

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Efecto de los bisfenoles sobre el daño genómico en pacientes con Enfermedad Renal Crónica en Hemodiálisis

Tesis para optar al grado de Doctor presentada por

CÉSAR EMILIO RUIZ GARCÍA

Directoras:

Dra. Elisabet Coll Piera

Dra. Susana Pastor Benito

Tutora: **Dra. Roser Torra Balcells**

Barcelona, 2024

Agradecimientos:

A mis padres, Elio e Yraima, gracias, no por esta tesis, sino por todo lo que tengo en la vida. A Sandra, mi esposa, que me quiere, me cuida, me empuja, no me deja fracasar, y me ha dado lo mejor que tengo en la vida, Gael, nuestro hijo. No sabría por dónde empezar a agradecerle, suerte que tengo toda la vida para hacerlo cada día.

A mis hermanos, Ireli y Yuram. Cada uno a su manera son un ejemplo de que la constancia y el esfuerzo conducen al éxito. Os admiro por eso.

A todos los buenos maestros que he tenido la suerte de encontrar en mi camino, gracias por transmitirme una pequeña parte de vuestro conocimiento, que hoy es una gran parte del mío.

A mis directoras de tesis, Elisabet y Susana, por darme todo lo que he necesitado en este proyecto. Vuestra paciencia, consejos, experiencia y conocimiento me han permitido corregir errores y superar las dificultades que he encontrado en el camino.

A mis tutores de tesis, Dr. J. Ballarín y Dra. R. Torra. Habéis sido siempre un lugar a donde ir cuando se necesitan respuestas. Es un lujo tener vuestra enorme calidad profesional y humana al alcance.

A la Fundació Puigvert, donde he tenido la suerte de formarme como especialista, y en la que tengo el placer de luchar día a día por el bienestar de mis pacientes.

A todo el personal de nuestra unidad de diálisis, especialmente a mis compañeros médicos, por las horas y horas de despacho compartido en las que me habéis dado ánimos en los días más difíciles.

A los compañeros del Laboratorio de Mutagénesis de la UAB y el Laboratorio de Toxicología y Salud Medioambiental de la Universidad Rovira y Virgili de Tarragona. Vuestro incansable afán investigador hace que, aún en ausencia de recursos, podamos seguir dando respuesta a nuestras inquietudes científicas.

A mis amigos, esa familia suplente que ha hecho más feliz mis primeros años de emigrante.

A Guille, mi mejor amigo. Tengo la fortuna de que la vida nos ha mantenido cerca.

LISTADO DE ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos.
ATP	Adenosin trifosfato.
BPA	Bisfenol A.
BPAF	Bisfenol AF.
BPF	Bisfenol F.
BPS	Bisfenol S.
CBMN	Cytokinesis block micronucleus assay.
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.
ClxBPA	Derivado clorado del Bisfenol A.
CO	Cut off.
Cyt-B	Citocalasina B.
DG	Daño genómico.
DM	Diabetes Mellitus.
EPO	Eritropoyetina.
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
EFSA	European Food Safety Authority.
ELISA	Inmunoabsorción ligada a enzimas.
Endo III	Endonucleasa III.
EVAL	Etilen-vinil-alcohol copolímero.
FAV	Fístula Arteriovenosa.
FDA	Food and Drugs Administration.
FGe	Filtrado glomerular estimado.
FGF-23	Fibroblast growth factor 23.
FPG	Formamidopirimidina ADN glicosilasa.
FRA	Fracaso renal agudo.

GC	Cromatografía de gases.
Glo-1	Glicosilasa 1.
GST	Glutation S transferasa.
HDF-OL	Hemodiafiltración en línea.
HD	Hemodiálisis.
HD-HF	Hemodiálisis de alto flujo.
HD-LF	Hemodiálisis de bajo flujo.
HDx	Hemodiálisis extendida.
HFR	Hemofiltración con reinfusión de ultrafiltrado.
HTA	Hipertensión arterial.
IL-1	Interleucina 1.
IL-6	Interleucina 6.
IDT	Ingesta diaria tolerable.
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative.
KoA	Coefficiente de transferencia de masas.
KUF	Coefficiente de ultrafiltración.
LC	Cromatografía líquida.
LD	Líquido de diálisis.
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease.
MIES	Molecular imprinting electrochemical sensors.
MN	Micronúcleos.
MNPLs	Micro y nanoplásticos.
MPLs	Microplásticos.
MPO	Mieloperoxidasa.
MS	Espectrometría de masas.
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato.
NRF2	Factor nuclear eritroide similar al factor 2.
NPLs	Nanoplásticos.

ON	Óxido nítrico.
PC	Policarbonato.
PEPA	Polyester Polymer Alloy.
PM	Peso molecular.
PMMA	Polimetilmetacrilato.
PP	Polipropileno.
PU	Poliuretano.
PVC	Polivinil carbonato.
PTH	Paratohormona.
PTM	Presión transmembrana.
PS	Polisulfona.
PGA	Productos de glicosilación avanzada.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SC	Coeficiente de cribado.
SCENIHR	Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks.
SCGE	Single cell gel electrophoresis, ensayo de cometa.
SML	Specific migration limit.
SOD	Superóxido dismutasa.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TRS	Terapia renal sustitutiva.
UV	Ultravioleta.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

TABLAS:

Tabla 1: Estratificación de la ERC.

Tabla 2: Pronóstico de la ERC según FGe y albuminuria.

Tabla 3: Factores de progresión de ERC.

Tabla 4: Clasificación de las toxinas urémicas y mecanismo de depuración.

Tabla 5: Principales publicaciones relacionadas con daño genómico y ERC en los últimos 20 años.

Tabla 6: Principales publicaciones que relacionan BPA y riñón.

Tabla 7: Contenido de Bisfenoles en las membranas de diálisis.

Tabla 8: Dializadores utilizados en el estudio.

Tabla 9: Características de la población en estudio.

Tabla 10: Principales tratamientos y suplementos.

Tabla 11: Análisis pre y post del control de la anemia.

Tabla 12: Análisis pre y post del metabolismo mineral óseo.

Tabla 13: Análisis pre y post de parámetros nutricionales.

Tabla 14: Análisis pre y post de los niveles de BPA y sucedáneos.

Tabla 15: Análisis pre y post de los niveles de daño genómico basal y oxidativo (SCGE).

Tabla 16: Análisis pre y post de frecuencia de Micronúcleos.

Tabla 17: Análisis multivariado para niveles de daño genómico basal en el momento inicial.

Tabla 18: Modelo de regresión por pasos para el descenso de BPAF.

Tabla 19: Modelo de regresión por pasos para el descenso de daño genómico basal (SCGE).

FIGURAS:

Figura 1: Evolución de la incidencia por modalidad de terapia renal sustitutiva.

Figura 2: Mortalidad por TRS y grupos de edad.

Figura 3: Circuito extracorpóreo de HD.

Figura 4: Modelo de HDF-OL pre y post dilución.

Figura 5: Producción de ROS en la respiración mitocondrial.

Figura 6: Esquema del Ensayo de Cometa.

Figura 7: Micronúcleos.

Figura 8: Estructura química del Bisfenol A.

Figura 9: Evolución de las medidas restrictivas en el uso de BPA a nivel mundial.

Figura 10: Vías de exposición y fuentes de BPA.

Figura 11: Toxicocinética del BPA.

Figura 12: Estructura molecular de los análogos del BPA.

Figura 13: Métodos de detección de bisfenoles empleados en publicaciones de los últimos 5 años.

Figura 14: Diseño del estudio.

Figura 15: Índice de comorbilidad de Charlson.

Figura 16: Proceso del ensayo de cometa.

Figura 17: Niveles de BPAF pre y post seguimiento.

Figura 18: Niveles de daño genómico basal pre y post seguimiento

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	22
SUMMARY	23
1. INTRODUCCIÓN.....	26
1.1 Fundamentos de la Enfermedad Renal Crónica.	26
1.1.2. Definición y clasificación de la Enfermedad Renal Crónica.	26
1.1.2 Historia natural de la Enfermedad Renal Crónica.....	28
1.2. Hemodiálisis.	30
1.2.1. Principios físicos de la diálisis.	31
1.2.2. Membranas de diálisis.....	32
1.2.3. Materiales y dispositivos de diálisis.	33
1.2.4. Técnicas de diálisis.	34
1.3. Morbimortalidad en la ERC:.....	36
1.4. Inflamación y toxinas urémicas:.....	38
1.5. Estrés oxidativo.	40
1.6. Daño genómico.	43
1.6.1. Métodos de medición del daño genómico.	43
1.6.2. Daño genómico y ERC:.....	47
1.7. Microplásticos y salud humana.....	49
1.8. Bisfenol A:	51
1.8.1. Historia y contexto actual.	51
1.8.2. Vías de exposición a BPA.	53
1.8.3. Metabolismo del BPA.	54
1.8.4. Efectos de la exposición a BPA.....	55
1.8.5. BPA y ERC, causa y consecuencia.....	56
1.8.6. BPA y diálisis.	56
1.9 Sustitutos de Bisfenol A:.....	59
1.10. Métodos de detección de bisfenoles.....	60
2. JUSTIFICACIÓN.....	64
3. HIPÓTESIS:.....	67
4. OBJETIVOS.	71
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
6. RESULTADOS.	86

7. DISCUSIÓN.....	100
8. CONCLUSIONES	111
9. LINEAS DE FUTURO:.....	115
10. BIBLIOGRAFÍA.	119
11. ANEXOS.....	137
11.1 ANEXO 1. Hoja informativa para participar en el estudio.....	139
11.2 ANEXO 2. Consentimiento informado para la participación en el estudio.	140
11.3 ANEXO 3. Ficha técnica dializador VitaPES LF (Palex Medical).	142
11.4 ANEXO 4. Ficha técnica dializador ELISIO- M (NIPPRO Medical)	143

RESUMEN.

RESUMEN.

Los microplásticos, originados a partir de la degradación de residuos de plástico en el medio ambiente, son ubicuos y difíciles de detectar debido a su naturaleza diversa. La determinación de ciertos monómeros o compuestos derivados del plástico se emplea habitualmente como un indicador de la presencia de microplásticos. Entre dichos monómeros, los más estudiados son los bisfenoles, cuyos efectos deletéreos sobre la salud humana están más que probados. Los bisfenoles tienen una eliminación fundamentalmente renal, por lo que, cuando la función renal se deteriora, estos tienden a acumularse llegando a un nivel máximo en los pacientes en hemodiálisis, donde además existe una exposición sostenida y directa derivada del contacto de la sangre con componentes del circuito extracorpóreo que contienen bisfenoles. La acumulación de bisfenoles se ha relacionado con incremento del estrés oxidativo.

El presente trabajo es el primero que busca determinar el efecto de la exposición a bisfenoles a través de los dializadores, sobre los niveles de daño genómico medidos mediante ensayo de cometa (SCGE) y frecuencia de micronúcleos (MN). Se trata de un estudio prospectivo, intervencionista, en el cual se incluyeron 35 pacientes en hemodiálisis que empleaban un dializador de polisulfona con carcasa de policarbonato (que contiene BPA), que se sustituyó por un dializador libre de BPA, con un período de seguimiento de 6 meses. Se realizaron dos determinaciones (inicial y final) de parámetros analíticos clásicos, niveles de BPA y sus principales sucedáneos (BPS, BPF, BPAF), así como de daño genómico (SCGE y MN). Los principales bisfenoles detectados fueron el BPA (98%), BPF (97%) y BPAF (47%), observándose un descenso significativo de los niveles de BPAF, mas no así en el resto de bisfenoles. El daño genómico medido mediante SCGE, presentó una reducción significativa en su forma basal (total), mas no es la variante oxidativa. En cuanto a la frecuencia de micronúcleos, no se observaron diferencias significativas tras el período de seguimiento. Mediante un modelo de regresión se evidenció que los individuos con niveles más elevados de daño genómico inicial, antigüedad en diálisis superior a 24 meses y niveles de PCR mayores a 5 mg/L, presentaron un descenso significativamente mayor del daño genómico total. En conclusión, reducir la exposición a bisfenoles mediante el uso de dializadores libres de bisfenoles, puede tener un impacto positivo sobre la salud, al disminuir los niveles de daño genómico, constituyendo una potencial estrategia terapéutica para reducir la elevada morbi mortalidad que caracteriza a la población en hemodiálisis.

SUMMARY

Microplastics, originating from the breakdown of plastic waste in the environment, are ubiquitous and difficult to detect due to their diverse nature. The determination of certain plastic monomers or compounds is commonly used as an indicator of microplastic presence. Among such monomers, bisphenols are the most studied, with their deleterious effects on human health well established. Bisphenols are primarily eliminated through the kidneys, so when renal function deteriorates, they tend to accumulate, reaching peak levels in hemodialysis patients, where there is also sustained and direct exposure derived from blood contact with extracorporeal circuit components containing bisphenols. Bisphenol accumulation has been associated with increased oxidative stress.

This study is the first to investigate the effect of bisphenol exposure through dialyzers on levels of genomic damage, measured by comet assay (SCGE) and micronucleus (MN) frequency. It is a prospective, interventional study that included 35 hemodialysis patients using a polysulfone dialyzer with a polycarbonate housing (containing BPA), which was replaced by a BPA-free dialyzer, with a follow-up period of 6 months. Two measurements (initial and final) of classic analytical parameters, BPA levels and its main substitutes (BPS, BPF, BPAF), as well as genomic damage (SCGE and MN), were performed. The main bisphenols detected were BPA (98%), BPF (97%), and BPAF (47%), with a significant decrease observed in BPAF levels but not in the other bisphenols. Genomic damage measured by SCGE showed a significant reduction in its basal (total) form, but not in the oxidative variant. Regarding micronucleus frequency, no significant differences were observed after the follow-up period. A regression model showed that individuals with higher initial levels of genomic damage, dialysis vintage over 24 months, and PCR levels greater than 5 mg/L, had a significantly greater decrease in total genomic damage. In conclusion, reducing bisphenol exposure by using bisphenol-free dialyzers may have a positive impact on health by decreasing genomic damage levels, constituting a potential therapeutic strategy to reduce the high morbidity and mortality characteristic of the hemodialysis population.

1. INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Fundamentos de la Enfermedad Renal Crónica.

1.1.2. Definición y clasificación de la Enfermedad Renal Crónica.

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) se define como una alteración estructural y/o funcional de los riñones, sostenida durante al menos 3 meses (1). Se trata de un problema de salud pública de gran impacto a nivel mundial que muestra un claro incremento desde la década de los noventa, posiblemente relacionado con el crecimiento y envejecimiento poblacional, y la mayor prevalencia de patologías crónicas como la hipertensión arterial (HTA) o la diabetes mellitus (DM). Actualmente se estima que entre el 8 y 16% de la población mundial padece algún grado de ERC, lo que se traduce en 850 millones de personas aproximadamente, ocasionando entre 5 y 10 millones de muertes anuales (2–4). En España, la ERC presenta una prevalencia del 15.1% de la población, con un incremento más marcado con la edad (del 4.8% de los 21 a los 44 años y un 37.3% en mayores de 65 años) (5). A pesar de su alto impacto social y económico, la conciencia de la población general respecto a la salud renal continúa siendo baja, y el diagnóstico de la ERC en estadios precoces sigue representando un reto para los facultativos a todos los niveles. Se estima que más del 75 % de las personas que padecen ERC se encuentran en estadios avanzados, posiblemente debido a que las etapas tempranas de la enfermedad son habitualmente silentes (6). La falta de intervención precoz favorece la evolución de la ERC con la consecuente aparición de complicaciones y la elevada morbi-mortalidad, principalmente cardiovascular en etapas avanzadas.

Tradicionalmente la función renal se mide mediante el filtrado glomerular estimado (FGe), calculado a partir de la concentración plasmática de creatinina mediante la utilización de fórmulas de estimación validadas para distintos grupos poblacionales. De este modo en 2002 la US National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) definió la ERC como un descenso del FGe por debajo de 60 ml/min/1.73m² sostenido durante al menos 3 meses, y estableció el primer sistema de clasificación de la ERC basado en dicho parámetro, que se resume a continuación (7,8):

Tabla 1. Estratificación de la ERC.

La clasificación de la ERC se basa en la causa^a y en las categorías del FG y de la albuminuria

Categorías del FG		
Categoría	FG ^b	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	Cociente A/C ^c	Descripción
A1	< 30	Normal a ligeramente elevada
A2	30-300	Moderadamente elevada
A3	> 300	Muy elevada ^d

Gorostidi et al. 2014.(1)

La fórmula actualmente recomendada para la estimación del filtrado glomerular a partir de la creatinina es la de CKD-EPI (Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration), que tiene mayor exactitud que la de MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) sobre todo en estadios precoces (1 y 2) (9). En los años posteriores se reconoció el peso de la albuminuria como elemento pronóstico de la ERC, por lo que en 2012 el Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) elaboró una clasificación revisada en la que se incluyó dicho marcador. Del mismo modo se estableció la necesidad de identificar otros factores de progresión de la ERC tales como la etiología, edad, historia familiar, exposición a nefrotóxicos o presencia de comorbilidades (HTA, DM, obesidad, hábitos tóxicos, etc) (9,10).

Tabla 2. Pronóstico de la ERC según FGe y albuminuria.

KDIGO 2012			Albuminuria		
			Categorías, descripción y rangos		
Filtrado glomerular Categorías, descripción y rangos (ml/min/1,73 m ²)			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada	Moderadamente elevada	Gravemente elevada
			< 30 mg/g ^a	30-300 mg/g ^a	> 300 mg/g ^a
G1	Normal o elevado	≥ 90			
G2	Ligeramente disminuido	60-89			
G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59			
G3b	Moderada a gravemente disminuido	30-44			
G4	Gravemente disminuido	15-29			
G5	Fallo renal	< 15			

Gorostidi et al. 2014 (1).

1.1.2 Historia natural de la Enfermedad Renal Crónica.

La ERC es una patología compleja que obedece a múltiples causas y en la que intervienen diversos factores de riesgo de inicio y progresión (tabla 3). La DM constituye la primera causa de ERC, seguida de la enfermedad vascular arteriosclerótica relacionada con la HTA, patologías glomerulares, nefropatías hereditarias, urológicas, etc. Una vez realizado el diagnóstico, es fundamental determinar los factores de progresión de la ERC para establecer un pronóstico (10). En todos los pacientes con ERC se recomienda al menos una analítica anual que incluya FGe y albuminuria, y en los grados más avanzados o con tendencia a progresar es conveniente un seguimiento más estrecho. (11).

Tabla 3. Factores de progresión de ERC.

Factores de progresión de ERC.
Proteinuria.
Hipertensión arterial.
Diabetes mellitus.
Enfermedad cardiovascular.
Tabaquismo.
Obesidad.
Raza negra o asiática.
Tratamiento crónico con AINEs.
Obstrucción del tracto urinario.
Acidosis metabólica.
FRA y nefrotoxicidad.
Ingresos hospitalarios por insuficiencia cardíaca.

ERC: Enfermedad renal crónica, **AINEs:** Antiinflamatorios no esteroideos, **FRA:** Fracaso renal agudo.

García-Maset R et al. Nefrología 2022. (10)

La ERC suele ser asintomática, las manifestaciones clínicas son más frecuentes en los estadios avanzados (G3b en adelante) y son producto de los efectos sistémicos de la pérdida progresiva de la función renal, tales como:

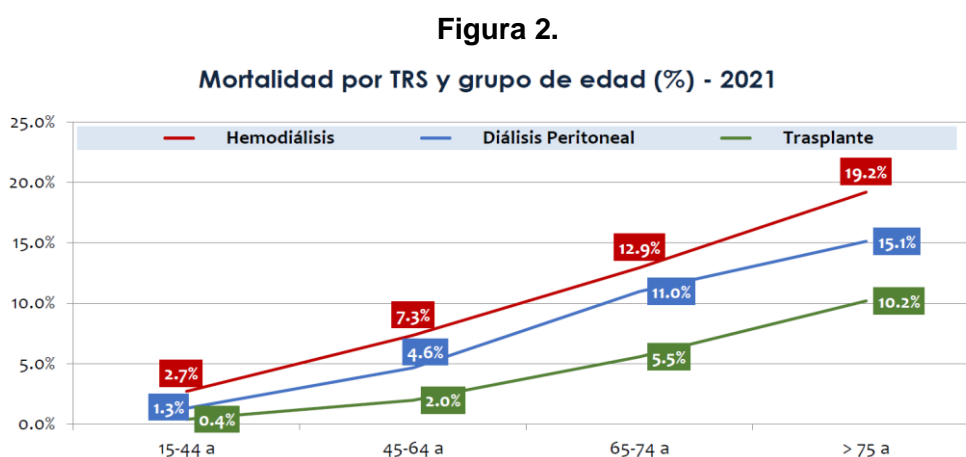
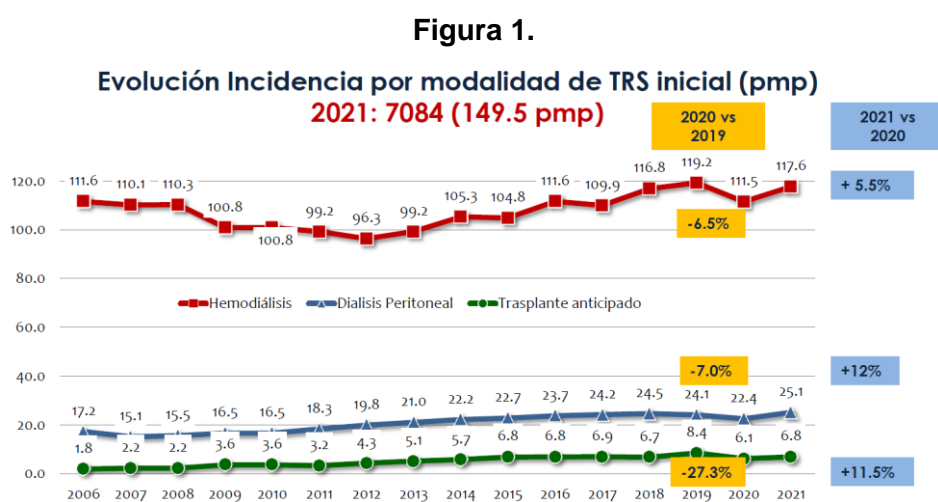
- Hipertensión arterial: además de ser un factor de iniciación y progresión de ERC, la HTA es una consecuencia de la pérdida de función renal. Se debe a diversos mecanismos fisiopatológicos entre los que destaca la retención hidrosalina y aumento de la producción de renina.
- Anemia: es más frecuente cuando el FGe desciende por debajo de 30 ml/min/1.73 m², suele ser normocítica normocrómica. El principal mecanismo

fisiopatológico es el déficit de producción de eritropoyetina (EPO) en el parénquima renal, además de otros como la reducción de la vida media de los hematíes o la menor movilización de los depósitos de hierro. (12).

