. Linden, B.R. Duling, Rapid modification of the glycocalyx caused by ischemia-reperfusion is inhibited by adenosine A_{2A} receptor activation, *Am. J. Physiol.-Heart C* 284 (6) (2003) 2360–2367.
- [38] H. Sprecher, M. VanRollins, F. Sun, A. Wyche, P. Needleman, Dihomo-prostaglandins and -thromboxane. A prostaglandin family from adrenergic acid that may be preferentially synthesized in the kidney, *J. Biol. Chem.* 257 (7) (1982) 3912–3918.
- [39] D.X. Zhang, K.M. Gauthier, W.B. Campbell, Adrenergic acid metabolites as endogenous endothelium - and zona glomerulosa - derived hyperpolarizing factors, *Hypertension* 55 (2) (2010) 547.
- [40] C. Ji, C. Souvignet, N. Quirin, X. Grosbois, F. Bayle, Urinary F₂-isoprostanes formation in kidney transplantation, *Clin. Transplant.* (2001) 58–62.
- [41] C. Guijas, A.M. Astudillo, L. Gil-de-Gómez, J.M. Rubio, M.A. Balboa, J. Balsinde, Phospholipid sources for adrenergic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages. Comparison with arachidonic acid, *Mol. Cell. Biol. Lipids.* 1821 (11) (2012) 1386–1393.
- [42] Y.-Y. Mao, J.-Q. Bai, J.-H. Chen, Z.-F. Shou, Q. He, J.-Y. Wu, et al., A pilot study of GC/MS-based serum metabolic profiling of acute rejection in renal transplantation, *Transpl. Immunol.* 19 (1) (2008) 74–80.