- Alteraciones electrolíticas y del equilibrio ácido base: conforme disminuye el FGe, se reduce también la eliminación de potasio por vía renal. Por tal razón, los pacientes con ERC avanzada tienen tendencia a la hiperpotasemia, especialmente los diabéticos, tratados con inhibidores del sistema renina angiotensina aldosterona o diuréticos ahorradores de potasio. Del mismo modo existe una reducción de la excreción global de ácidos que lleva a un balance positivo de hidrogeniones que se traduce en acidosis metabólica, empeorando a su vez la hiperpotasemia. (10,13).
- Alteraciones del metabolismo mineral óseo: la alteración del metabolismo del calcio (Ca) y fósforo (P) afecta múltiples sistemas más allá del propio hueso. Existe una propensión a la calcificación vascular y valvular, lo cual incrementa notablemente la morbimortalidad cardiovascular de estos pacientes. Es habitual encontrar una sobreproducción de parathormona (PTH) en respuesta a la retención de fósforo, déficit de vitamina D y tendencia a la hipocalcemia. (14).
- Síntomas urémicos: la acumulación de urea puede ocasionar una amplia gama de síntomas con distinto espectro de severidad, que van desde la astenia, náuseas, vómitos, inapetencia y prurito, hasta la pericarditis, encefalopatía o neuropatía urémica.
- Fragilidad: es un síndrome que consiste en la disminución de la reserva biológica y la capacidad de adaptación del paciente frente a estímulos estresores. Constituye un factor de riesgo de hospitalizaciones y conduce al declive funcional, dependencia y muerte. (10).
- Malnutrición: la malnutrición en hemodiálisis tiene una prevalencia entre 28 y 54%, afectando la calidad de vida e incrementando el riesgo de fragilidad y muerte. Tiene un origen multifactorial que se remonta a las etapas avanzadas de la ERC, previo al inicio de diálisis, donde frecuentemente se recomienda una dieta baja en proteínas para enlentecer la progresión, y suele existir una ingesta inadecuada derivada del propio síndrome urémico. También se asocian otros factores como la monotonía alimentaria, el ajuste de la ingesta a los horarios de diálisis, la inflamación inducida por la diálisis, la acidosis metabólica, alteraciones del gusto, factores psicosociales y económicos, que conforman un ecosistema que fácilmente conduce a la malnutrición si no existe un soporte profesional multidisciplinar (15).

1.2. Hemodiálisis.

Cuando se alcanzan los estadios finales de la ERC, se hace necesario implementar una terapia renal sustitutiva (TRS), es decir, hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplante renal anticipado. Según datos del Registro Español de Enfermos Renales, la hemodiálisis (HD) es la modalidad con mayor incidencia, siendo la TRS inicial en casi el 80% de los pacientes, y la segunda en prevalencia, por detrás del trasplante renal (figura 1). Del mismo modo, es la que presenta la mayor tasa de mortalidad en todos los grupos de edad, situándose entre un 13 y 14% anual (figura 2).



Es una técnica de depuración extracorpórea que sustituye la función renal de excreción de agua y solutos, así como el mantenimiento del equilibrio iónico y ácido base, sin

suplir las funciones endocrino-metabólicas del riñón. De forma general, consiste en hacer pasar la sangre del paciente a través de un circuito extracorpóreo en el cual se pone en contacto con el líquido de diálisis en dos compartimientos separados por una membrana semipermeable, a través de la cual se produce el intercambio de solutos y agua.

1.2.1. Principios físicos de la diálisis.

El intercambio de solutos durante la diálisis se rige por tres principios físicos fundamentales: difusión, convección y adsorción (17).

- **Difusión:** es el transporte pasivo de solutos de un lado al otro de una membrana semipermeable por diferencia de concentración. Está determinadas por dos factores:
 - A. Coeficiente de transferencia de masas (KoA), que es el producto entre la permeabilidad de la membrana (Ko) y la superficie disponible para el intercambio (A). Habitualmente se usa el KoA de urea para definir la capacidad de transporte difusivo de una determinada membrana.
 - B. Gradiente de concentración: Es la diferencia de concentración de un determinado soluto a ambos lados de la membrana, y determina además el sentido en el que se produce el paso de moléculas.

En los apartados siguientes se discuten las características de las membranas de diálisis que determinan su poder difusivo.

- **Convección:** Se define como el paso de solutos a través de una membrana semipermeable, guiados por una corriente de agua y es el principal mecanismo de eliminación de agua y permite la depuración de moléculas medianas, difíciles de eliminar por difusión. La convección está determinada por tres factores:
 - A. Coeficiente de cribado (SC): es la relación entre la concentración de un soluto en el ultrafiltrado y el plasma. Es inversamente proporcional al peso molecular.
 - B. Coeficiente de ultrafiltración (KUF): Es una medida de la permeabilidad hidráulica de la membrana, es decir, de su capacidad de transferir solvente. Se expresa en mililitros de líquidos filtrados por hora, por cada mmHg de presión.
 - C. Presión transmembra (PTM): Es el gradiente de presión que existe a ambos lados de la membrana.
- **Adsorción:** Consiste en el aclaramiento de sustancias de la sangre mediante su adherencia a la membrana del dializador.

1.2.2. Membranas de diálisis.

Es la parte fundamental del dializador y la que determina la capacidad de depuración de solutos y agua. Según su composición se clasifican en celulósicas y sintéticas. Las membranas celulósicas fueron las primeras en desarrollarse y las más empleadas en el pasado. Están formadas por polisacáridos con grupos hidroxilo libres, lo cual les hace hidrofílicas y poco biocompatibles. Con el tiempo han ido evolucionando, sustituyendo los grupos hidroxilo por radicales acetato hasta llegar a la membrana de triacetato de celulosa conocida en la actualidad, que ofrece una elevada eficacia depuradora. A pesar de su evolución, el uso de membranas celulósicas ha disminuido notablemente a partir del desarrollo de membranas sintéticas (18).

Las membranas sintéticas fueron desarrolladas en los años ochenta con la intención de cubrir las deficiencias de biocompatibilidad y permeabilidad de las celulósicas. Poseen una matriz esponjosa recubierta por dos finas capas porosas. El espesor de la matriz central determina la capacidad de transporte difusivo, y con el tiempo se han ido diseñando membranas de menor grosor para optimizar este aspecto. Por su parte la superficie de la membrana puede ser hidrofílica o hidrofóbica, lo cual le confiere ciertas propiedades. Las hidrofílicas tienen un menor poder trombogénico, por lo que se requiere menos anticoagulación, pero son capaces de interactuar con las células y activar el complemento. Las hidrofóbicas son las más empleadas actualmente (Polisulfona (PS), Polimetilmetacrilato (PMMA), Poliacrilonitrilo), por ser más biocompatibles y con mayor coeficiente de ultrafiltración (KUF).

Otras clasificaciones frecuentemente utilizadas son:

Según la permeabilidad convectiva o coeficiente de ultrafiltración (KUF):

- Bajo flujo: $KUF < 12 \text{ ml/min/h/mmHg}$.
- Alto flujo: $KUF > 20 \text{ ml/h/mmHg}$.

Según la permeabilidad difusiva o coeficiente de transferencia de masas (KoA):

- Baja eficacia: $KoA < 600 \text{ ml/min}$.
- Alta eficacia: $KoA > 600 \text{ ml/min}$.

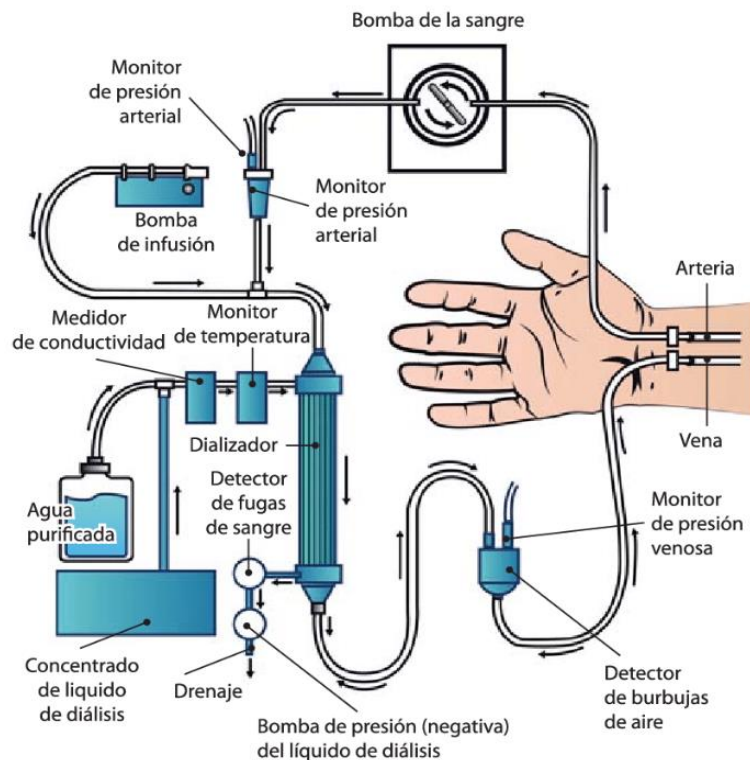
La tendencia actual es a utilizar membranas de $KUF > 40 \text{ ml/h/mmHg}$, con un coeficiente de cribado de $\beta 2$ microglobulina > 0.8 y pérdida de albúmina < 3.5 gramos por sesión.

1.2.3. Materiales y dispositivos de diálisis.

El circuito extracorpóreo de hemodiálisis comienza y finaliza en el acceso vascular del paciente, y está compuesto por distintos elementos: las agujas de punción, líneas de sangre, el líquido de diálisis y el dializador (figura 3).

- **Agujas de punción:** si el acceso vascular del paciente es una fístula arteriovenosa, se necesitan dos agujas de punción, una arterial (salida) y otra venosa (retorno). Se implantan sobre la vena arterializada del paciente y suelen tener un calibre que va desde los 15 a los 17G. Las más comúnmente utilizadas son agujas fenestradas de 15G. También existen agujas romas o con un capuchón de fluoroplástico, menos utilizadas (19).
- **Líneas de diálisis:** son los conductos por los que la sangre, impulsada por la bomba de circulación extracorpórea, viaja hacia el dializador y retorna al paciente. Durante su recorrido existen distintos elementos de seguridad y control, como puertos de administración de medicamentos, biosensores, sensores de detección de aire o coágulos, etc.
- **Líquidos de diálisis (LD):** el LD se forma por la combinación de agua purificada con una solución ácida y el tampón de bicarbonato. El principal reto en las unidades de hemodiálisis es la obtención de agua ultrapura, para lo cual se cuenta con una planta de tratamiento de agua con altos estándares de calidad que se revisan diariamente. El concentrado ácido determina la concentración de iones en el LD, puede presentarse en garrafas o centralizado. Finalmente, el concentrado de bicarbonato suele presentarse en forma de polvo seco que se diluye con el agua purificada y la solución ácida.
- **Dializadores:** el dializador es el elemento central del circuito extracorpóreo, donde se lleva a cabo la depuración y ultrafiltración de la sangre. Consiste en una carcasa cilíndrica que contiene un conjunto de fibras huecas o capilares conformando dos compartimientos (intra y extracapilar) herméticamente aislados entre sí. De este modo, la sangre circula por los capilares y el líquido de diálisis por el espacio extracapilar a contraflujo, y entran en contacto a través de la membrana capilar semipermeable. La carcasa exterior suele estar hecha de policarbonato (PC), poliuretano (PU) o polipropileno (PP).
- **Monitor de diálisis:** Es uno de los dispositivos médicos con mayor nivel de sofisticación en el cual se distinguen tres sistemas que funcionan en conjunto: el circuito extracorpóreo, en circuito de líquido de diálisis y los sistemas de biosensores y monitorización del paciente.

Figura 3. Circuito extracorpóreo de hemodiálisis.



Tomado de: Manual CTO de Enfermería, Urología y Nefrología (20).

1.2.4. Técnicas de diálisis.

Según la permeabilidad de la membrana al agua se distinguen dos tipos de diálisis:

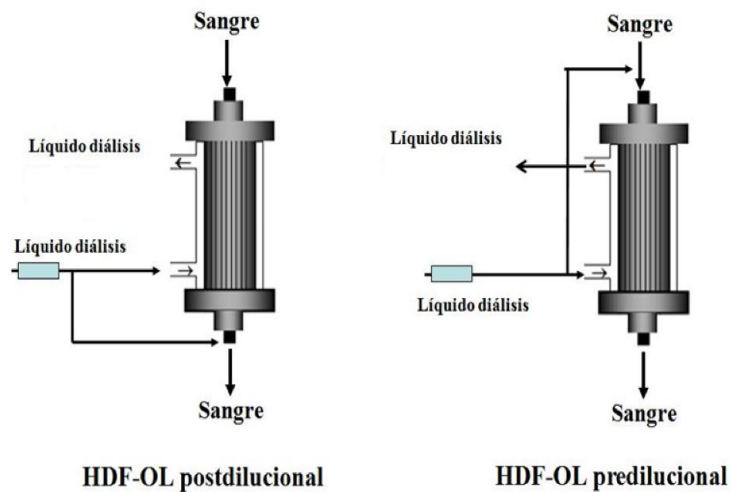
- **Diálisis convencional o de bajo flujo:** se realiza con dializadores con un KUF inferior a 20 ml/h/mmHg, y puede ser de baja o alta eficacia según el KoA. Se trata de una modalidad de diálisis en desuso, desplazada por las técnicas más modernas.
- **Diálisis de alto flujo:** se utilizan membranas de alta permeabilidad, habitualmente con un KUF superior a 40 ml/h/mmHg, lo cual mejora el transporte de solutos de peso molecular mediano. Habitualmente se realiza con dializadores de alta eficacia, determinada por un KoA superior a 800 ml/min y un SC de $\beta 2$ microglobulina mayor a 0.8. El transporte de solutos es principalmente difusivo, aunque puede existir cierto grado de retrofiltración, por lo que es imprescindible un líquido de diálisis ultrapuro.
- **Técnicas convectivas:** descritas por primera vez en los años sesenta, surgen como una alternativa para intentar mejorar el aclaramiento de moléculas que se eliminan mal por difusión. Se denomina hemofiltración, y consiste en extraer un volumen de

agua muy superior a la ganancia de peso interdialítica del paciente, y reponer la diferencia con un líquido de sustitución con una composición fisiológica. De esta forma se multiplica el poder convectivo de la técnica, aumentando la depuración de moléculas medianas (21).

La producción de líquido de sustitución ultrapuro es un prerequisite indispensable en la realización de las técnicas convectivas, ya que este entra directamente al torrente sanguíneo del paciente. Inicialmente el líquido se producía de forma externa y se almacenaba en contenedores estériles desde los cuales era infundido en el circuito de diálisis (generación off-line), suponiendo un elevado coste que limitaba el uso de la técnica. La producción de líquido de sustitución en el propio monitor (on-line), a partir del baño de diálisis, supuso sin duda un gran avance que permitió reducir costes y aumentar la capacidad de infundir grandes volúmenes de reposición (22,23).

La hemodiafiltración on-line (HDF-OL), tal y como se conoce en la actualidad, es una combinación de difusión con alto poder convectivo, empleando líquido de sustitución producido en el propio monitor, a partir del baño de diálisis. Requiere una sincronización precisa entre la bomba de ultrafiltración y la de reposición, para evitar cambios de volemia, y se realiza con dializadores de alta permeabilidad y eficacia. La infusión del líquido de sustitución puede realizarse antes o después del dializador (pre y post dilución). En la modalidad pre-dilucional se reduce notablemente el riesgo de coagulación del circuito al diluir la sangre antes de su entrada al dializador, no obstante, se pierde poder difusivo por la misma razón. La modalidad post-dilucional es la más empleada debido a que conserva el poder difusivo que permite la depuración de partículas pequeñas, pero produce hemoconcentración intradializador, aumentando el riesgo de coagulación del circuito. (Figura 4)

Figura 4. Modelo de HDF-OL pre y post dilución.



Tomado de Nefrología al día, Sociedad Española de Nefrología (24).

El estudio ESHOL (2013) demostró que la HDF-OL, alcanzando grandes volúmenes de reposición, reduce la mortalidad por cualquier causa respecto a la hemodiálisis convencional (25,26). Las guías de práctica clínica actuales recomiendan realizar HDF-OL, intentando llegar a volúmenes superiores a 21 litros por sesión en modo post-dilución y el doble para pre-dilución, teniendo en cuenta que la eficacia del modo pre-dilución siempre será menor (27,28).

- **Hemodiálisis extendida (HDx):** en los últimos años se ha desarrollado un nuevo tipo de membranas de diálisis con un punto de corte (*cut off* (CO) mayor, que permiten eliminar toxinas de mayor peso molecular de forma similar a las membranas utilizadas en el mieloma múltiple (high cut off), pero reteniendo la albúmina. Dichas membranas de punto de corte medio se emplean en dializadores diseñados para potenciar el transporte convectivo interno. De esta manera se consigue una depuración de moléculas medianas y grandes incluso superior a los dializadores de alto flujo (29).

1.3. Morbimortalidad en la ERC:

La ERC en estadios avanzados conlleva una reducción considerable de la calidad de vida y un aumento significativo de la morbilidad, el coste sanitario y social. La principal causa de mortalidad de los pacientes con ERC son las patologías cardiovasculares, infecciosas y neoplásicas. De hecho, se sabe que padecer ERC es un factor de riesgo

independiente de eventos cardiovasculares y que el riesgo se multiplica al combinarse con otras patologías clásicas como DM, HTA, obesidad etc.(31). A medida que disminuye el FGe, el riesgo cardiovascular se incrementa de forma lineal, llegando a duplicarse en pacientes con ERC estadio 3 y triplicarse en los estadios avanzados, incluida la diálisis. De igual forma, la presencia de albuminuria, incluso a niveles bajos se relaciona con un importante aumento de la mortalidad cardiovascular, tal y como se evidenció hace 2 décadas en el estudio PREVENT (32,33). El abanico de patologías cardiovasculares relacionadas con la ERC es amplio, desde ictus, vasculopatía periférica, fibrilación auricular y principalmente enfermedad coronaria e insuficiencia cardíaca. Durante mucho tiempo se asumió que la combinación de factores de riesgo clásicos con la ERC era el elemento clave, sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la sola presencia de ERC constituye un elemento de riesgo incluso más potente que la DM o HTA (34,35).

El mecanismo fisiopatológico que relaciona la ERC con una elevada mortalidad cardiovascular no está del todo claro. A los factores riesgo clásicos, se añaden otros propios de la ERC tales como la disfunción endotelial relacionada al estrés oxidativo, anemia, alteraciones del metabolismo mineral (calcificación vascular), retención hidrosalina, toxinas urémicas, etc. Solo por el hecho de padecer ERC, los pacientes son catalogados como de alto riesgo cardiovascular, por lo que está justificado el control estricto de los factores de riesgo clásicos (obesidad, HTA, tabaco, dislipemia,etc), y la revisión periódica de su salud cardiovascular (10,31)

La relación entre ERC y la incidencia de enfermedades neoplásicas no está aún bien definida. Se sugiere que, en estadios avanzados, los individuos con ERC tienen mayor incidencia de cáncer, llegando al punto máximo en aquellos en hemodiálisis (36). Se ha descrito la asociación de la ERC con ciertos tipos de tumor, especialmente renales, uroteliales, de pulmón, tracto digestivo y hematológicos (37,38). En 2016, un metaanálisis de 32.000 pacientes de 6 estudios distintos no encontró relación significativa entre la ERC y la incidencia global de neoplasias. Sin embargo, si se objetiva un incremento de ciertos tipos de tumores (uroteliales, tiroides, digestivos) en pacientes en hemodiálisis (37).

A pesar de que la evidencia no es del todo sólida, se han postulado ciertos mecanismos fisiopatológicos que pudieran vincular la afectación renal con el desarrollo de neoplasias. La disfunción inmunológica relacionada con la uremia podría favorecer el desarrollo de neoplasias relacionadas con virus, pudiendo estar influenciada por los tratamientos inmunosupresores de ciertas patologías que conducen a la ERC. Otros mecanismos sugeridos son las deficiencias nutricionales, la retención de toxinas urémicas potencialmente carcinogénicas, y sobre todo la interacción de estos elementos con los

factores de riesgo clásicos como el tabaco, rayos UV, enol, etc. Además de que la incidencia de neoplasias pudiera estar aumentada, hay que considerar que la mortalidad por cáncer en los pacientes con ERC es mayor, principalmente debido a la limitación del arsenal terapéutico por el compromiso de la función renal y al mayor riesgo y peor tolerancia a complicaciones.

1.4. Inflamación y toxinas urémicas:

El deterioro de la función renal trae consigo la retención de diversos solutos que de forma normal serían excretados por la orina. Algunas de estas sustancias ejercen una interacción perjudicial con distintos sistemas fisiológicos del organismo, son las denominadas toxinas urémicas. Pueden ser de origen exógeno (derivadas de la ingesta) o endógeno (derivadas del metabolismo), y hasta la fecha se han identificado cientos de productos de retención urémica, siendo imposible estudiar el efecto específico de la acumulación de cada uno de ellos (39). En pacientes con ERC avanzada, la única forma de eliminar toxinas urémicas es mediante la terapia renal sustitutiva. Es por ello que la clasificación más ampliamente utilizada se basa en su aclaramiento durante la hemodiálisis que a su vez está condicionado al tamaño molecular y la capacidad de unión a proteínas plasmáticas, dividiéndolas en tres grupos, (Tabla 4) (29).

Tabla 4. Clasificación de las toxinas urémicas y mecanismos de depuración.

	Moléculas pequeñas	Moléculas medias		Moléculas unidas a proteínas
		Medias	Grandes	
PM Daltons	< 500	500-15.000	15.000-60.000	
	Urea, creatinina, fósforo, oxalato, purinas, urato, guanidina.	Péptido natriurético atrial, endotelina, PTH; β 2 microglobulina, cistatina C.	Leptina, mioglobina, cadenas ligeras, interleucina 6, hepcidina, factor de necrosis tumoral α .	P-cresol sulfato, ácido indolacético, indoxil sulfato, pentosidina.
TDE/mecanismo depurativo	HD-LF, HD-HF/ difusión. HDF-OL, HDx/ difusión y convección.	HD-HF/difusión. HDF-OL, HDx/difusión y convección.	HDF-OL, HDx/difusión y convección.	Adsorción, HFR/ difusión, convección y adsorción.

HD-LF: hemodiálisis de bajo flujo.
 HD-HF: hemodiálisis de alto flujo.
 HDF-OL: hemodiafiltración en línea.
 HDx: hemodiálisis extendida.
 HFR: Hemofiltración con reinfusión de ultrafiltrado.
 PM: peso molecular.

Modificado de Pérez-García et al. 2021. (29)

Se trata de una clasificación arbitraria basada en los patrones de eliminación de las distintas moléculas, que posiblemente deberá adaptarse a las nuevas técnicas y membranas de hemodiálisis que aportan mejores perfiles de depuración (40–42).

La inflamación es una respuesta sistémica compleja ante estímulos que resultan dañinos. La ERC en estadios avanzados favorece un estado inflamatorio crónico, que constituye la piedra angular del aumento de la morbimortalidad por causas cardiovasculares y no cardiovasculares de estos pacientes. Los mecanismos que relacionan la uremia con la inflamación son complejos e incluyen fenómenos de inmuoactivación e inmunosupresión, asemejándose en muchos aspectos al proceso de envejecimiento natural (43).

En los estadios avanzados de deterioro de función renal existe una menor eliminación de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6) o factor de necrosis tumoral (TNF), lo cual favorece su acumulación. Además, se ha evidenciado cierto grado de sobreactivación del sistema inmunológico, específicamente monocitos, que incrementa la producción de dichos mediadores de forma similar al patrón secretor de interleuquinas propio de las células senescentes relacionadas con el envejecimiento, lo cual propicia un proceso de inflamación crónica de bajo grado (43–45).

Las alteraciones del metabolismo mineral óseo se relacionan estrechamente con el proceso de inflamación crónica. La pobre eliminación produce un aumento del fósforo inorgánico, y la hiperfosfatemia es capaz de inducir disfunción endotelial mediante la transformación de células musculares lisas en células similares a osteoblastos (*osteoblast like cells*), fenómeno fundamental en la calcificación vascular. El mecanismo regulatorio del metabolismo mineral en la ERC es complejo y comprende distintos ejes de interacción entre fósforo, vitamina D, PTH, FGF-23 y su cofactor Klotho (46,47).

Otra vía claramente relacionada con la inflamación urémica es la disfunción mitocondrial derivada del estrés oxidativo. Tal y como se discutirá más adelante, en la ERC existe un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos antioxidantes, afectando distintos procesos biológicos (48,49). El factor nuclear eritroide similar al factor 2 (NRF2) es un factor de transcripción que en situación de homeostasis se encuentra inhibido pero que, en situación de estrés oxidativo, codifica la síntesis de enzimas antioxidantes (50). La ERC se ha relacionado con una menor expresión de NRF2 que condiciona una disfunción mitocondrial, de nuevo similar a la que se produce de forma natural a edades avanzadas.

Se ha estudiado la relación entre determinadas toxinas urémicas y la inflamación. Se ha demostrado que el indoxil sulfato y p-cresil sulfato (toxinas urémicas unidas a proteínas

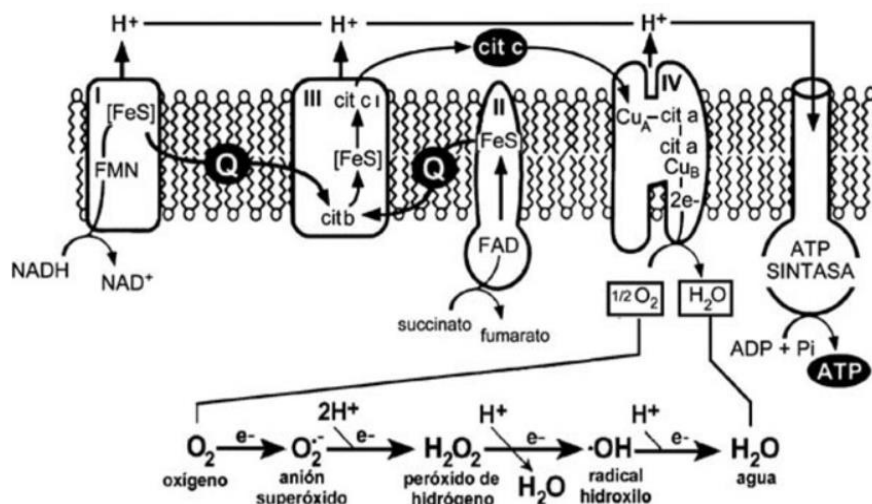
plasmáticas) inducen estrés oxidativo al producir disfunción mitocondrial, incremento de la autofagia mitocondrial y senescencia celular, vinculando la ERC con el envejecimiento acelerado. Un papel similar tienen los denominados productos de glicosilación avanzada (PGA), obtenidos durante el proceso de reducción de azúcares y otras biomoléculas de origen exógeno (dieta) o endógeno (hiperglucemia), cuya acumulación en la ERC se debe a la sobreproducción combinada con una menor eliminación. (51,52). En resumen, la inflamación urémica está mediada por una serie de mecanismos complejos influenciados por factores exógenos y endógenos, que son capaces de potenciarse entre sí, creando un entorno proinflamatorio crónico que conduce al envejecimiento celular acelerado con las respectivas consecuencias clínicas.

1.5. Estrés oxidativo.

La respiración celular es el proceso mediante el cual se degrada la glucosa para producir energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), consumiendo oxígeno y quedando como productos dióxido de carbono y agua. Está constituida por tres vías metabólicas principales: glucólisis, ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) y finalmente la fosforilación oxidativa (53).

Específicamente, la fosforilación oxidativa, también llamada cadena transportadora de electrones, consiste en el acoplamiento de dos reacciones de oxidación y fosforilación mediante un gradiente de protones en la membrana interna mitocondrial. Dicho proceso genera un pequeño porcentaje de metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos (con un electrón no apareado en su órbita) que se caracterizan por ser altamente inestables y tener mucha afinidad para interactuar con diversas moléculas. Tales metabolitos se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo el más importante el radical superóxido, que a su vez da origen a otras ROS como el peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, radical peróxido, etc. (Figura 5). Además de la generación endógena, también existen diversas fuentes exógenas de ROS, producto de la interacción medioambiental, como la contaminación del agua, ingesta de tóxicos (tabaco, drogas, fármacos), consumo de ciertos alimentos (carnes ahumadas, aceites reutilizados, etc.), radiación, entre otras (54). Las ROS pueden tener efectos deletéreos sobre otras moléculas, que van desde la ruptura de enlaces proteicos, daño de los fosfolípidos de las membranas celulares, e incluso afectación de los ácidos nucleicos que constituyen la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) (55–57).

Figura 5. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la respiración mitocondrial.



Tomado de Marotte et al.

Acta Bioquím Clín Latinoam 2013; 47 (4): 661-74 (58).

Dado que buena parte de la producción de ROS se debe a una vía metabólica natural y continua, es de esperar que el organismo haya desarrollado un modo de neutralizar sus efectos negativos. En efecto, existen diversos mecanismos antioxidantes que actúan de forma dinámica para mantener niveles de ROS compatibles con la función celular, los cuales se dividen en procesos enzimáticos y no enzimáticos. Los no enzimáticos son moléculas antioxidantes como la vitamina E, el ácido ascórbico, flavonoides, glutatión, bilirrubina, etc., y las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa, cuya expresión está modulada en sí misma por los niveles de ROS (59).

El denominado estrés oxidativo, no es más que el predominio del efecto deletéreo de las ROS, bien sea por un exceso de producción, déficit en los mecanismos antioxidantes o una combinación de ambas situaciones (49). Niveles elevados de estrés oxidativo se han relacionado con el desarrollo de patologías de muy diversa índole, tales como (59):

1. **Patologías cardiovasculares:** Diversos estudios relacionan el estrés oxidativo con el desarrollo de aterosclerosis, la cual constituye el pilar fundamental de las patologías cardiovasculares. Específicamente los niveles de lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) se han identificado como el principal responsable de su desarrollo. El incremento de oxLDL con la edad propicia la aterogénesis, especialmente en sujetos expuestos a un estado proinflamatorio y oxidativo (54,60,61).

2. **Enfermedades neurodegenerativas:** Se ha sugerido que el estrés oxidativo desempeña un papel en enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson. El tejido neuronal es particularmente susceptible a los efectos oxidativos de las ROS, y se conoce su relación con diversos mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, tales como el depósito de amiloide beta, la hiperfosforilación de la proteína tau, etc (62).
3. **Cáncer:** el daño oxidativo de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas puede ocasionar la disregulación de oncogenes y/o genes supresores de tumores, así como fallos en la señalización de vías de proliferación celular o en los mecanismos de reparación o relacionados con la apoptosis. De este modo el estado inflamatorio crónico (con alta producción de ROS) juega un papel crucial en el desarrollo y progresión de las patologías tumorales (63).
4. **Enfermedades respiratorias:** El estrés oxidativo está implicado en diversas patologías respiratorias como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis pulmonar (64).
5. **Enfermedades metabólicas:** La propia alteración del metabolismo de la glucosa en la diabetes mellitus (DM) representa una fuente de producción acelerada de ROS. El daño oxidativo puede alterar directamente a la célula beta pancreática, al mismo tiempo que produce disfunción endotelial, la cual es fundamental en la patogénesis de la micro y macroangiopatía. De hecho, las estrategias terapéuticas modernas contra la DM incluyen siempre fármacos con propiedades antioxidantes (65–67). Del mismo modo, diversos estudios han relacionado la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo con la lesión de los hepatocitos que conduce a la esteatosis hepática no alcohólica, la cual representa la forma más común de hepatopatía crónica (68,69).
6. **Enfermedad renal crónica:** el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la prevalencia y progresión de la enfermedad renal crónica por distintas vías. En primer lugar, los pacientes con ERC están en un estado inflamatorio crónico que incrementa la producción de ROS. Específicamente, la síntesis de aniones superóxidos impide la acción del óxido nítrico (ON), lo cual altera la capacidad de vasodilatación favoreciendo la hipertensión arterial. Por otra parte, la disfunción endotelial mediada por la oxidación modifica la permeabilidad vascular y lesiona las estructuras glomerulares propiciando la aparición de proteinuria y fenómenos ateroscleróticos. Finalmente, el daño oxidativo reduce la elasticidad de la membrana de los hematíes, disminuyendo así su vida media, lo cual, junto con la síntesis insuficiente de eritropoyetina, acaban favoreciendo la anemia característica de la ERC (54,70,71).

7. **Envejecimiento:** una de las principales teorías del envejecimiento sostiene que la acumulación de ROS durante los años induce la disfunción de los diversos órganos y sistemas en relación con la edad (72). Algunos fenómenos subyacentes al proceso de envejecimiento son el daño genómico, acortamiento telomérico, disfunción mitocondrial, entre otros. Existe evidencia suficiente para asegurar que ciertos hábitos dietéticos pueden regular dichos procesos y por ende atenuar los efectos del envejecimiento. En este sentido, la dieta mediterránea, el consumo de alimentos antioxidantes y la limitación de la ingesta calórica son elementos que pueden atenuar el daño oxidativo acumulado (73,74).

1.6. Daño genómico.

La molécula de ADN está constantemente expuesta a factores endógenos que producen daños en el ADN, entre ellos, los efectos deletéreos de los radicales libres y ROS así como al daño ocasionado por agentes medioambientales, tales como la radiación ultravioleta (UV), rayos X y otros agentes genotóxicos. Gracias a los mecanismos de reparación, la mayor parte del daño en el ADN se repara. El equilibrio entre inducción de daño y reparación es fundamental para preservar la estabilidad genómica (78). El daño genómico (DG) es un factor crucial en el desarrollo de procesos tan importantes como la carcinogénesis o en la patogénesis de diversas enfermedades que van desde patologías neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer o Parkinson, hasta la EPOC. Del mismo modo, ciertas patologías crónicas propician un estado inflamatorio sostenido que puede acentuar el daño oxidativo del ADN al mismo tiempo que afecta los mecanismos de reparación. En la actualidad existen numerosas técnicas de determinación del daño en el ADN, basadas en distintos principios bioquímicos y con innumerables aplicaciones en múltiples ámbitos relacionados con la salud humana y animal (80,81).

1.6.1. Métodos de medición del daño genómico.

A continuación, se explican los dos métodos de medición de daño genómico empleados en el presente estudio:

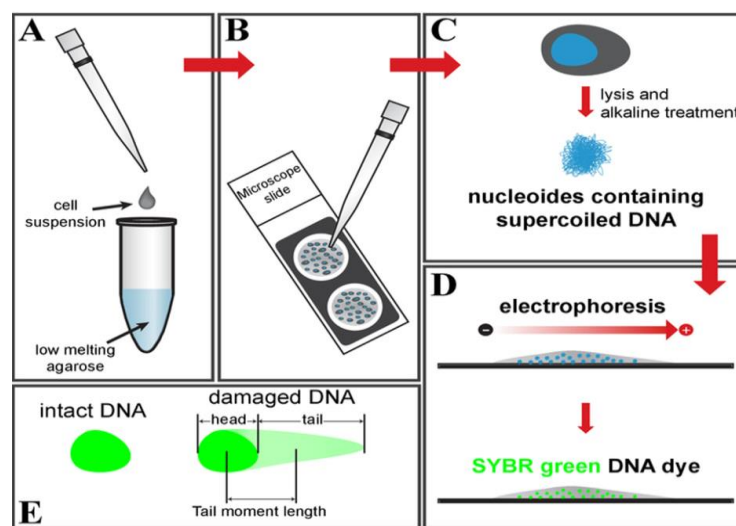
1. **Electroforesis en gel de célula simple (SCGE: Single cell gel electrophoresis) o Ensayo de cometa:** La electroforesis de célula simple fue introducida inicialmente como un método de valoración del daño del ADN por radiación (82), y posteriormente fue ganando popularidad hasta utilizarse en diversos campos como la toxicología, biomonitorización, eco-genotoxicidad, estudios de mecanismos de reparación del ADN, genotoxicidad de nanomateriales, etc (83–86). En el ámbito de la virología, el

SCGE es considerado el "gold standard" para el estudio del proceso oncogénico relacionado con ciertos virus (87). Debido a su gran versatilidad, la técnica ha sido estandarizada, y actualmente forma parte del conjunto de pruebas de validación para el desarrollo de nuevos fármacos, y es considerada un test de primera línea en la evaluación del potencial mutagénico de distintos productos (84,88,89).

El ensayo de cometa puede realizarse en cualquier célula, y es una técnica simple, relativamente rápida y económicamente accesible. Permite detectar la ruptura de ADN de simple y de doble cadena, así como las porciones álcali sensibles en el núcleo. La técnica se basa en la migración de los fragmentos rotos del ADN sobre un campo eléctrico en un medio generalmente alcalino (90).

La molécula de ADN se dispone dentro del núcleo formando bucles mediante la unión a las proteínas de la matriz nuclear, que a su vez están superenrollados alrededor de núcleos de proteínas, dando lugar a los nucleosomas. Durante el ensayo de cometa se lleva a cabo un paso de lisis de dichas proteínas, tras el cual la molécula de ADN debería permanecer superenrollada. Si existen rupturas del ADN simples o de doble cadena, la molécula se relaja y los bucles son atraídos hacia el ánodo durante la electroforesis, dando lugar a la característica imagen de cola de cometa (91,92). Mediante una tinción fluorescente se obtienen de imágenes de la cola y del núcleo del cometa permite cuantificar el ADN dañado.

Figura 6. Esquema ensayo de cometa.

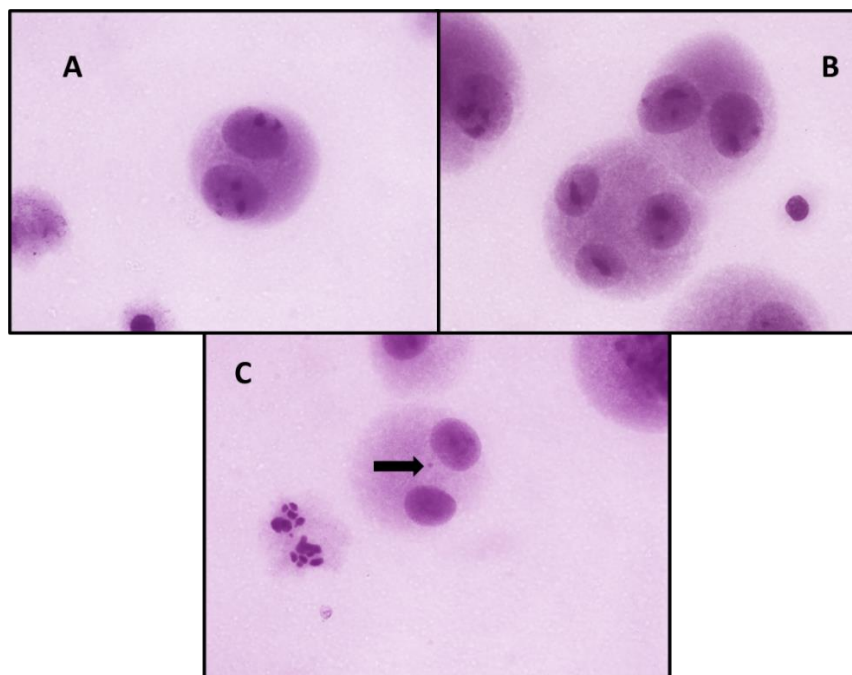


Miller et al. 2019. (93).

Se han introducido ciertas modificaciones a la técnica original. De estas, la más reportada consiste en utilizar enzimas bacterianas (endonucleasa III (Endo III) o formamidopirimidina ADN glicosilasa, (FPG)) que actúan como glicosilasas y son capaces de reconocer pirimidinas oxidadas, o purinas modificadas (8-oxoGua), cortando el ADN y relajando la molécula, lo cual permite determinar daño oxidativo (49,94–96). Gracias a la versatilidad del ensayo del cometa, ciertas modificaciones permiten detectar reparación, enlaces cruzados o apoptosis (97).

Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN Assay): El ensayo de micronúcleos es un método ampliamente utilizado, tanto en estudios de genotoxicidad in vitro, como en estudios de biomonitorización de poblaciones potencialmente expuestas a genotóxicos, y constituye de por sí un buen marcador subrogado de riesgo de cáncer (98,99). Los micronúcleos (MN) son agregados de cromatina que aparecen cerca del núcleo principal durante la interfase de la división celular, y se originan a partir de cromosomas enteros o fragmentos cromosómicos que no consiguen completar el proceso de segregación hacia los polos celulares durante la mitosis. Pueden formarse por dos mecanismos: rupturas cromosómicas (clastogénesis) o disrupción del aparato mitótico (aneugénesis) (99,100). La presencia de MN se describió por primera vez hace más de cien años en el estudio de eritrocitos, relacionándose con ciertas condiciones tales como la anemia de células falciformes, la exposición a radiación ionizante o déficit de folatos o vitamina B12 (101,102). Posteriormente se demostró la expresión de MN en células de la médula ósea y linfocitos periféricos maduros. El estudio de MN en linfocitos periféricos es el más extendido en la actualidad, junto al ensayo del cometa, para detectar daño genotóxico en poblaciones expuestas en entornos laborales o médicos (103). (Figura 7).

Figura 7. Micronúcleos.



A: célula binucleada sin micronúcleos. **B:** células bi y trinucleadas obtenidas mediante bloqueo de la citocinesis. Sin micronúcleos. **C:** célula binucleada con micronúcleo.

Cortesía Dra. Susana Pastor, Laboratorio de Mutagénesis UAB.

Para la aparición de MN es indispensable que se haya completado el proceso de división celular. En el estudio de linfocitos cultivados en laboratorio, es difícil distinguir los que han completado la mitosis (y por ende podrían haber originado MN) de aquellos que no han iniciado el proceso de división, por lo que la determinación de MN sería imprecisa. El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (*CBMN*) permite identificar MN específicamente en células que hayan completado la mitosis. La técnica consiste en inducir la división celular y detener la citocinesis. Esto se consigue gracias al bloqueo de la formación de los microfilamentos de actina lo cual evita la división del citoplasma. De este modo, los MN son analizados sólo en las células que han dividido el núcleo y por lo tanto tienen aspecto binucleado. El bloqueo de citocinesis y selección de células binucleadas se consigue tratando los cultivos celulares con citocalasina B (Cyt-B), un metabolito obtenido del hongo *Drechslera dematioidea* (104). Dicho método ha permitido estudiar otros fenómenos relacionados con la división nuclear, tales como la formación de puentes de cromatina o *nuclear buds* (yemas nucleares) que traducen inestabilidad cromosómica o defectos en los mecanismos de reparación del ADN, relacionándose al final con el proceso de mutagénesis (105,106) Se ha visto una gran correlación entre mortalidad y los

resultados de CBMN por lo que este biomarcador de efecto es uno de los más estudiados y utilizados en estudios de biomonitorización.

1.6.2. Daño genómico y ERC:

La ERC es una patología claramente relacionada con una carga elevada de estrés oxidativo y la coincidencia de múltiples factores que incrementan el daño genotóxico, además de una capacidad reducida de reparación del ADN, lo cual trae como consecuencia la acumulación de daño genómico (57,107–109). Los niveles elevados de daño genómico se han asociado con la alta incidencia de patologías cardiovasculares y neoplásicas observada en dichos pacientes, por lo que es imprescindible contar con biomarcadores que permitan estimar el nivel del daño e incluso establecer posibles estrategias terapéuticas (110–112).

En las últimas dos décadas, múltiples estudios han intentado establecer la relación entre daño genómico y ERC, especialmente en pacientes en hemodiálisis, asociándolo con eventos clínicos de morbimortalidad y finalmente buscando posibles estrategias terapéuticas para combatirlo. En este sentido, Stoyanova et al. objetivó en 2010 que los niveles de daño genómico medidos por SCGE (EndoIII/FPG) se incrementa conforme disminuye el FGe, siendo su máximo nivel en los pacientes en hemodiálisis (98) . Posteriormente, Sandoval et al. describió que los pacientes con ERC y en HD tienen una mayor sensibilidad a la radiación ionizante, lo cual traduce una menor capacidad de reparación del ADN (78). En 2013 Coll et al., en un estudio de 123 pacientes en hemodiálisis, consiguió demostrar que el nivel de daño genómico medido por SCGE (EndoIII/FPG) se asocia de forma independiente con una mayor mortalidad por cualquier causa (113)

También se ha relacionado el daño genómico con la técnica de diálisis, demostrándose en varios estudios que el cambio de HD convencional a HDFOL disminuye el daño del ADN medido por SCGE (EndoIII/FPG) y CBMN (114,115). En el mismo sentido se han estudiado opciones terapéuticas con resultados interesantes. En 2008 Stopper et al. estimó que la suplementación de vitamina B12 y ácido fólico reduce el daño genómico (116), al igual que se ha demostrado que el consumo regular de zumo de uva fermentado (mosto), rico en flavonoides, disminuye el daño oxidativo (117). Finalmente, Rodríguez-Ribera et al. demostraron en 2017 que el uso de membranas de diálisis recubiertas con vitamina E reducen el daño genómico medido por SCGE (EndoIII/FPG) y por CBMN (118). En la tabla 5 se resumen los principales estudios relacionados con daño genómico y ERC/hemodiálisis en las últimas dos décadas.

Tabla 5. Principales publicaciones relacionadas con daño genómico y ERC en los últimos 20 años.

AUTOR/AÑO	POBLACIÓN	OBJETIVOS	MEDICIÓN DG	RESULTADOS
<i>Schupp et al.</i> 2006 (114)	24 pacientes en HD.	Relacionar DG y técnicas de HD.	SCGE EndoIII/FPG CBMN	Cambio de HD a HDFOL disminuye DG. HD diaria disminuye DG.
<i>Stopper et al.</i> 2008 (116)	27 pacientes en HD	Relación en suplementación de VitB12 y folatos con DG.	CBMN	Reducción de DG al suplementar vitB12 y folato.
<i>Stoyanova et al.</i> 2010 (49).	253 pacientes con ERC	Relación entre DG y ERC.	SCGE EndoIII/FPG.	Aumento de DG con el incremento de creatinina. Nivel máximo al inicio de diálisis.
<i>Sandoval et al.</i> 2012 (78).	227 pacientes con ERC	Relación entre inestabilidad genómica y radiosensibilidad en ERC.	CBMN en linfocitos expuestos a radiación.	Mayor radiosensibilidad (menor capacidad de reparación del ADN) en ERC y HD.
<i>Coll et al.</i> 2013 (113).	123 pacientes en HD	Relación entre daño genómico y mortalidad.	SCGE EndoIII/FPG.	DG elevado se asocia a mayor mortalidad por cualquier causa.
<i>Rodríguez-Ribera et al. 2014</i> (119).	70 pacientes en HD	Relación entre DG y tiempo en diálisis.	CBMN CBMN en linfocitos irradiados.	Disminución del DG a mayor tiempo en HD.
<i>Stoyanova et al.</i> 2014 (120).	106 pacientes en HD	Relación entre capacidad de reparación del ADN y daño genómico.	SCGE EndoIII/FPG	Pacientes con DG elevado tienen una capacidad de reparación del ADN significativamente menor.
<i>Corredor et al.</i> 2015 (57).	602 pacientes en distintos estadios de ERC	Relación entre DG y ERC.	SCGE EndoIII/FPG	DG mayor en ERC que en controles sanos. Mayor daño oxidativo en HD que preHD.
<i>Corredor et al.</i> 2016 (117).	39 pacientes en HD	Relación entre DG y suplementación con jugo de uva no fermentado.	SCGE EndoIII/FPG.	Disminución del daño oxidativo en el grupo suplementado.

Rodríguez-Ribera et al. 2015 (107).	373 pacientes con ERC. 179 controles.	Relación entre ERC, inestabilidad genómica y sensibilidad a la radiación ionizante.	CBMN	Mayor inestabilidad genómica y radiosensibilidad en los pacientes con ERC.
Rodríguez-Ribera et al. 2016 (121).	33 pacientes en HD.	Relación entre DG y cambio de HD a HDF-OL.	CBMN	Reducción significativa del DG al cambiar de HD a HDF-OL.
Rodríguez-Ribera et al. 2017 (118).	46 pacientes en HD	Relación entre DG y membranas de diálisis recubiertas con vitamina E.	SCGE EndoIII/FPG CBMN	Disminución del DG al utilizar membranas recubiertas con vitamina E.
Corredor et al. 2017 (122).	50 pacientes post trasplantados renales.	DG en el postrasplante renal.	SCGE EndoIII/FPG CBMN	Incremento del DG en el postrasplante renal a los 6 y 12 meses.
Pastor et al. 2018 (123).	127 pacientes ERC. 140 controles	Relación entre daño genómico y polimorfismos de la Glutathion S Transferasa (GST)	CBMN	Los polimorfismos de GST afectan la frecuencia de MN
Pastor et al. 2018 (124).	214 pacientes en HD.	Relación entre tratamiento con Carnicor, hierro sacarosa y sevelamer con DG.	SCGE EndoIII/FPG. CBMN	La administración de carnivor incrementó de forma significativa el DG.
Corredor et al. 2016 (115).	49 pacientes en HD	Relación entre DG y cambio de HD a HDFOL	SCGE EndoIII/FPG CBMN	Disminución del DG al cambiar de HD a HDFOL.

HD: hemodiálisis, **HDF-OL:** hemodiafiltración en línea, **DG:** daño genómico, **Endo III:** Endonucleasa III, **FPG:** formamidopirimidina ADN glicosilasa, **CBMN:** ensayo de micronucleos con bloqueo de la citocinesis, **ERC:** enfermedad renal crónica.

1.7. Microplásticos y salud humana.

El término “plástico” abarca una amplia gama de productos sintéticos o semisintéticos compuestos por polímeros orgánicos combinados con aditivos químicos que les confieren ciertas propiedades, como la resistencia al calor o a la radiación ultravioleta, transparencia, dureza, etc. (125). Debido a su alta versatilidad, desde su descubrimiento, rápidamente han sustituido a otros materiales como la madera, cristal o metales, por lo que la industria del plástico ha presentado un crecimiento exponencial. De hecho, la producción mundial de plástico se ha incrementado de 1.7 a 360 millones de toneladas en los últimos 70 años, mejorando en muchos aspectos la calidad de vida, e infiltrándose en el día a día de la especie humana (126,127). Los plásticos son altamente resistentes a la degradación, por lo que

pueden permanecer en el ambiente durante décadas. La enorme producción, combinada con una baja tasa de reciclaje y mal manejo de los residuos, hace que cada año cientos de millones de toneladas de plástico se viertan al medio ambiente y se acumulen continuamente. De este modo, los residuos inertes están expuestos a distintos agentes físicos o químicos como la radiación ultravioleta, corrientes marinas, viento, biodegradación, etc. que producen su fragmentación en partículas de baja densidad capaces de migrar hasta entornos remotos, con lo que acaban siendo ubicuos (128,129).

De acuerdo con su tamaño, las partículas de plástico menores a 1 μm se denominan nanoplásticos (NPLs), y las comprendidas entre 1 μm y 1 mm, microplásticos (MPLs). Según su origen los micro y nano plásticos (MNPLs) pueden ser primarios, cuando se han sintetizado expresamente de ese tamaño, o secundarios, cuando son producto de la degradación de partículas más grandes (126). La omnipresencia de los MNPLs ha suscitado cada vez más preocupación en la comunidad científica, especialmente por su interacción con prácticamente todos los ecosistemas y especies conocidas, y su irrupción en la cadena alimenticia a todos los niveles (130,131). Las principales vías de exposición de los seres humanos a los MNPLs son: la ingestión de alimentos contaminados, inhalación de partículas o contacto dérmico.

Se han descrito efectos negativos de los MNPLs sobre diversas especies, principalmente relacionados con la liberación de monómeros o aditivos que tienen un probado efecto tóxico, disruptor endocrino o carcinogénico (126). Por otra parte, los MNPLs pueden unirse a otros tóxicos, como metales pesados, o actuar como vector de ciertos microorganismos. No obstante, aún no se dispone de suficiente evidencia sobre los efectos biológicos de los MNPLs en mamíferos, y la que existe es contradictoria (133–135). En general, se asume que el riesgo potencial de los MNPLs se incrementa conforme disminuye el tamaño de la partícula, y se ha demostrado por ejemplo la capacidad de los NPLs para atravesar el epitelio intestinal y generar citotoxicidad y daño oxidativo del ADN, (136,137). (138).

La diversidad en las fuentes de plástico y los mecanismos de degradación, hacen que los MNPLs tengan una amplia variedad de propiedades físicas, químicas y biológicas. La estandarización de un método de análisis de los MNPLs es uno de los principales retos de los investigadores actualmente, debido a la compleja naturaleza de los mismos en diversos aspectos (126):

- Amplio rango de tamaño.
- Distintas composiciones y tipos de polímeros.
- Distintas formas (esféricas, irregulares, fibras, etc).

- Diversos aditivos (pigmentos, estabilizantes, retardantes) o tóxicos adheridos (metales pesados, etc).
- Diferentes estados de envejecimiento, carga eléctrica de la superficie.

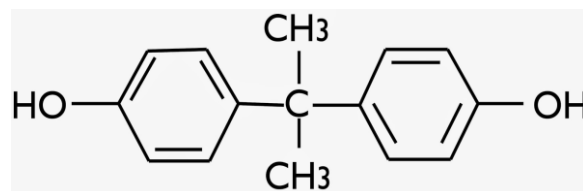
A pesar de los esfuerzos recientes, aún no se cuenta con una técnica que cumpla con los requisitos necesarios para detectar MNPLs, por lo que su estudio se sigue basando, principalmente, en la determinación de compuestos o aditivos liberados desde las partículas de plástico, que indican de forma indirecta la presencia de microplásticos. Entre dichos compuestos, quizás el más extendido es el estudio de los bisfenoles, en el cual se centra el presente trabajo.

1.8. Bisfenol A:

1.8.1. Historia y contexto actual.

El bisfenol A (BPA) es un compuesto químico que ha desempeñado un papel significativo en la fabricación de plásticos y resinas desde principios del siglo XX. Sintetizado por primera vez en 1891 por el químico ruso Aleksandr Dianin, está formado por la combinación de dos radicales fenol y una molécula de acetona (4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane) (139) (Figura 8). Inicialmente se desconocía del todo sus propiedades, y no fue hasta la década de los treinta cuando emergió su posible efecto estrogénico y se exploró su acción como xenoestrógeno. Su papel en este ámbito fue rápidamente desplazado al descubrir la mayor potencia estrogénica del dietilestilbestrol y dos décadas después, en los años 50, su valor comercial cobró fuerza al incorporarlo en el proceso de fabricación de distintos plásticos (140,141).

Figura 8. Estructura química del Bisfenol A.



Desde entonces el uso de BPA para la fabricación de policarbonato se fue extendiendo debido a su versatilidad para conferir a los plásticos dureza, transparencia, ligereza y resistencia a la torsión y temperatura (142). Poco a poco se fue incorporando en la fabricación de diversos materiales empleados en la vida cotidiana y en la década de los 70

ya era mundialmente utilizado. Sin embargo, a medida que aumentaba el uso del BPA, también surgieron preocupaciones sobre sus posibles efectos en la salud. A partir de la década de los noventa, varios estudios científicos empezaron a sugerir que el BPA podría migrar desde los envases de polycarbonato a los alimentos y bebidas, lo que llevó a una mayor atención sobre sus posibles efectos disruptores endocrinos (143). Progresivamente se ha ido acumulando evidencia a favor de los posibles efectos deletéreos del BPA en la salud humana, lo cual ha llevado a las distintas agencias gubernamentales relacionadas con la salud pública a regular su uso. En la figura 9, se resumen los principales hitos en la evolución de las medidas restrictivas del uso de BPA a nivel mundial:

Figura 9.

Evolución de las medidas restrictivas del uso de BPA a nivel mundial
1990s: surgen las primeras preocupaciones sobre la seguridad del BPA basadas en estudios científicos que sugieren la migración de BPA desde productos de polycarbonato a alimentos y bebidas.
2008: Canadá clasifica al BPA como una sustancia tóxica y prohíbe su uso en biberones de plástico.
2010: la FDA de los Estados Unidos emite una declaración de seguridad sobre el BPA, indicando que no hay suficiente evidencia para respaldar restricciones en su uso, pero sigue evaluando la situación.
2011: Francia prohíbe la fabricación, importación y comercialización de envases alimentarios que contengan BPA.
2012: la Unión Europea prohíbe el uso de BPA en la fabricación de biberones.
2018: la Unión Europea restringe aún más el uso del BPA al prohibirlo en la fabricación de envases de alimentos destinados a lactantes y niños pequeños. Además, se establecen límites más estrictos para la migración de BPA en materiales plásticos en contacto con alimentos.
2020: Canadá clasifica formalmente al BPA como una sustancia "nociva" y establece límites más estrictos para su presencia en productos de consumo.

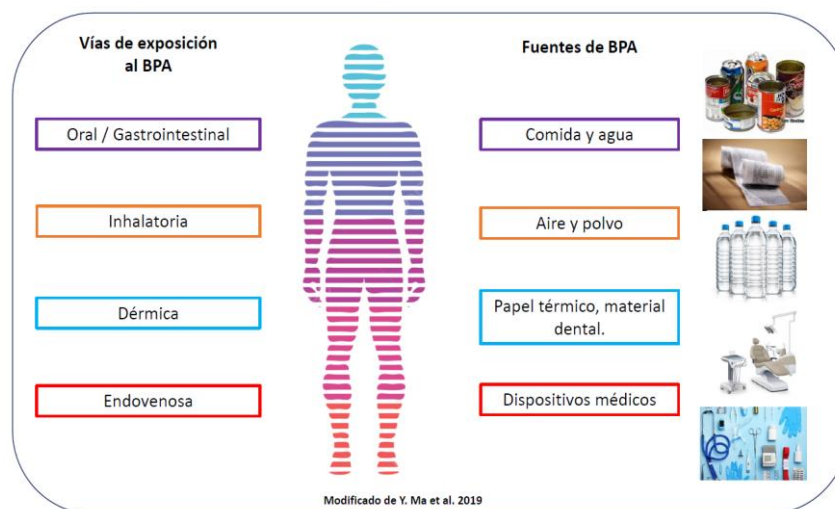
BPA: Bisfenol A.
 FDA: Food and Drug Administration

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority (EFSA)) también ha ido modificando sus regulaciones de acuerdo a la evidencia científica existente. En 2015 se estableció una ingesta diaria tolerable (IDT) de BPA de $4\mu\text{g}$ por kilogramo de peso por día ($\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{d}$), y se determinó que el nivel de exposición a BPA por vías alimentarias y no alimentarias no representaba un problema de salud en la población, independientemente de la edad. En 2022 se llevó a cabo una re-evaluación del riesgo y exposición al BPA basada en la nueva evidencia y finalmente se publicó un dictamen oficial de la EFSA en abril de 2023 en el que se establece un IDT de BPA de $0.2\text{ ng}/\text{Kg}/\text{d}$, que es 20.000 veces menor que el IDT recomendado en 2015, y que lleva a concluir que la exposición diaria a BPA por distintas vías representa un problema de salud pública (144,145).

1.8.2. Vías de exposición a BPA.

Los seres humanos están expuestos a diversas fuentes de BPA, casi todas cotidianas y ubicuas. La exposición ocupacional de los trabajadores de la industria del plástico, la contaminación medioambiental del agua, suelo, cultivos y atmósfera, son vías relevantes de exposición a BPA. No obstante, la ingesta oral de alimentos y productos “contaminados” con BPA proveniente de sus envases, es la principal fuente reconocida en la actualidad y la que suscita mayor preocupación y esfuerzos de investigación. (146,147). (figura 10)

Figura 10. Vías de exposición y fuentes de BPA.



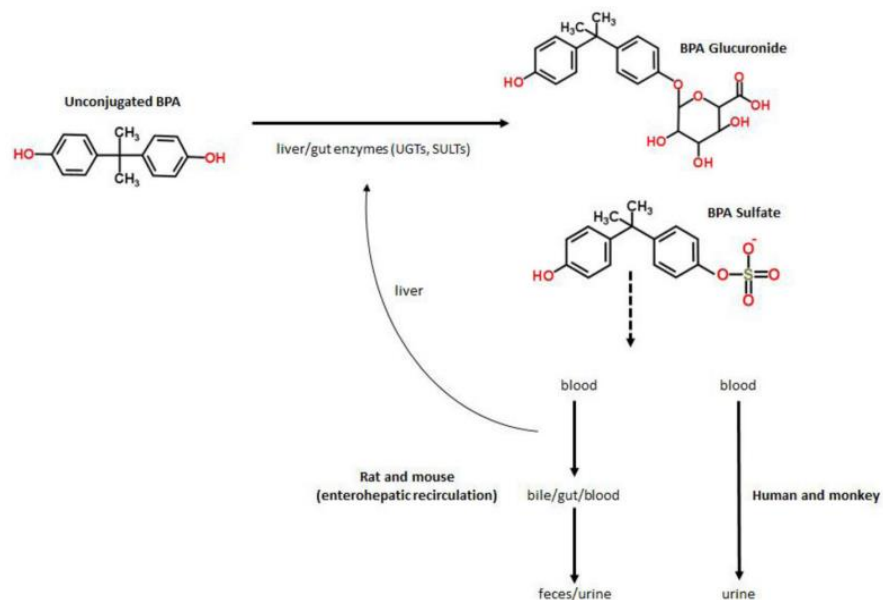
Múltiples estudios han establecido una relación directa entre el consumo de alimentos enlatados y la elevación de la excreción urinaria de BPA (139,148,149). La migración de plásticos desde los envases a la comida se ve favorecida por la temperatura, pH extremos, microondas y tiempo de contacto. Por tal razón se han establecido unos límites de migración específicos (Specific Migration Limit (SML)) para regular el umbral de seguridad de un determinado material. Para considerar seguro un plástico de cualquier tipo que esté en contacto con alimentos, este debe tener un SML inferior a 60 mg/kg-1 de alimento (150). El SML para el BPA establecido por la EFSA es de 0.6 mg/kg de alimento, lo cual garantiza una exposición que se situaría por debajo de la IDT fijada en el último dictamen (144,146). A pesar de la gran acumulación de evidencia acerca de los potenciales efectos deletéreos del BPA y sus análogos sobre el ser humano, no existe aún una clara prohibición de su uso especialmente en el envasado de alimentos. Este hecho probablemente obedece a que no

hay ensayos clínicos en grandes poblaciones, la semivida corta y el impacto económico de su prohibición.

1.8.3. Metabolismo del BPA.

El BPA entra en el torrente sanguíneo tras la ingesta oral, y sufre rápidamente un metabolismo de primer paso en intestino e hígado. Posteriormente es metabolizado por dos vías: glucuronidación y conjugación con sulfato. Ambas vías generan metabolitos hidrosolubles del BPA que son eliminados rápidamente por vía urinaria con una vida media de 5 horas aproximadamente (151,152) (Figura 11). En el torrente circulatorio presenta un 75 % de unión a proteínas plasmáticas, lo cual es de gran importancia al condicionar su eliminación mediante técnicas de hemodiálisis (153–155). Debido a su eliminación casi total por vía renal, la población con ERC es objeto de especial preocupación e interés, por cuanto se ha demostrado que pueden tener niveles elevados de BPA al comportarse como una toxina urémica de origen exógeno.

Figura 11. Toxicocinética del BPA.



Thayer et al. 2015 (151)

1.8.4. Efectos de la exposición a BPA.

Existe una clara y abundante evidencia sobre los efectos perjudiciales de la exposición al BPA, *in vitro*, *in vivo*, en modelos animales y en ensayos con humanos. Está catalogado como un disruptor endocrino, al tener la capacidad de estimular o alterar diversas vías hormonales, a pesar de que su afinidad por el receptor estrogénico es mil veces menor que la de los estrógenos naturales como el dietilestilbestrol (143,156–159).

En las últimas décadas, diversos estudios han demostrado la relación del BPA con la activación celular de vías inflamatorias, sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo. (160,161). Los efectos negativos del BPA observados en modelos animales se correlacionan bastante bien con los estudios hechos en humanos. A pesar de que la principal preocupación siempre ha sido el efecto del BPA sobre el desarrollo perinatal y la fertilidad, con el tiempo se ha acumulado evidencia de su afectación en prácticamente todos los órganos y sistemas (162).

- Reproducción: se ha demostrado que el BPA es capaz de alterar la espermatogénesis, incluso a dosis bajas (163), de la misma forma en que se ha relacionado con diversos mecanismos que contribuyen a la infertilidad femenina (esteroidogénesis, foliculogénesis, morfología ovárica y uterina, etc) (164).
- Sistema endocrino: se ha demostrado su efecto directo sobre la célula beta pancreática, con un potencial efecto diabético. También tiene la capacidad de impedir la liberación de adiponectina y favorecer un entorno de interleucinas pro inflamatorias en el tejido adiposo que impide la lipólisis y favorece el desarrollo de obesidad (165).
- Sistema cardiovascular: se ha relacionado el BPA con patologías cardiovasculares de distinta índole, desde arritmias hasta miocardiopatía hipertrófica, siguiendo distintas vías fisiopatológicas, como la unión directa a canales de calcio, la sobreproducción de neuropéptido Y, o la disfunción endotelial derivada del estrés oxidativo (165,166).
- Carcinogénesis: el estrés oxidativo y daño genotóxico inducido por BPA se ha relacionado con la mutagénesis y por lo tanto con un mayor riesgo de desarrollar ciertas neoplasias. Específicamente se ha asociado a tumores neurológicos y cáncer de mama (167,168).
- Neurodesarrollo y neurodegeneración: diversos modelos animales y celulares *in vitro*, han relacionado la exposición temprana e incluso transgeneracional al BPA con alteraciones conductuales y del neurodesarrollo infantil, así como con patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple (169,170).

1.8.5. BPA y ERC, causa y consecuencia.

Es de esperar que los pacientes con algún grado de compromiso de su función renal tengan niveles más elevados de BPA en sangre. De hecho, se ha demostrado una correlación negativa entre niveles de BPA y FGe, especialmente a partir del estadio 3 de la ERC, alcanzando niveles máximos en los pacientes en hemodiálisis en los que la diuresis suele desaparecer (142,171,172).

La acumulación de BPA, conforme progresa la ERC, viene acompañada de los potenciales efectos sistémicos ya descritos, no obstante, también se ha demostrado que el propio BPA constituye un agente nefrotóxico. En 2012 un estudio realizado en China a 3055 individuos relacionó exposición a BPA con albuminuria de bajo grado, incluso con función renal preservada (173). En modelos animales, se ha demostrado que el BPA puede inducir apoptosis de podocitos, además de incrementar la síntesis de moléculas clásicamente relacionadas con la esclerosis glomerular (p27kip1, TGF β , colágeno IV, etc) (171,174). Un estudio reciente realizado en cultivos de podocitos humanos tratados con BPA ha sugerido que el mecanismo fisiopatológico subyacente podría ser una alteración en la adhesión podocitaria tras la exposición a dosis altas de BPA, determinada por la alteración de proteínas clave del citoesqueleto (tubulina, podocina, vinculina, cofilina-1, etc.) (175).

También se ha vinculado la exposición a dosis crecientes de BPA con la aparición de hipertensión arterial y disfunción endotelial en modelos animales, mediados por la activación de genes relacionados con la regulación vascular (angiotensina II y calcio-calmodulina cinasa II), así como por la menor producción de óxido nítrico (ON) y el predominio de las especies reactivas de oxígeno (171).

La lesión podocitaria conduce a la proteinuria, que es el principal factor de progresión de ERC conocido, por lo que los niveles de BPA pueden constituir un nuevo indicador pronóstico de la ERC. Un estudio prospectivo de 302 pacientes con HTA esencial consiguió demostrar que los niveles basales de BPA tenían una fuerte correlación con la velocidad del descenso del FGe durante un periodo de seguimiento de 6 años, sugiriendo que el BPA puede ser un marcador predictor de progresión de ERC independiente de otros factores clínicos (176). Otro estudio del mismo equipo investigador obtuvo resultados similares al evaluar el posible efecto predictor del BPA en la evolución de la ERC en paciente con DM 2 (177).

1.8.6. BPA y diálisis.

El BPA se comporta como una toxina urémica exógena, acumulándose según disminuye la función renal, y su propia acumulación tiene un efecto nefrotóxico. Este círculo de retroalimentación se amplifica en los estadios más avanzados de la ERC, alcanzando su máximo nivel en los pacientes en diálisis. Además, la propia técnica de hemodiálisis implica el contacto de la sangre con materiales sintéticos que pueden contener bisfenoles, por lo que los pacientes estarían constantemente expuestos a una fuente directa de BPA. De hecho, en 2015 el Comité Científico Sobre Riesgos Sanitarios Emergentes y Recientemente Identificados (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR)) concluyó que existe un riesgo sanitario por la exposición sistémica al BPA, especialmente en pacientes en hemodiálisis (178).

En el caso de los dializadores en BPA puede encontrarse en la propia membrana, o en las carcasas de policarbonato (PC) (140). La migración del BPA al torrente sanguíneo se ve favorecida por el hecho de que el polímero de plástico está en contacto directo con la sangre durante la técnica de hemodiálisis. Diversos estudios han analizado el contenido de BPA en el efluente de líquido de diálisis para intentar aclarar los patrones de migración del mismo. Así, Murakami et al. demostraron la presencia de BPA en muestras de distintas fibras huecas de dializadores tratadas *in vitro* con disolventes, observando niveles especialmente elevados en fibras de Polisulfonas (PS) y *Polyester-polymeralloy (PEPA)* (140). Del mismo modo, en 2001 Yamasaki et al. demostró la presencia de BPA en el efluente de distintos tipos de dializadores, estableciendo que la mayor migración ocurre en aquellos con carcasas de PC, independientemente de la membrana y que la peor combinación en este sentido es la de PS con carcasa de PC (179–181).

La elevada unión del BPA a proteínas plasmáticas hace que solo la fracción libre (5-25%) sea capaz de atravesar la membrana del dializador. En este sentido se ha postulado que la HDF-OL, que combina difusión con alto poder convectivo, podría ser superior en cuanto a la eliminación de BPA. En 2017, Quiroga et al. demostraron que la HDF-OL es capaz de reducir los niveles de BPA en una sola sesión de forma significativamente mayor que la hemodiálisis convencional (182). No obstante, un estudio reciente realizado en 64 pacientes con ERC en HD, concluye que la HD es poco efectiva en la depuración de BPA, independientemente de la técnica utilizada (HD convencional o HDF OL) (147). En la tabla 6 se resumen los principales estudios sobre los efectos del BPA sobre el riñón.

Tabla 6. Principales publicaciones sobre los efectos del BPA en el riñón.

BPA en orina y oligoalbuminuria	BPAo > 1,4 mg/l: 23% de aumento de albuminuria.	<i>Li et al. Kidney Int, 2014.</i>
BPA en orina y oligoalbuminuria en niños.	Aumento de 0,28 mg/g de MA por cada unidad de BPAo.	<i>Transande et al., Kidney Int, 2013.</i>
BPA podocitopatía en modelos animales.	BPA ip 50mg/kg induce proteinuria, hiperfiltración glomerular y podocitopenia.	<i>Olea-Herrera et al., Cell Physiol, 2014.</i>
BPA e hipertensión.	Correlación entre BPA e HTA en el estudio NHANES.	<i>Shankar et al., Environ Public Health, 2012.</i>
BPA y progresión de DM tipo II.	BPA sérico: correlación negativa con FGe.	<i>Hu et al., Acta Diabetológica, 2015.</i>
BPA y función renal.	BPA sérico: correlación inversa con el FGe.	<i>Krieter et al., Artif Organs, 2013.</i>
BPA sérico en HD.	15 pacientes en HD, aumento de BPA con PS.	<i>Murakami et al., Blood Purif, 2007.</i>
BPA sérico y tipo de dializador.	BPA aumenta con PS y disminuye con PN.	<i>Bosch, J Am Soc Nephrol, 2015.</i>
BPA sérico, inflamación y oxidación en HD.	BPA aumenta la inflamación y oxidación en células mononucleares.	<i>Bosch, J Am Soc Nephrol, 2015.</i>

BPA: Bisfenol A, **BPAo:** Bisfenol A en orina, **FGe:** filtrado glomerular estimado, **DM:** diabetes mellitus, **MA:** microalbuminuria, **PS:** polisulfona, **PN:** polinefrona. (140,172–174,177,181,183,184)

Tradicionalmente se había puesto el foco en el BPA proveniente de los materiales del dializador. Sin embargo, en 2016 Bacle et al. demuestran la presencia de BPA en el agua ultrapura utilizada para la producción del líquido de diálisis, describiendo así otra fuente de exposición sistémica al BPA (185). La interacción del BPA con ciertos desinfectantes clorados utilizados en la esterilización del agua puede dar lugar a los llamados Derivados Clorados del BPA (ClxBPA) que podrían tener efectos metabólicos similares. En 2019 se publica el primer estudio que demuestra la presencia de ClxBPA en el líquido de diálisis y el agua ultrapura, sugiriendo un riesgo de sobreexposición al BPA de los pacientes tratados con HDF-OL al recibir grandes volúmenes de líquido de sustitución endovenoso (185).

Actualmente solo existen pequeñas regulaciones puntuales sobre el uso de BPA en dispositivos médicos, por lo que se continúa utilizando en la fabricación de muchos dializadores (tabla 7).

Tabla 7. Contenido de Bisfenoles en las membranas de diálisis.

		BPA	Otros bisfenoles
Membranas	Polisulfonas	SI *	BPS
	PEPA	SI	NO
	PMMA	NO	NO
	EVAL	NO	NO
	AN69	NO	NO
	Polyflux	NO	BPS
Carcasas	Polipropileno (PP)	NO	NO
	Poliuretano (PU)	NO	BPF
	Policarbonato (PC)	BPA	NO
	Poliestireno (PE)	NO	NO

PEPA: Polyester polymer alloy.

PMMA: Polimetilmetacrilato.

EVAL: Etilen vinil alcohol copolímero.

BPA: Bisfenol A.

BPS: Bisfenol S.

BPF: Bisfenol F.

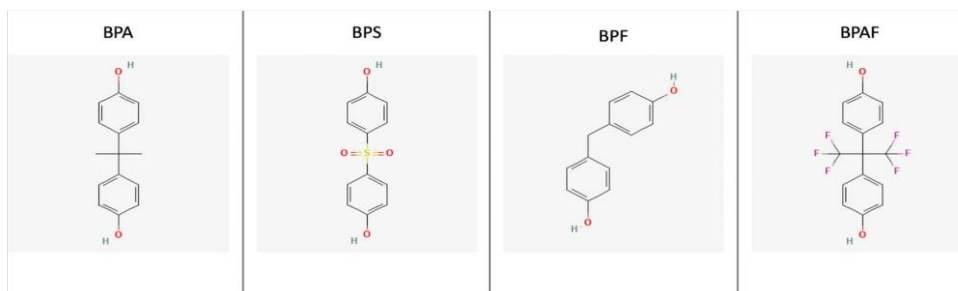
*Existen dializadores de Polietersulfona libres de BPA. (ELISIO®, NIPRO medical)

Modificado de Zahin Haq et al., Toxins, 2023. (186)

1.9 Sustitutos de Bisfenol A:

La evidencia irrefutable de que el BPA tiene efectos negativos sobre la salud humana, ha hecho que la industria explore diversas sustancias para intentar sustituirlo en el proceso de fabricación de plásticos. De esta manera se han desarrollado análogos del BPA, siendo los más extendidos el bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF) y bisfenol AF (BAF) (187,188). Por ejemplo, el BPS se emplea en la fabricación de detergentes, resinas, papel térmico, entre otros. Se puede encontrar BPF en resinas epoxi y revestimientos de estructuras que necesitan una elevada resistencia, como tanques de agua, tuberías o suelos (187,189). También se ha detectado BPS y BPF en productos de uso diario, como jabones, pasta de dientes, maquillajes, envoltorios de comida, tarjetas de embarque, etc (190).

Figura 12. Estructura molecular de los análogos del BPA.



Shane V et al. 2023. (188)

Idealmente un sustituto químico debe tener un efecto neutro o menos tóxico que el compuesto original, sin embargo, existe cada vez más evidencia acerca de la toxicidad de los

análogos de BPA. Las similitudes estructurales y metabólicas que tienen con el BPA hacen pensar que estos compuestos deben ser catalogados dentro de una misma clase, y ser tratados con precaución, no obstante, el marco regulatorio de los sucedáneos de BPA es escaso y poco claro (figura 12). Se sabe que el BPF, BPE, BPB y BPS tienen cierto efecto genotóxico y actividad estrogénica similar al BPA, y se ha demostrado en modelos animales que el BPAF puede reducir los niveles de testosterona (187,191–194). También se han relacionado con el desarrollo de obesidad, patologías cardiovasculares, citotoxicidad, cáncer, entre otros (188,195–199).

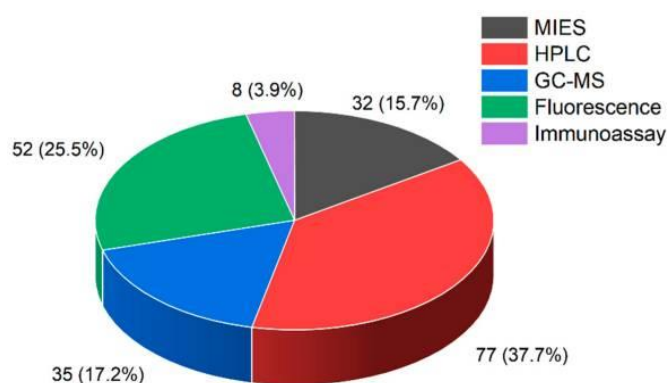
1.10. Métodos de detección de bisfenoles.

La biomonitorización de los niveles de bisfenoles en distintos sustratos proporciona información valiosa en el estudio de la exposición humana y los posibles efectos sobre la salud, permitiendo establecer medidas de intervención sanitaria. Inicialmente se prefería el análisis de la orina, al ser la principal vía de eliminación de bisfenoles y una muestra no invasiva y fácil de recoger. No obstante, debido a la vida media corta de los bisfenoles, el análisis de orina ofrece información limitada en el tiempo, por lo que rápidamente se abandonó su uso con tal fin (200). Los métodos analíticos que combinan Cromatografía Líquida (LC) o Cromatografía de gas (GC) con Espectrometría de Masas (MS), ofrecen una alta sensibilidad, selectividad y precisión. Específicamente en la GC/MS se requiere una derivatización de la muestra previa a su análisis, lo cual complica su procesamiento, pero proporcionan una mayor sensibilidad en comparación con la LC/MS (191). No obstante, al tratarse de métodos instrumentales, requieren de un equipamiento sofisticado y costoso, una preparación compleja de las muestras, así como personal cualificado y un tiempo largo de análisis, lo cual constituye su principal limitación.

Comparados con los métodos instrumentales, los inmunoensayos tienen la ventaja de ser más rápidos, simples y económicos, conservando una alta sensibilidad. Se han desarrollado múltiples técnicas de inmunoensayo utilizando aptámeros (antígenos químicos), que permiten detectar bisfenoles, con resultados prometedores. No obstante, son métodos que aún presentan ciertas limitaciones técnicas, por lo que su uso no es generalizado. El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA) combinado con un análisis de fluorescencia (FELISA) es un método que ha ganado interés debido a su simplicidad y bajo coste. Se basa en la propiedad fluorescente de los bisfenoles, y tiene el inconveniente de verse alterado por fenómenos de fluorescencia “ruidos” de fondo, o extinción de la fluorescencia por agregación (201). Recientemente han surgido alternativas prometedoras en este campo. Mediante impresión molecular se puede crear una matriz

polimérica (*molecular imprinting electrochemical sensors*) con sitios de reconocimiento del sustrato a analizar que son complementarios en forma, tamaño y funcionalidad química, lo cual les confiere una elevada selectividad, aún en muestras complejas (200). La unión de los MIES a los bisfenoles produce ciertos cambios eléctricos que luego pueden ser fácilmente medidos mediante un sensor electroquímico. A pesar de la evolución de los métodos de detección de bisfenoles hacia técnicas más sofisticadas, rápidas y coste efectivas, en la mayor parte de los estudios científicos en este ámbito se sigue empleando la LC o GC en tándem con MS. (Figura 13)

Figura 13. Métodos de detección de bisfenoles empleados en publicaciones de los últimos 5 años.



MIES: molecular imprinting electrochemical sensors. **HPLC:** High performance liquid chromatography. **GC-MS:** Gas chromatography / Mass spectrometry.

Ying Pan et al., *Sensors* (Basel). 2023 (200).

2. JUSTIFICACIÓN.

2. JUSTIFICACIÓN.

La relación entre estrés oxidativo, daño genómico y ERC, especialmente en hemodiálisis, es clara y evidente. Su impacto clínico sobre la morbimortalidad de estos pacientes también ha sido estudiado, despertando el interés por explorar estrategias terapéuticas que permitan combatir sus consecuencias deletéreas.

La exposición del ser humano a los distintos tipos de bisfenol ha sido motivo de creciente preocupación en las últimas décadas, debido a que se ha ido acumulando evidencia científica que indica que, lejos de tratarse de compuestos inocuos, pueden tener un grave impacto sobre la salud humana. Dado que la eliminación de bisfenoles es principalmente renal, la población con ERC ha sido objeto de especial preocupación e interés por cuanto se ha demostrado la acumulación de bisfenoles conforme disminuye la función renal medida por FGe. Además, se sabe que la mayor parte de los dializadores empleados habitualmente contienen algún tipo de bisfenol, lo cual podría constituir una fuente de exposición relevante en estos pacientes al estar en contacto directo con la sangre durante el paso por el circuito extracorpóreo.

Finalmente, existe evidencia del potencial efecto genotóxico de los bisfenoles, no solo en individuos con ERC o en HD sino también en diversas áreas de la medicina e incluso en otras especies (202–204).

3. HIPÓTESIS.

3. HIPÓTESIS:

1- Los pacientes con ERC presentan una elevada morbimortalidad que aumenta en estadios avanzados, y llega a su nivel máximo en los pacientes en HD. Además de los mecanismos clásicamente relacionados (inflamación, malnutrición, sobrecarga de volumen, etc), los pacientes en HD están expuestos a determinados factores inherentes a la propia técnica que pueden contribuir al incremento de la morbimortalidad.

2- Mientras el paciente se dializa, su sangre entra en contacto con el líquido de diálisis y los dispositivos empleados durante la técnica, los cuales, a pesar de ser cada vez más biocompatibles, contienen moléculas como los bisfenoles que tienen una eliminación principalmente renal y que son difíciles de depurar con técnicas convencionales al estar muy unidos a proteínas plasmáticas.

3- La exposición repetida a bisfenoles durante las sesiones de hemodiálisis puede incrementar los niveles séricos y contribuir a un mayor daño sobre el ADN, inestabilidad genómica y estrés oxidativo traducido clínicamente en una mayor morbimortalidad.

4- El uso de materiales de diálisis libres de bisfenoles reduce la exposición del paciente y puede tener un efecto positivo sobre los niveles de daño genómico y estrés oxidativo.

4. OBJETIVOS.

4. OBJETIVOS.

OBJETIVO PRINCIPAL:

Evaluar el efecto de los niveles de bisfenoles sobre los niveles de daño genómico de los pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Valorar el impacto de la utilización de un dializador libre de BPA en los niveles plasmáticos de BPA y sus análogos (BPS, BPF, BPAF).
2. Correlacionar la exposición de BPA con los niveles de otros bisfenoles, BPS, BPF, BPAF de los pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis.
3. Correlacionar la exposición a bisfenoles con los datos clínico-analíticos de los pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis.
4. Estudiar los niveles de daño genómico e inestabilidad genómica en función de la exposición a Bisfenoles.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Población:

Se incluyeron 35 pacientes en programa crónico de diálisis en la Fundación Puigvert de Barcelona. Los criterios de inclusión fueron: consentimiento informado, edad mayor a 18 años, tiempo en diálisis mayor de 3 meses. Se excluyeron pacientes en HDF-OL, diálisis incremental y aquellos con patologías inflamatorias o neoplásicas graves o con un pronóstico vital estimado inferior al tiempo de seguimiento. Todos los pacientes eran sometidos a hemodiálisis de bajo flujo con una duración media de 3.5 a 4 horas, 3 días por semana en un turno fijo, empleando un dializador de Polietersulfona de bajo flujo (VitaPES®).

Todos los pacientes firmaron un documento de consentimiento informado, el cual fue explicado de forma personal por algún miembro del equipo investigador. El proyecto fue aprobado por el comité de ética e investigación científica de la Fundación Puigvert IUNA.

Diseño del estudio:

Se trata de un estudio prospectivo intervencionista en el que se compara la población consigo misma tras un periodo de seguimiento de 6 meses. Una vez firmado el consentimiento, se recopilaron características clínicas, analíticas y demográficas en el momento basal del estudio y, para cada paciente, se recogieron muestras de sangre antes de la sesión de diálisis (pre- diálisis) para la determinación de niveles iniciales de bisfenoles y daño genotóxico. Posteriormente, se sustituyó el dializador por uno de similares características, pero con una carcasa libre de bisfenoles (ELISIO®), manteniendo la misma pauta de diálisis, salvo modificaciones derivadas de la práctica clínica habitual.

Los participantes continuaron con las diálisis periódicas, utilizando el nuevo dializador libre de BPA, durante un periodo de seguimiento de 6 meses, en los cuales se produjo el abandono de 10 pacientes por distintas causas tales como fallecimiento, trasplante o traslado de domicilio. Finalmente, en los 25 pacientes que completaron el seguimiento, se realizó una recogida final de datos analíticos y una nueva determinación de niveles de bisfenoles y daño genotóxico. (Figura 14)

Figura 14. Diseño del estudio



*Bisfenoles: BPA, BPS, BPF, BPAF.

**Daño genómico: Comet Basal y oxidativo, micronúcleos en células binucleadas.

HD: Hemodiálisis.
Comet: Ensayo de cometa.
MN: Micronúcleos.
PC: Policarbonato.
PP: Polipropileno.

Todos los pacientes incluidos realizaban una técnica de HD convencional, esto se debe a varias razones. En primer lugar, debido a la infraestructura de la unidad de diálisis en el momento del reclutamiento, solo la mitad de los pacientes realizaban HDF-OL en la práctica clínica habitual. Para evitar un sesgo relacionado con la técnica de diálisis, se desestimaron los pacientes en HDF-OL. En segundo lugar, la técnica de determinación de MN exige que las muestras sean procesadas no más de 3 horas después de su extracción, y el protocolo completo requiere 72 horas de seguimiento continuo. Por razones logísticas se descartaron todos los pacientes que realizaban hemodiálisis en turnos de noche, los cuales son a su vez los que tienen un perfil de comorbilidad algo menor. Finalmente se consiguieron seleccionar 35 pacientes entre los cuales desafortunadamente hubo 10 abandonos por distintas causas.

Materiales y técnica de diálisis:

Inicialmente, todos los pacientes realizaban hemodiálisis convencional con un dializador VitaPES® (PALEX Medical), que cuenta con una membrana de PES (PUREMA®) con carcasa de PC/PU. Posteriormente se sustituyó por un dializador ELISIO® (NIPRO Medical Corporation), con una membrana de PES (POLYNEPHRON®) y carcasa de PP, libre de BPA. En la tabla 8 se comparan las prestaciones de ambos dializadores. Todas las sesiones se realizaron con monitores Nikkiso DBB EXA, empleando líneas de sangre DBB

series (Nikkiso) y agujas fenestradas “rotatable wing” con calibre entre 15 y 17 G según las características del acceso vascular de los pacientes.

Todos los pacientes realizaron HD convencional con un flujo de sangre (Qb) variable entre 250 y 450 ml/min según las características del acceso vascular, un flujo de líquido de diálisis mínimo de 500 ml/min, y una duración entre 210 y 240 minutos. Se empleó heparina de bajo peso molecular en dosis única para la anticoagulación del circuito extracorpóreo. La adecuación de diálisis se midió mediante KT/V monocompartmental calculado por la fórmula de Daugirdas de segunda generación. La comorbilidad de los pacientes se estimó mediante el Índice de Comorbilidad de Charlson. (figura 15).

Tabla 8. Dializadores utilizados en el estudio.

	Vita PES 200 ®	ELISIO 21 M ®
Aclaramiento urea. (Qb: 300 ml/min)	309	274
KUF (ml/h/mmHg)	21	27
KoA urea	1064	1450
Superficie (m ²)	1,9	2,1
Membrana	PUREMA ®, PES.	POLYNEPHRON ®, PES
Carcasa	PC/PU	PP
Esterilización	Haz de electrones (electron beam)	Gamma Seca
Fabricante	PALEX Medical	NIPRO Medical

KUF: Coeficiente de ultrafiltración.
 KoA: Coeficiente de transferencia de masas.
 PES: Polietersulfona.
 PC: Policarbonato.
 PU: Poliuretano.
 PP: Polipropileno.

Fuente: ficha técnica de los dializadores.

Figura 15. Índice de comorbilidad de Charlson.

Weight	Clinical condition
1	Myocardial infarct
	Congestive cardiac insufficiency
	Peripheral vascular disease
	Dementia
	Cerebrovascular disease
	Chronic pulmonary disease
	Conjunctive tissue disease
	Slight diabetes, without complications
	Ulcers
	Chronic diseases of the liver or cirrhosis
2	Hemiplegia
	Moderate or severe kidney disease
	Diabetes with complications
	Tumors
	Leukemia
	Lymphoma
3	Moderate or severe liver disease
6	Malignant tumor, metastasis
	Aids

Age group	Points
0-49 years	0
50-59 years	1
60-69 years	2
70-79 years	3
80-89 years	4
90-99 years	5

Charlson M E, J Chronic Dis 1987;40(5):373-83 (205).

Procesamiento de las muestras:

Las determinaciones de parámetros analíticos se llevaron a cabo mediante la práctica habitual. Se obtuvo la muestra directamente del acceso vascular previo a la conexión al monitor de diálisis. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 min y se separaron 4 alícuotas de plasma de 300 µL por paciente, que fueron almacenadas a - 70 °C en el biobanco de la Fundación Puigvert.

Las muestras para determinar niveles de daño genotóxico también se recogieron directamente del acceso vascular de diálisis, previo a la conexión, y fueron enviadas de forma inmediata al Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad Autónoma de Barcelona UAB, para su procesamiento.

Determinación de niveles de bisfenoles:

La determinación de niveles de BPA ha supuesto un reto en nuestro estudio. Inicialmente se empleó un test de ELISA (ANOVA) para las mediciones, tal y como se había utilizado en diversas series publicadas (140,181,182), por ser un método a priori sencillo, rápido y económicamente accesible. Con dicha técnica se obtuvieron resultados que estaban por debajo del umbral de detección, por lo que se tuvo que adaptar el protocolo del ensayo (diluciones) para bajar dicho umbral, con lo que se consiguió detectar niveles de BPA en las

muestras. Ante las dudas que suscitaba la técnica de medición, y siendo un elemento fundamental del estudio, se decidió confirmar las determinaciones empleando otro método. Para ello se contactó con el Laboratorio de Toxicología y Salud Medioambiental de la Universidad Rovira y Virgili de Tarragona, que cuenta con una amplia experiencia en determinación de bisfenoles en líquidos residuales y matrices biológicas (206,207). Se empleó la GC/MS por ser la técnica disponible en dicho laboratorio, la cual, junto con la LC/MS son el *gold standard* actual para la medición de bisfenoles (200). Con esta técnica se consiguió ampliar el espectro de medición a otros tipos de bisfenoles, lo cual ha añadido valor al estudio.

Productos químicos y reactivos: El BPA (pureza del 99%), BPB (pureza del 98%), BPF (pureza del 98%), BPAF (pureza del 98%) y BPS (pureza del 98%) fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich (West Chester, PA, EE. UU.). El bisfenol A-d16 y el bisfenol S-13C12 fueron comprados a Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, EE. UU.), mientras que el bisfenol F-13C6 fue adquirido de TRC Canadá (Toronto, Canadá). Acetonitrilo (MeCN, grado de gradiente para HPLC), anhídrido acético (AA, pureza >99%), tetracloroetileno (T4CE, pureza >99%), acetato de amonio (pureza ≥98%) y ácido acético (glacial; 100%) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Carbonato de potasio (grado analítico) fue obtenido de Panreac Química (Barcelona, Cataluña, España). β-Glucuronidasa (Tipo 1 de *Helix pomatia*, 100,000 U/g de glucuronidasa sólida) fue adquirida de Sigma-Aldrich.

Instrumentación: El análisis se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases (GC) 7890A acoplado a un detector de triple cuadrupolo (QqQ) serie 7000, ambos de Agilent Technologies (Sta. Clara, CA, EE. UU.). La separación de los compuestos se realizó utilizando una columna cromatográfica HP-5MS UI, (30 m x 0.250 mm x 0.25 μm) (Agilent Technologies, Sta. Clara, CA, EE. UU.). El helio fue el gas portador, con un flujo constante de 1 mL/min. La inyección se realizó en modo splitless (tiempo de purga, 60 s) a 280°C. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 100°C mantenido durante 1 minuto, aumentado de 280°C a 30°C/min y mantenido durante 8.0 minutos. El tiempo total de ejecución fue de 15 minutos. La línea de transferencia de MS se mantuvo a 280°C. Los parámetros espectrométricos de masa fueron los siguientes: ionización electrónica con una energía de 70 eV, fuente de ionización a 230°C y temperatura del cuadrupolo MS a 150°C. El detector funcionó en modo de reacción múltiple (MRM) y tanto las transiciones como el tiempo de retención de los compuestos se muestran en la Tabla 1.

Determinación de los niveles de BP en muestras de suero: Se determinaron los niveles totales (libres + conjugados) de bisfenol. Las muestras de suero se descongelaron a

temperatura ambiente y se mezclaron mediante agitación en vórtice. Posteriormente, se transfirieron 1.5 mL de muestra a un vial limpio y se añadieron 30 μ L de solución de β -glucuronidasa (20,000 U/mL en tampón de acetato de amonio 1M pH 5.0). Las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C para permitir la hidrólisis. Después de enfriarse a 4°C, se añadieron 1.5 mL de acetonitrilo. Luego, cada muestra se fortificó con 20 μ L de una mezcla de estándares internos y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos después de agitar en vórtex y centrifugar durante 5 minutos a 3500 rpm. Posteriormente, se transfirió 1 mL del sobrenadante a un vial limpio y se añadieron 85 μ L de tetracloroetileno y 100 μ L de anhídrido acético a la muestra. En un tubo de vidrio con fondo cónico, se añadieron 3 mL de agua desionizada y 300 μ L de K₂CO₃ (para alcanzar un pH \geq 10). Rápidamente, se transfirió la muestra al tubo de vidrio y se agitó en vórtex. Luego, las muestras se centrifugaron a 2100 rpm durante 4 minutos. Finalmente, se transfirieron 70 μ L de la fase inferior a un inserto de 100 μ L, inyectándole 1 μ L en el sistema GC-QqQ.

Determinación de daño genómico y cromosómico:

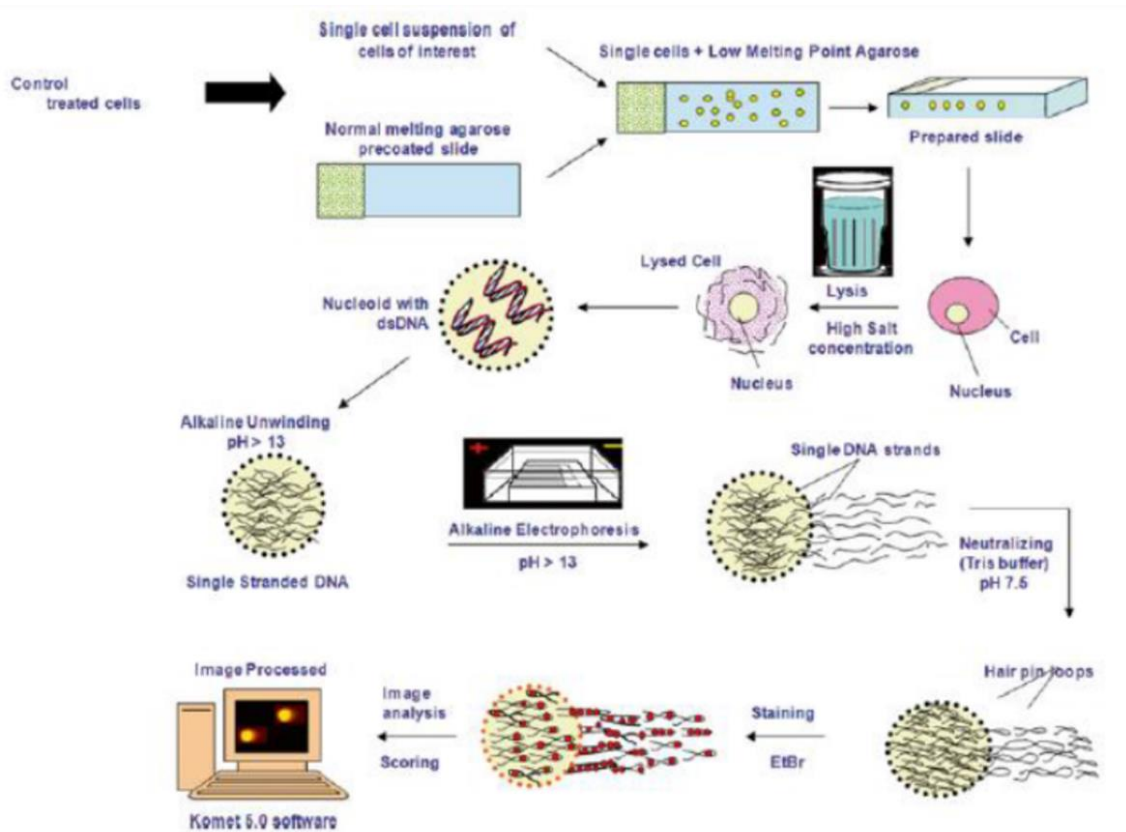
Ensayo de cometa o SCGE (figura 16):

Se midió el daño al ADN presente en los linfocitos de la sangre periférica mediante el ensayo cometa alcalino, siguiendo el protocolo estándar empleado por Stoyanova et al., 2010 (98). Los linfocitos aislados de 2 mL de sangre de cada paciente se criopreservaron en 500 mL de medio que contenía 90% de suero y 10% de DMSO, hasta su uso. El ensayo cometa se llevó a cabo utilizando películas de Gelbond VR (GF) en lugar de portaobjetos microscópicos como soporte para el gel de agarosa [McNamee et al., 2000; Azqueta et al., 2013]. Los linfocitos se aislaron utilizando un gradiente de densidad Ficoll-Paque a partir de 500 mL de sangre entera; las células se ajustaron a una concentración de 17,800 células en 25 mL de PBS y se resuspendieron cuidadosamente en 225 mL de agarosa de fusión baja al 0.75% (LMA) a 37°C y se depositaron en una GF (10.5 x 37.5 cm). Se colocaron cuarenta y ocho gotas (7 mL cada una) en cada GF y se corrieron muestras de ocho individuos simultáneamente, cada uno representado por seis gotas. Los linfocitos se lisaron durante un mínimo de 1 hora a 4°C en una cámara oscura que contenía una solución de lisis fresca y fría. Para permitir la desnaturalización del ADN, el desenrollado y la exposición de sitios lábiles al álcali, las GF se colocaron en una cuba de electroforesis de gel horizontal llena con solución de electroforesis fresca y fría (4°C) durante 35 minutos. La electroforesis se realizó en el mismo tampón durante 20 minutos a 1 V/cm y 300 mA. Después de la electroforesis, las GF se neutralizaron con dos lavados de 5 minutos con PBS 1X, seguido de 1 minuto de lavado con agua y luego se incubaron durante la noche en etanol al 100% para la fijación. Luego, las

GF se secaron y se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente hasta el momento de evaluarlas. Justo antes del análisis microscópico, las GF se tiñeron con 20 mL de SybrGold. Las imágenes se examinaron a una magnificación de 20x con un sistema de análisis de imágenes Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, Reino Unido) equipado con un microscopio de fluorescencia Olympus BX50. Se analizaron un total de cien células seleccionadas al azar por paciente y el % de ADN en la cola se utilizó como medida de daño al ADN.

Para determinar los niveles de bases oxidadas presentes en los linfocitos, las GF se lavaron dos veces (10 y 50 minutos, 4°C) después de la lisis celular en una solución tampón enzimática (40 mM de HEPES, 0.1 M de KCl, 0.5 mM de EDTA, 0.2 mg/mL de BSA, pH 8.0) que contenía la enzima FPG (glicosilasa de ADN de formamidopirimidina). Cada muestra se analizó utilizando dos GF. Una GF permaneció en la solución de lisis celular para evaluar el daño basal al ADN. La segunda fue tratada con la solución tampón enzimática sin FPG, para controlar cualquier efecto del tampón solo. Las GF se incubaron con la solución tampón enzimática (con y sin FPG) durante 30 minutos a 37°C. Después de eso, las muestras se procesaron como en el procedimiento estándar del ensayo cometa alcalino. El daño oxidativo neto al ADN se calculó restando el daño evaluado en las muestras incubadas con tampón enzimático del daño en las muestras incubadas con FPG.

Figura 16. Proceso del ensayo de cometa.



Determinación de Micronúcleos:

Las muestras de sangre se obtuvieron de cada sujeto mediante venopunción utilizando tubos vacutainers heparinizados y se enviaron directamente al laboratorio del Grupo de Mutagénesis de la Universidad Autónoma de Barcelona en Bellaterra (España). La sangre fue procesada no más de 3 horas después de ser extraída en el hospital. Se establecieron cultivos de linfocitos agregando 0.5 ml de sangre entera a 4.5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con un 15% de suero fetal bovino inactivado por calor, un 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina) y un 1% de L-glutamina (todos proporcionados por Gibco Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Los linfocitos fueron estimulados con un 1% de fitohemaglutinina (Gibco) a 37°C. Después de 44 horas, se añadieron 6 µg/ml de citocalasina B (Cyt-B; Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) al cultivo para detener la citocinesis. A las 72 horas de incubación, los cultivos fueron procesados y se centrifugaron a 120 g durante 8 minutos. A continuación, los cultivos de sangre se sometieron a un tratamiento hipotónico suave (2–3 minutos en KCl 0.075 M a 4°C). Las células fueron centrifugadas y fijadas en una

solución de metanol:ácido acético (3:1 v/v). Se codificaron dos o más portaobjetos y se tiñeron con un 10% de Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania) en tampón fosfato (pH 6.8) durante 10 minutos. Para determinar la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BNMN) y el número total de MN, se realizó un recuento a ciegas de un total de 1000 células binucleadas con citoplasma bien conservado (500 por réplica), para cada sujeto, en portaobjetos codificados. Además, se anotó un total de 500 linfocitos para determinar el porcentaje de células con uno, dos o más núcleos y se calculó el índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis (CBPI).

Análisis estadístico:

Se analizaron las variables sociodemográficas, clínicas y daño genómico de los participantes. Las variables cualitativas se describieron con frecuencias absolutas y porcentajes. La descripción de las variables cuantitativas se realizó mediante la media y la desviación estándar (DE). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de las distribuciones.

Se evaluaron los cambios en biomarcadores y daño genómico mediante la prueba de Wilcoxon en el caso de las variables de tipo cuantitativo. Para las variables cualitativas se utilizó la prueba de Mc Nemar.

A partir de las variables de daño genómico que habían mostrado cambios significativos tras la intervención se procedió a realizar análisis adicionales. Se construyeron modelos multivariados de regresión lineal por pasos hacia atrás para determinar las variables relacionadas de manera independiente con los niveles basales de comet y de BPAF. Se incluyeron aquellas variables relevantes desde un punto de vista bibliográfico y clínico. Además, se construyeron 2 modelos multivariados por pasos hacia atrás para determinar las variables relacionadas con los cambios pre-post en el comet y BPAF en toda la cohorte. Se utilizó la misma aproximación que en los modelos previos. En todos los modelos se aportaron los coeficientes beta, intervalos de confianza (IC) al 95% y los p valores. Los análisis se realizaron con el software RStudio (V4.3.3) Para todas las pruebas, la diferencia estadísticamente significativa se fijó en un valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS.

6. RESULTADOS.

En el estudio se incluyeron 35 pacientes, de los cuales 25 consiguieron acabar el período de seguimiento. Hubo 7 abandonos por exitus, 2 pacientes trasplantados y 1 traslado de domicilio. 4 pacientes fallecieron por infección complicada por SARS COV 2, y el resto por otras causas (abdomen agudo complicado, shock hemorrágico, neumopatía obstructiva grave). La población finalmente estudiada tenía una media de edad de 75 años (± 14), siendo un 56% hombres y 44% mujeres, con un índice de masa corporal (IMC) medio de 24 kg/m² (± 3.9). El 48 % de los pacientes no tenían una causa filiada de su ERC, y entre los diagnosticados, el 38% eran de origen glomerular.

Todos los pacientes realizaban HD convencional, con una antigüedad media de 40 meses (rango: 3-240 meses), completando una media de 10.7 (± 1.6) horas semanales de diálisis. El acceso vascular predominante era el catéter venoso central con un 68%, y el 96% de los pacientes empleaba un dializador Vita PES (PALEX Medical) adaptado a su superficie corporal. El 72 % de los individuos conservaba una diuresis residual definida como un débito urinario superior a 500 ml/día.

Se objetivó una importante carga de comorbilidad en la población, con un índice de Charlson medio de 7.3 (± 2.3). El 96 % de los pacientes eran hipertensos, el 32% diabéticos, el 76% tenían algún tipo de dislipemia y un 24% explicaba un hábito tabáquico activo. 12 pacientes (48%) tenían historia de enfermedad cardiovascular, siendo la cardiopatía isquémica la forma predominante con un 60%, seguida de la vasculopatía periférica (20%) y el ictus. El 40 % de los individuos tenía una historia previa de neoplasias, entre las cuales la más frecuente era la urotelial (30%), próstata (20%) y mama (20%). Finalmente, un 24% de la población tenía el antecedente de haber recibido un trasplante renal. (Tabla 9).

Tabla 9. Características de la población de estudio.

n=25	Media (DE)	Rango
Edad (años)	75.00 (14.39)	39 – 92
Peso (Kg)	65.61 (11.07)	42 – 90
Talla (m)	1.65 (0.08)	1.49 -1.79
IMC (kg/m2)	24.16 (3.90)	15 – 30
Tiempo en HD (meses)	40.96 (47.88)	3 – 240
Horas semanales HD	10.71 (1.65)	6 – 12
Charlson	7.32 (2.36)	3 - 10
n=25	Si	No
TR previo	6 (24%)	19 (76%)
Diuresis residual	6 (24%)	19 (76%)
Tabaquismo activo	6 (24%)	19 (76%)
Ex fumador/a	11(44%)	14 (56%)
HTA	24 (96%)	1 (4%)
DM	8 (32%)	17 (68%)
Dislipemia	19 (76%)	6 (24%)
ECV	12 (48%)	13 (52%)
Neoplasia previa	10 (40%)	15 (60%)
Catéter/Fístula	17 (68%)	8 (32%)

IMC: índice de masa corporal, **HTA:** hipertensión arterial, **DM:** diabetes mellitus, **ECV:** enfermedad cardiovascular.

En cuanto al tratamiento farmacológico (Tabla 10), se observa que la mayoría estaban tratados con estatinas (72%), y solo un 36 % con inhibidores del sistema renina angiotensina

aldosterona (ISRAA). En el ámbito del metabolismo mineral óseo, el 64% de los individuos recibía quelantes de fósforo, con una proporción similar de suplemento de calcidiol (68%). Durante las sesiones de hemodiálisis, el 20% estaba tratado con paricalcitol y el 12% con calcimiméticos. Para el control de la anemia, la totalidad de los pacientes requería EPO en forma de darbepoetina en régimen semanal, quincenal o mensual, complementada con hierro endovenoso (60%) y ácido fólico (32%).

Tabla 10. Principales tratamientos y suplementos.

n: 25	Si	No
ISRAA	9 (36%)	16 (64%)
Estatinas	18 (72%)	7 (28%)
Ácido fólico	8 (32%)	17 (68%)
Vitamina B	1 (4%)	24 (96%)
L-Carnitina	16 (64%)	9 (36%)
Calcidiol	17 (68%)	8 (32%)
Quelantes de fósforo	16 (64%)	9 (36%)
Paricalcitol	5 (20%)	20 (80%)
Calcimimético	3 (12%)	22 (88%)
Suplementos de calcio	6 (24%)	19 (76%)
Hierro endovenoso	15 (60%)	10 (40%)
EPO	25 (100%)	-

ISRAA: Inhibidores del sistema renina angiotensina aldosterona, EPO: Eritropoyetina.

Análisis de parámetros analíticos pre-post seguimiento:

En los parámetros generales como urea, glucosa, glicohemoglobina, sodio, potasio, bicarbonato, no se aprecian diferencias. Tampoco en los marcadores clásicos de inflamación ($\beta 2$ microglobulina, proteína C reactiva), que permanecen estables. En cuanto al control de la anemia, no hay cambios significativos en la cifra de hemoglobina basal y final, tampoco en los niveles de ferritina o la saturación de transferrina. La necesidad de eritropoyetina y hierro endovenoso se mantuvo igual al final del seguimiento, así como las dosis semanales requeridas. (Tabla 11)

Tabla 11. Análisis pre y post seguimiento del control de la anemia.

n: 25		Basal	Final	p-valor
Fe EV	No	10 (40.0%)	4 (20.0%)	0.45
	Si	15 (60.0%)	16 (80.0%)	
Tipo FeEV	Sacarosa	15 (100.0%)	14 (93.3%)	n/a
	Carboximaltosa	0 (0.0%)	1 (6.7%)	
Fe semanal (mg)	Media (DE)	69.40 (35.91)	110.84 (232.70)	0.272
EPO	Si	0 (0.0%)	1 (4.8%)	n/a
	No	25 (100.0%)	20 (95.2%)	
EPO/semana (mcg)	Media (DE)	56.60 (37.21)	58.00 (48.41)	0.864
Hb (g/L)	Media (DE)	114.68 (20.09)	115.48 (14.95)	0.881

Fe EV: hierro endovenoso, EPO: eritropoyetina, Hb: hemoglobina. n/a: no aplica.

El metabolismo mineral óseo de los pacientes estudiados también mostró una completa estabilidad tras el período de seguimiento. De esta forma, no se observaron cambios significativos en los niveles de calcio, fósforo, paratohormona y calcidiol. (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis pre y post seguimiento del metabolismo mineral óseo.

n: 25		Basal	Final	p-valor
Calcio (mmol/L)	Media (DE)	2.23 (0.16)	2.22 (0.19)	0.928
	Rango	1.74 - 2.50	1.97 - 2.67	
Fósforo (mmol/L)	Media (DE)	1.42 (0.43)	1.39 (0.47)	0.689
	Rango	0.69 - 2.35	0.78 - 2.61	
PTH (ng/L)	Media (DE)	196.02 (145.77)	238.47 (193.34)	0.236
	Rango	18.00 - 702.00	2.50 - 787.00	
Calcidiol (ng/L)	Media (DE)	26.95 (25.00)	31.00 (23.24)	0.359
	Rango	1.60 - 94.00	9.60 - 84.00	

PTH: paratohormona. **Test:** Wilconxon

En la esfera nutricional, también se objetivo una estabilidad de los parámetros analíticos (tabla 13). No hubo cambios significativos en los niveles de colesterol total y fraccionado, ni en los triglicéridos. Las proteínas totales y la albúmina no variaron significativamente, y se evidenció un incremento significativo de la prealbúmina una vez finalizado el seguimiento. (p: 0.016).

Tabla 13. Análisis pre y post seguimiento de parámetros nutricionales.

n: 25		Basal	Final	p-valor
Albúmina (g/L)	Media (DE)	39.45 (4.32)	38.90 (4.66)	0.367
	Rango	29.2 - 48.5	22.2 - 45.6	
Proteínas (g/L)	Media (DE)	67.90 (7.43)	66.58 (5.91)	0.253
	Rango	49.00, 81.80	52.8 - 78.9	
Prealbúmina (g/L)	Media (DE)	0.25 (0.06)	0.28 (0.06)	0.016 *
	Rango	0.12 – 0.37	0.17 – 0.39	
Colesterol (mmol/L)	Media (DE)	3.71 (0.93)	3.65 (0.78)	0.684
	Rango	2.47 - 6.51	2.49 - 5.24	
LDL (mmol/L)	Media (DE)	1.91 (0.78)	1.92 (0.61)	0.877
	Rango	0.78 - 4.16	0.97 - 3.36	
HDL (mmol/L)	Media (DE)	1.13 (0.31)	1.07 (0.32)	0.191
	Rango	0.69 - 1.82	0.54 - 1.86	
TG (mmol/L)	Media (DE)	1.51 (0.70)	1.55 (0.92)	0.966
	Rango	0.52 - 3.80	0.60 - 4.86	

LDL: lipoproteína de baja densidad, HDL: lipoproteína de alta densidad, TG: triglicéridos. Test: Wilcoxon

Análisis de bisfenoles:

Se consiguió detectar niveles de BPA en el 98% de las muestras analizadas, del mismo modo, el BPF estuvo presente en el 97% de las muestras y la forma BPAF en el 47%. El resto de bisfenoles estudiados (BPB, BPS) fueron prácticamente indetectables. El BPF fue el que presentó una mayor concentración basal, con una media de 0.97 (\pm 1.41) μ g/L, seguido del BPA (0.50 \pm 0.21 μ g/L) y el BPAF (0.46 \pm 0.75 μ g/L). En el análisis comparativo pre y post

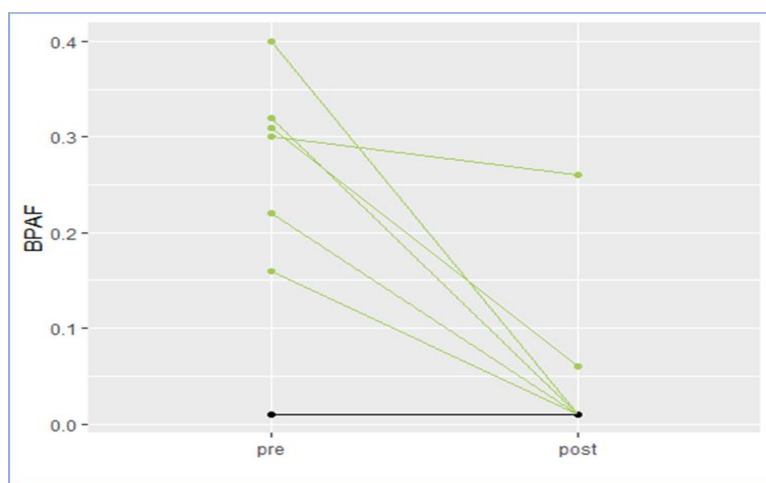
seguimiento se observó una reducción significativa del BPAF (p: 0.025), sin apreciar cambios significativos en el resto de bisfenoles, y tampoco en la sumatoria de todos los bisfenoles (Tabla 14). De forma individual, todos los pacientes con niveles detectables de BPAF en el momento basal presentaron un claro descenso al finalizar el seguimiento. (Figura 17).

Tabla 14. Análisis pre y post de los niveles de BPA y análogos.

n: 25		Basal	Final	p-valor
BPA (µg/L)	Media (DE)	0.50 (0.21)	0.71 (0.68)	0.554
	Rango	0.14 - 0.95	0.16 - 3.20	
BPAF (µg/L)	Media (DE)	0.46 (0.75)	0.14 (0.61)	0.025 *
	Rango	0.01 - 2.79	0.01 - 3.13	
BPF (µg/L)	Media (DE)	0.97 (1.41)	0.92 (0.96)	0.439
	Rango	0.01 - 6.50	0.00 - 4.24	
BPB (µg/L)	Media (DE)	0.01 (0.00)	0.05 (0.23)	1
	Rango	0.01 - 0.01	0.01 - 1.17	
BPS (µg/L)	Media (DE)	0.10 (0.48)	0.18 (0.41)	0.855
	Rango	0.01 - 2.44	0.01 - 1.22	
SUMA BISFENOLES (µg/L)	Media (DE)	1.93 (1.39)	1.77 (1.61)	0.6
	Rango	0.29 - 6.80	0.45 - 7.45	

Test: Wilcoxon

Figura 17. Niveles de BPAF pre y post seguimiento.



Representación individual del descenso de BPAF..

Análisis de daño genómico (Ensayo de cometa y Ensayo de Micronúcleos).

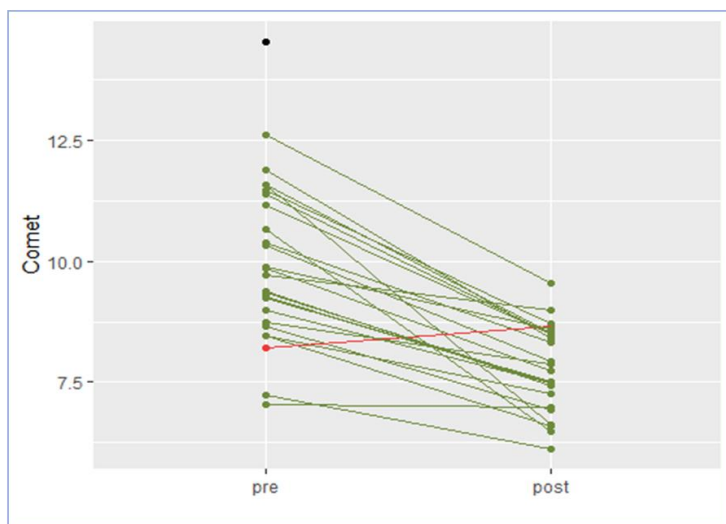
En el análisis del cometa se aprecia un nivel medio de daño genómico basal de 10.01 (± 1.71) en el momento inicial, con una reducción significativa al finalizar el período de seguimiento, alcanzando una media de 7.79 (± 0.86) ($p < 0.001$). Por su parte, el análisis del daño oxidativo no refleja variaciones significativas al finalizar el estudio. (Tabla 15). De forma individual, 24 pacientes tuvieron un claro descenso del daño genómico basal medido por SCGE (Figura 18).

Tabla 15. Análisis pre y post de los niveles de daño genómico basal y oxidativo, mediante el ensayo de cometa (SCGE).

n: 25		Inicial	Final	p-valor
Daño BASAL	Media (DE)	10.01 (1.71)	7.79 (0.86)	<0.001
	Rango	7.04 - 14.54	6.12 - 9.54	
Daño OXIDATIVO	Media (DE)	4.99 (1.99)	5.72 (2.60)	0.237
	Rango	1.67 - 8.53	1.79 - 14.79	

SCGE: Single Cell Electrophoresis. (Ensayo de cometa). **Test:** Wilconxon

Figura 18. Niveles de daño genómico basal pre y post seguimiento.



Representación individual del descenso de daño genómico basal.

Por su parte en el análisis del daño genómico mediante micronúcleos (MN), se observó una frecuencia basal de BNMN de 9.44 (\pm 5.25) con un CPBI medio de 1.5 (\pm 0.18), sin evidenciarse variaciones significativas después del período de seguimiento. (Tabla 16)

Tabla 16. Análisis pre y post de la frecuencia de micronúcleos.

n: 25		Basal	Final	<i>p</i> -valor
MN	Media (DE)	10.20 (5.66)	12.69 (10.35)	0.361
	Rango	4.00 - 25.00	2.00 - 46.00	
BNMN	Media (DE)	9.44 (5.25)	11.35 (8.40)	0.376
	Rango	4.00 - 25.00	2.00 - 34.00	
CPBI	Media (DE)	1.50 (0.18)	1.55 (0.16)	0.157
	Rango	1.18 - 1.89	1.19 - 1.81	

MN: micronúcleos, **BNMN:** micronúcleos en células binucleadas, **CPBI:** Índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis. **Test:** Wilcoxon.

Modelos multivariados.

Se realizó un análisis multivariado para intentar correlacionar los niveles iniciales de BPAF y daño genómico basal medido mediante ensayo de cometa, con distintas variables clínicas, terapéuticas y analíticas tales como, edad, tabaquismo, antigüedad en diálisis, comorbilidades, PCR, albúmina, PTH, etc. (Tabla 17). No se objetivó ninguna relación significativa entre las variables estudiadas.

Tabla 17. Análisis multivariado para niveles de daño genómico basal en el momento inicial.

n: 25	Coefficiente	LI IC 95%	LS IC 95%	p-valor
Edad	0.03	-0.14	0.19	0.706
Tabaquismo activo	-1.67	-9.66	6.32	0.614
t en HD meses (>=24 meses)	-1.15	-6.30	4.00	0.592
Horas de HD semanales (>=12 horas)	0.56	-2.53	3.66	0.660
Diuresis residual (Si)	0.84	-5.29	6.96	0.740
Diabetes (Si)	-0.40	-4.26	3.46	0.802
Neoplasia (SI)	-0.49	-3.73	2.74	0.712
Trasplante previo (SI)	0.99	-3.46	5.44	0.593
ECV (Si)	0.14	-3.19	3.47	0.919
Kt/V (>=1.3)	-0.49	-4.30	3.31	0.752
PCR (>=5 mg/L)	-0.48	-3.51	2.56	0.704
Albúmina	0.07	-0.39	0.53	0.711
Prealbúmina	10.93	-17.60	39.45	0.370
Charlson >=8	0.26	-4.08	4.60	0.884

HD: hemodiálisis, ECV: enfermedades cardiovasculares, PCR: proteína C Reactiva.

Se realizó un modelo de regresión *por pasos* (*stepwise*) para analizar las variables que podrían influir en el descenso de los niveles de BPAF observado. No se consiguió establecer ninguna correlación entre las variables incluidas en el modelo y el descenso de los niveles de BPAF. (Tabla: 18)

Tabla 18. Modelo de regresión por pasos para el descenso de BPAF.

n: 11	Coeficiente	LI IC 95%	LS IC 95%	<i>p</i> -valor
Edad	-0.01	-0.05	0.03	0.287
Tabaquismo activo	-0.45	-1.44	0.53	0.187
t en HD meses (>=24 meses)	0.76	-0.22	1.74	0.080
Horas de HD semanales (>=12)	-0.72	-1.76	0.31	0.095
Diuresis residual (Si)	0.20	-0.25	0.65	0.197
Diabetes (Si)	0.26	-0.20	0.73	0.136
Neoplasia (SI)	-0.19	-0.55	0.16	0.143
Trasplante previo (SI)	0.22	-0.34	0.77	0.232
ECV (Si)	0.05	-0.24	0.34	0.550
PCR (>=5 mg/L)	-0.09	-0.44	0.27	0.398
Albúmina	-0.01	-0.07	0.05	0.495
Prealbúmina	0.84	-1.86	3.54	0.313
Charlson >=8	0.62	-0.40	1.63	0.121

HD: hemodiálisis, ECV: enfermedades cardiovasculares, PCR: proteína C Reactiva.

Por su parte, el mismo modelo de regresión, aplicado a la variación de los niveles de daño genómico basal (SCGE) muestra que los pacientes con niveles iniciales más elevados presentan un descenso significativamente mayor al culminar el seguimiento ($p < 0.001$). Del

mismo modo, aquellos individuos con una antigüedad en diálisis superior a los 24 meses, o con PCR superior a 5 mg/L, también presentan un mayor descenso de los niveles de daño genómico basal. ($p: 0.017$) ($p: 0.054$). Por el contrario, se observa que los pacientes con antecedentes de enfermedades cardiovasculares tienen un descenso significativamente menor del daño basal ($p: 0.05$), lo cual también se aprecia en los individuos con una comorbilidad (Charlson) elevada, pero sin llegar a ser significativo. ($p: 0.07$). (Tabla 19).

Tabla 19. Modelo de regresión por pasos para el descenso de daño genómico basal (SCGE).

n: 25	Coefficiente	LI IC 95%	LS IC 95%	p-valor
Daño basal inicial (cometa)	0.85	0.61	1.09	<0.001
t en HD meses (>=24 meses)	1.04	0.23	1.84	0.017
Horas de HD semanales (>=12 horas)	-0.35	-1.01	0.32	0.268
Diabetes (Si)	1.13	0.30	1.96	0.013
Neoplasia (SI)	-0.50	-1.21	0.21	0.145
ECV (Si)	-0.74	-1.52	-0.04	0.050
Kt/V (>=1.3)	0.34	-0.37	1.05	0.309
PCR (>=5)	0.69	-0.01	1.39	0.054
Prealbúmina	-3.40	-9.31	2.52	0.226
Charlson >=8	-0.71	-1.51	0.08	0.073

HD: hemodiálisis, **ECV:** enfermedades cardiovasculares, **PCR:** proteína C Reactiva.

7. DISCUSIÓN.

7. DISCUSIÓN.

La ERC es un problema de alto impacto socioeconómico a nivel mundial. En las últimas décadas su prevalencia se ha incrementado notablemente, posiblemente debido a la mayor supervivencia de patologías crónicas como la DM o HTA, y el envejecimiento poblacional. En la actualidad se estima que existen 850 millones de personas que padecen algún grado de ERC, de los cuales las dos terceras partes están en estadios avanzados. En España, la incidencia de ERC en mayores de 65 años se sitúa en torno al 20%. A pesar del elevadísimo impacto social y económico de la ERC, el grado de conciencia colectiva respecto a la salud renal sigue siendo relativamente bajo. Al ser una entidad prácticamente asintomática, sobre todo en estadios precoces, existe un alto índice de infra diagnóstico.

La principal causa de ERC a nivel mundial es la enfermedad renal diabética, seguida de la enfermedad vascular aterosclerótica asociada a la HTA y las patologías glomerulares. El deterioro progresivo de la función renal produce una serie de efectos sistémicos que constituyen el conjunto sindrómico de la ERC: hipertensión arterial, anemia, alteraciones del metabolismo mineral óseo, malnutrición, alteraciones electrolíticas, etc. Una vez alcanzado el estadio final de la ERC, se hace necesario implementar una TRS, siendo la hemodiálisis la modalidad de inicio más frecuente en España, por encima del trasplante renal anticipado y la diálisis peritoneal, con más de 7000 pacientes incidentes en 2021. (registro ER).

La HD es una técnica de depuración extracorpórea con mucha complejidad técnica, que ha evolucionado en las últimas décadas hasta alcanzar el nivel de sofisticación actual. Numerosos avances tecnológicos, como la producción de líquido de diálisis ultrapuro, el uso de bicarbonato como tampón, el desarrollo de nuevos tipos de membranas de diálisis, la producción de líquido de reposición "on-line" o el uso de biosensores en los monitores de diálisis, han permitido perfilar la técnica de diálisis moderna que conocemos en la actualidad. No obstante, aún existen muchos retos e interrogantes por afrontar.

Los pacientes con ERC en estadios avanzados, especialmente aquellos en HD, presentan una combinación de factores endógenos y exógenos que favorecen un estado inflamatorio crónico que conduce a un proceso de envejecimiento acelerado con una elevada morbimortalidad, principalmente de causa cardiovascular. El sustrato fisiopatológico de dicho proceso es la acumulación de toxinas urémicas, las alteraciones del metabolismo mineral óseo, procesos de inmunoactivación y el elevado estrés oxidativo.

El daño genómico es la lesión de la molécula de ADN que se produce debido a la exposición a elementos medioambientales (ej: radiación ultravioleta, sustancias genotóxicas, etc.) o moléculas endógenas (ROS), de modo que existe un balance constante entre el daño y los mecanismos de reparación del ADN, que preservan la estabilidad genómica. La acumulación de daño genómico está claramente relacionada con el desarrollo de patologías cardiovasculares, y es un sustrato importante para la carcinogénesis. Los pacientes en hemodiálisis presentan niveles elevados de daño genómico, derivado del estado inflamatorio y oxidativo crónico, combinado con una capacidad reducida de reparación del ADN (93,208).

Daño genómico y ERC.

El presente estudio representa el último paso dentro de una línea de investigación desarrollada de forma conjunta entre el Laboratorio de Mutagénesis de la UAB y la Fundación Puigvert, en la que se ha estudiado la relación entre estrés oxidativo, daño genómico y ERC, dando lugar a numerosas publicaciones a lo largo de los últimos 15 años. Especialmente en los pacientes en HD, existen múltiples factores que contribuyen a incrementar el daño genómico, tales como: edad, co-morbilidades, técnica de diálisis, infecciones concomitantes, tratamientos endovenosos (hierro), etc.

Inicialmente se evaluó la presencia de daño genómico basal y oxidativo en pacientes con distintos estadios de ERC, y se correlacionó con parámetros clínicos en una muestra de 300 pacientes. Se objetivó que el daño genómico total y oxidativo (EndoIII/FPG) medido por ensayo de cometa se incrementa de forma lineal conforme disminuye el FGe, llegando a su máximo nivel en los pacientes en hemodiálisis (49). Posteriormente se demostró que el tiempo en hemodiálisis incrementa el daño genómico acumulado y que los pacientes con mayores niveles de daño genómico tienen una capacidad menor de reparación del ADN, medida mediante una modificación del ensayo cometa (120).

Las consecuencias clínicas del daño genómico elevado son bien conocidas. En 2013, Coll et al. evaluó la mortalidad de 123 pacientes en hemodiálisis, evidenciando que aquellos con niveles elevados de daño genómico tenían una mortalidad significativamente mayor, y que solo la edad, la inflamación y el daño genómico oxidativo (EndoIII) eran factores independientes de mortalidad (113).

Ante estos hallazgos, se exploró el uso de distintas estrategias terapéuticas para reducir el daño genómico. Se evaluó el efecto de la suplementación con jugo de uva fermentado (mosto), rico en flavonoides, sobre el daño genómico en 25 pacientes en

hemodiálisis frente a un grupo control y se observó una reducción significativa del daño oxidativo en los pacientes suplementados con mosto, así como un descenso significativo del colesterol LDL (117). También se estudió el efecto de utilizar membranas de diálisis impregnadas en vitamina E (conocido antioxidante) y se evidenció un descenso significativo del daño oxidativo respecto al grupo control, especialmente relevante en aquellos pacientes con un daño genómico inicial muy elevado. Además, los pacientes sometidos a dializadores con vitamina E mejoran el perfil de control de la anemia y los niveles plasmáticos de vitamina E. Resultados similares se obtuvieron al valorar si el cambio de una técnica de hemodiálisis de bajo flujo a una de alto poder convectivo (HDFOL), podía disminuir el daño genómico, aunque esta vez con menor significación estadística (115).

Plásticos y salud humana.

La fabricación de plásticos a nivel mundial ha tenido un crecimiento exponencial en las últimas 5 décadas. Su uso ha simplificado en muchos aspectos la vida cotidiana de la especie humana, mejorando nuestra calidad de vida y el desarrollo tecnológico e industrial. Al tratarse de materiales altamente resistentes, la gran producción, combinada con una muy baja tasa de reciclaje, hace que se viertan enormes cantidades de residuos plásticos en el ambiente. Dichos residuos sufren un proceso de degradación debido a agentes físicos y químicos, que dan lugar a pequeñas partículas denominadas microplásticos, que a su vez son capaces de migrar a entornos remotos y penetrar en la cadena alimenticia a todos los niveles. En los seres humanos la principal vía de exposición es la oral, seguida de la inhalatoria y la dérmica. Se ha demostrado el efecto deletéreo de los MNPLs en distintas especies, siendo capaces de atravesar incluso diferentes barreras celulares (epiteliales, placenta, etc.), produciendo citotoxicidad, genotoxicidad e incremento de la producción de ROS (209,210).

No existe en la actualidad ningún método fiable para determinar nanoplásticos. Esto se debe a que, por su naturaleza diversa en cuanto a tamaño, forma, composición, etc. es difícil agruparlos bajo una misma técnica de detección. De este modo, la aproximación más fiable a la detección de MNPLs es la determinación de monómeros o aditivos liberados desde la molécula de plástico, que indirectamente indican su presencia. Entre estos compuestos, los más estudiados y utilizados son los bisfenoles, especialmente el BPA.

El BPA es un aditivo empleado en la fabricación de plásticos para conferirles dureza, transparencia, resistencia y ligereza. Debido a su estructura molecular, es capaz de interactuar con el receptor de estrógenos, comportándose como un xenoestrógeno. Su uso

es generalizado desde la década de los setenta, especialmente en el empaquetado de alimentos. A partir de los noventa se empezó a acumular evidencia sobre su migración hacia los alimentos y sus posibles efectos sobre la salud, suscitando gran preocupación en la comunidad científica, y llevando a las autoridades sanitarias a establecer progresivamente restricciones en su uso. En la actualidad su uso sigue siendo permitido y generalizado, aunque el nivel de IDT se ha reducido notablemente, y es considerado cada vez más un problema de salud pública por las distintas agencias gubernamentales.

La presión de la comunidad científica y la opinión pública acerca de los efectos adversos del BPA, ha llevado a la industria a desarrollar moléculas alternativas que cumplan una función similar con un perfil más seguro. De este modo han surgido moléculas como el BPS, BPF, BPAF, diseñadas para tal fin. Los análogos de BPA comparten grandes similitudes estructurales y metabólicas, y se han relacionado con una actividad estrogénica y genotóxica similar, por lo que deberían ser considerados como parte de una misma familia de compuestos junto con el BPA y ser regulados en consecuencia. No obstante, la normativa que regula el uso de sucedáneos del BPA es escasa y ambigua.

Una vez en el torrente sanguíneo el BPA es rápidamente metabolizado por dos vías, glucuronidación y conjugación con sulfato, produciendo metabolitos hidrosolubles que se eliminan principalmente por vía renal. Su vida media ronda las 5 horas y tiene una elevada unión a proteínas plasmáticas (151). Quizás la rápida eliminación del BPA por vía renal sea el principal argumento por el cual no se ha prohibido radicalmente su uso, no obstante, es lógico pensar que en los individuos con algún grado de compromiso de la función renal el BPA puede acumularse.

Bisfenoles y ERC

La relación entre BPA y ERC es bidireccional. El descenso del FGe favorece la acumulación de BPA, observándose una clara correlación negativa que se hace mayor en estadios avanzados. A su vez el propio BPA tiene un efecto nefrotóxico específicamente sobre la función podocitaria, alterando la barrera de filtración y favoreciendo la aparición de albuminuria, llegando a ser considerado como un factor de progresión de ERC (142,171,173). En los pacientes en hemodiálisis se conjugan diversos factores que hacen que la acumulación de BPA cobre importancia. Al tener una diuresis escasa, la eliminación propia de BPA es casi nula. La depuración de BPA mediante las técnicas de diálisis actuales es cuanto menos insuficiente, debido a su elevada unión a proteínas plasmáticas. Finalmente, el contacto reiterado de la sangre del paciente con elementos del circuito extracorpóreo que contienen

bisfenol, en un entorno de temperatura favorable, constituye una fuente de exposición directa añadida a las fuentes medioambientales comunes (147,180).

El elemento central del circuito extracorpóreo es el dializador, el cual está conformado por un conjunto de fibras capilares contenidas dentro de una carcasa. La pared de los capilares constituye la membrana a través de la cual estará en contacto la sangre del paciente con el líquido de diálisis. En las últimas décadas ha habido innumerables avances tecnológicos respecto a las membranas de diálisis, que van desde el uso de materiales más biocompatibles, hasta el diseño estructural mediante nanotecnología de membranas que facilitan el transporte de solutos y agua. También las técnicas de diálisis han evolucionado notablemente, especialmente con la implementación de la HDF-OL que permite grandes volúmenes de transporte convectivo, mejorando así la depuración de solutos con peso molecular medio. A pesar de la evolución global de la hemodiálisis, la mayor parte de los dializadores empleados actualmente contiene BPA o algún análogo, bien sea en la carcasa o en la propia membrana, y no parece haber una voluntad manifiesta de los fabricantes por eliminarlo o sustituirlo (186).

El propósito del presente estudio es relacionar, por primera vez, los niveles de bisfenoles con el daño genómico en un grupo de pacientes de hemodiálisis. Para ello se ha sustituido el dializador habitual (que contiene BPA) por uno libre de BPA y, tras un período de seguimiento se ha valorado su impacto. La muestra analizada se considera representativa de la realidad de la población en hemodiálisis, al tener una media de edad avanzada, elevado índice de comorbilidad, una antigüedad considerable en diálisis con elevada prevalencia de patologías cardiovasculares. Se objetivó una prevalencia de enfermedades glomerulares ligeramente superior a la esperada, así como de neoplasias uroteliales, lo cual posiblemente se explica porque el estudio fue desarrollado en un centro monográfico de urología y nefrología de alta complejidad.

Análisis de bisfenoles tras cambiar a un dializador libre de BPA.

Los principales bisfenoles detectados en nuestra población de estudio fueron el BPA y el BPF, en casi la totalidad de la muestra, seguidos del BPAF en la mitad de los individuos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de BPA después de 6 meses de seguimiento. En el análisis de los análogos se evidenció un descenso significativo del BPAF ($p: 0.025$), que es una molécula estructuralmente similar al BPA en la que se han sustituido los dos grupos metilo por grupos trifluorometilo (211). No existe información en la ficha técnica de los dializadores empleados acerca de su contenido de BPAF, aunque no es obligatorio su

especificación por parte del fabricante, por lo que sería necesario un análisis químico de los componentes para determinar este hecho. De cualquier modo, el descenso significativo de BPAF hace suponer que existe una diferencia en cuanto a su contenido entre los dializadores utilizados.

El hecho de no haber diferencias en los niveles de BPA total (libre y conjugado) tras cambiar a un dializador libre de BPA (según el fabricante) puede deberse a dos razones fundamentales. En primer lugar, los niveles basales de BPA son relativamente bajos al compararlos con otras series publicadas, lo cual resulta contradictorio al tratarse de pacientes en su mayoría sin diuresis residual, con una técnica de diálisis convencional y una considerable antigüedad en diálisis. El hecho de partir de niveles más bajos y de existir una importante variabilidad, puede justificar que no se aprecien cambios significativos. En segundo lugar, se ha de tener en cuenta que existen otras fuentes de BPA relacionadas con los materiales y técnicas de diálisis, sobre las cuales no se realizó ninguna intervención. Diversos estudios han demostrado que el BPA se comporta como una toxina urémica, aumentando su concentración a medida que disminuye el FGe, llegando su nivel máximo en los pacientes en diálisis, en los cuales existe además una sobreexposición sistémica a BPA proveniente de los dispositivos médicos y los líquidos de diálisis (140). Del mismo modo, Bosch-Panadero et al. demostraron en 2016 que la composición de la membrana de diálisis puede modificar los niveles de BPA de forma aguda (tras una única sesión) o crónica (tras meses de seguimiento) (181). Posteriormente varios estudios han sugerido que la técnica de diálisis puede influir en la eliminación de BPA, con resultados contradictorios. Quiroga et al. en 2017 evidencian que la HDF-OL presenta una mayor efectividad en la eliminación de BPA respecto a las técnicas convencionales, a pesar de que el descenso obtenido mediante ambas técnicas es limitado (182). Recientemente se ha publicado un estudio en el que se analizan niveles de BPA y derivados clorados según las distintas técnicas de HD, en el que los autores no encuentran diferencias significativas en cuanto a la reducción de BPA en la HDF-OL respecto a la HD convencional (147).

La evidencia contradictoria hace pensar que el determinar el impacto de una sesión de diálisis en la eliminación de bisfenoles no es sencillo. A diferencia de lo que ocurre con otras toxinas, el balance de bisfenoles pre y post diálisis es producto del equilibrio de la eliminación (principalmente de bisfenol libre) y los aportes recibidos durante la propia sesión, bien sea por el contacto de la sangre con los elementos del circuito extracorpóreo o por fenómenos de retrofiltración. El BPA tiene una elevada unión a proteínas plasmáticas (cercana al 80%), lo cual hace que su eliminación durante la diálisis sea limitada. En nuestro estudio, al igual que en otras series publicadas, los niveles de bisfenoles no se correlacionan

con los parámetros de adecuación de diálisis (KT/V), lo cual refuerza la idea de que la eficacia de diálisis no se relaciona con la depuración de bisfenoles (172,181)

En nuestro análisis multivariado, la variación de los niveles de BPAF evidenciada no se correlacionó con ninguna variable clínica, terapéutica ni analítica, lo cual sugiere que los cambios observados pueden deberse a la intervención realizada durante el estudio. (Tabla 17). Al no existir una especificación por parte del fabricante acerca del contenido de los distintos tipos de bisfenoles en los dializadores, se realizó un análisis conjunto de todos los subtipos de bisfenoles, considerándolos marcadores de presencia de microplásticos, en el que tampoco se obtuvieron diferencias significativas.

Actualmente no existe un método de determinación estandarizado para los MNPLs, debido a su naturaleza diversa, por lo que los bisfenoles son uno de los principales marcadores utilizados para biomonitorizar la exposición. Probablemente la medición de bisfenoles sea solo la punta del iceberg en un problema mucho mayor, que es la interacción de los seres vivos con los MNPLs, fundamentalmente a través de su penetración en la cadena alimentaria. Se han identificado diversos compuestos o aditivos de los MNPLs con potenciales efectos tóxicos. No obstante, es probable que existan aún muchas moléculas sin catalogar o de las cuales se desconoce el efecto biológico, de forma similar a lo que ocurre con las toxinas urémicas.

Análisis de los niveles de daño genómico después de reducir la exposición a bisfenoles.

La interacción de ciertos agentes químicos, físicos o biológicos con el material genético es un hecho demostrado décadas antes de la descripción plena de la molécula de ADN (212–214). El desarrollo de técnicas que permiten medir el poder genotóxico de una determinada molécula ha sido fundamental en el campo de la biomonitorización, eco toxicología, nutrigenómica, virología, validación de nuevas drogas, etc. En nuestro estudio se empleó el SCGE y MN por tratarse de dos técnicas de sensibilidad y poder estadístico demostrado en numerosas series. Dado que el SCGE permite determinar la rotura de cadenas simples o dobles de ADN, y el estudio de la frecuencia de MN indica daño cromosómico, varios autores sugieren que la combinación de ambas técnicas es el *gold standard* actual de los tests de mutagénesis (103,215).

En la población estudiada, los niveles de daño genómico basal en el momento inicial eran superiores al observado en población sana, tal y como habíamos descrito en estudios previos, posiblemente debido al perfil de antigüedad en diálisis, comorbilidad y edad de los

individuos. El principal hallazgo de nuestro estudio es una reducción significativa de los niveles de daño genómico basal medido por SCGE, después de sustituir el dializador por uno libre de BPA, y tras 6 meses de seguimiento. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de BNMN ni en el CPBI. Los niveles iniciales de daño genómico basal no se relacionaron con ninguna de las variables incluidas en el análisis multivariado, no obstante, en el modelo de regresión se pudo evidenciar que los pacientes con niveles más elevados de daño basal tuvieron un descenso mayor a los 6 meses. Del mismo modo, variables como la antigüedad en diálisis o el nivel de PCR, también demostraron una correlación positiva con el descenso del daño genómico basal medido por SCGE. Por el contrario, aquellos individuos con antecedentes de patologías cardiovasculares tuvieron un descenso menor del daño genómico, tendencia que también se observa en los pacientes con un índice de comorbilidad elevado. Por otra parte, no se observa ninguna variación entre los niveles de daño oxidativo al inicio y al final del estudio, lo cual nos sugiere que el efecto deletéreo producto de la exposición al dializador con BPA no estaría directamente relacionado con el daño oxidativo sino que estaría provocando por roturas del ADN, a diferencia de lo observado en series publicadas en las que se estudió el impacto de ciertas terapias antioxidantes (jugo de uva fermentado, dializadores impregnados en vitamina E), en las cuales la reducción del daño genómico fue especialmente significativa en su vertiente oxidativa (117,118).

Respecto a los resultados con el ensayo de MN, no se ha visto un cambio significativo tras el periodo de seguimiento. A diferencia del SCGE, para que el daño genómico se refleje con MN es necesario que la célula se divida, por lo que, si no se ha producido una reducción drástica del daño, la aparición de MN podría demorarse, tomando en cuenta que la vida media de los linfocitos es de meses. Por su parte el SCGE es un buen biomarcador de efecto temprano, es decir, que es capaz de detectar alteraciones en el ADN antes que con otras técnicas, aunque hay que considerar que algunas de estas lesiones se podrían reparar y por tanto, no serían observables en el ensayo de MN, por ejemplo.

Diversos estudios han intentado valorar el potencial genotóxico de los bisfenoles, especialmente el BPA, que tradicionalmente ha sido el foco de mayor interés científico. Sin embargo, la evidencia acumulada se basa fundamentalmente en modelos in vitro o animales. En 2006 Takako et al, demuestran el daño del ADN (SCGE) inducido por el BPA y la activación del receptor de estradiol en un modelo celular (216). Resultados similares se han obtenido en otros modelos in vitro con células animales que han intentado relacionar la exposición al BPA o sus análogos con daño del ADN (217,218). En humanos, algunos modelos celulares han demostrado el potencial genotóxico de los bisfenoles, mediante el cultivo celular y la exposición in vitro (219–221). Finalmente, en 2023 Karzi et al. han intentado

reproducir el patrón de exposición medioambiental a distintos agentes genotóxicos (incluido el BPA) en una población de conejos, para luego estimar el daño genómico mediante SCGE y micronúcleos, concluyendo que el tiempo de exposición condiciona el nivel de daño del ADN (222).

Actualmente, no existen estudios que analicen el potencial genotóxico de los bisfenoles *in vivo* en humanos. En tal sentido, y debido a las características de la patología, la población en hemodiálisis constituye un modelo muy representativo para estudiar dicha relación, y nuestro estudio es el primero que evalúa la posibilidad de disminuir el daño genómico al reducir la exposición a bisfenoles en pacientes con ERC en programa de hemodiálisis. Nuestros hallazgos contribuyen a fortalecer la evidencia de que es necesario sustituir materiales como los bisfenoles en la fabricación de dispositivos médicos, especialmente los utilizados en hemodiálisis, con el objetivo de intentar reducir la elevada morbimortalidad que presenta dicha población.

Limitaciones.

Nuestro estudio presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, las características de nuestra unidad de diálisis, junto con los protocolos de procesamiento de las muestras para determinar daño genómico, no han permitido seleccionar una muestra de mayor tamaño. Gran parte de la investigación se ha llevado a cabo durante la pandemia del SARS-COV2, lo cual ha producido un número importante de abandonos por fallecimiento, y ha condicionado notablemente el desarrollo del estudio al vernos obligados a suspender toda actividad de investigación para centrarnos en la emergencia sanitaria.

8. CONCLUSIONES.

8. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos, ha permitido dar respuesta a los objetivos planteados en el estudio, llegando a las siguientes conclusiones:

1. La utilización de un dializador libre de BPA, no tuvo un impacto relevante en los niveles de BPA, más si en uno de sus análogos, el BPAF, que presentó una reducción significativa.
2. La disminución de los niveles de BPAF no se correlacionó con ninguna variable clínica, analítica o terapéutica, lo cual indica que dicha variación se debe al cambio de dializador.
3. La utilización de dializadores libres de BPA, ha producido una reducción significativa del daño genómico basal (total) medido por ensayo de cometa, más no en su vertiente oxidativa. Dicho hallazgo indica que el daño sobre la molécula de ADN se produciría por la rotura directa de cadenas y no mediante la oxidación de bases nitrogenadas, tal y como se había descrito en estudios previos realizados con terapias antioxidantes.
4. Ciertas características clínicas, como la antigüedad en diálisis, el daño basal y el grado de inflamación de los pacientes, condicionan una mayor disminución del daño genómico al cambiar el dializador por uno libre de BPA.
5. No se aprecian cambios en el daño medido mediante ensayo de micronúcleos, posiblemente por tratarse de un marcador de efecto más tardío.

9. LINEAS DE FUTURO.

9. LINEAS DE FUTURO:

El presente proyecto representa la etapa más reciente dentro de una línea de investigación conjunta entre la Fundació Puigvert y el Laboratorio de Mutagénesis de la UAB, que se ha desarrollado en los últimos 20 años, y que estudia la relación entre la ERC y el daño genómico, haciendo énfasis en las posibles estrategias terapéuticas. El siguiente paso dentro de nuestra línea es la evaluación del impacto de las distintas modalidades de ferroterapia endovenosa en los niveles de estrés oxidativo y daño genómico en los pacientes en hemodiálisis.

La relación de la exposición a bisfenoles con la salud humana es un área de investigación en auge desde hace una década, en la que la nueva evidencia genera a su vez nuevas interrogantes. Especialmente en la población en hemodiálisis, existen muchas cuestiones sin resolver, empezando por definir las fuentes reales de bisfenoles y derivados clorados, determinar la eficacia real de las distintas técnicas de diálisis en la eliminación de bisfenoles y finalmente intentar correlacionar la exposición a bisfenoles con consecuencias clínicas. Posiblemente, el principal objetivo de las investigaciones futuras sea desarrollar una técnica que nos permita determinar la presencia de MNPLs en distintas matrices biológicas para luego poder evaluar la exposición de los pacientes en hemodiálisis, y sus potenciales consecuencias.

10. BIBLIOGRAFÍA.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, et al. Documento de la sociedad española de nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 2014;34(3):302–16.
2. Bello AK, Johnson DW, Feehally J, Harris D, Jindal K, Lunney M, et al. Global Kidney Health Atlas (GKHA): design and methods. *Kidney Int Suppl* (2011). 2017 Oct 1;7(2):145–53.
3. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260–72.
4. Luyckx VA, Tonelli M, Stanifer JW. The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. *Bull World Health Organ*. 2018 Jun 1;96(6):414-422C.
5. Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaría R, et al. Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrología*. 2018 Nov;38(6):606–15.
6. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Jul 1;11(7).
7. Soriano Cabrera S. Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 2004;24:27–34.
8. Levey AS. A decade after the KDOQI CKD guidelines. *American Journal of Kidney Diseases*. 2012;60(5):683–5.
9. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: Synopsis of the kidney disease: Improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med*. 2013 Jun 4;158(11):825–30.
10. García-Maset R, Bover J, Segura de la Morena J, Goicoechea Diezhandino M, Cebollada del Hoyo J, Escalada San Martín J, et al. Information and consensus document for the detection and management of chronic kidney disease. *Nefrología*. 2022 May 1;42(3):233–64.
11. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2019 Oct 1;322(13):1294–304.

12. Cases A, Egocheaga MI, Tranche S, Pallarés V, Ojeda R, Górriz JL, et al. Anemia of chronic kidney disease: Protocol of study, management and referral to Nephrology. *Nefrologia*. 2018 Jan 1;38(1):8–12.
13. Ortiz A, Galán CDA, Carlos Fernández-García J, Cerezo JG, Ochoa RI, Núñez J, et al. Consensus document on the management of hyperkalemia. *Nefrologia*. 2023 Nov;43(6):765–82.
14. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what’s changed and why it matters. *Kidney Int*. 2017 Jul 1;92(1):26–36.
15. Sahathevan S, Khor BH, Ng HM, Gafor AHA, Daud ZAM, Mafra D, et al. Understanding development of malnutrition in hemodialysis patients: A narrative review. *Nutrients*. 2020 Oct 1;12(10):1–30.
16. Registro Español de Enfermos Renales (REER), Informe 2021. Disponible en: https://www.ont.es/wp-content/uploads/2023/01/MEMORIA-REER-2021_PRELIMINAR.pdf. Último acceso: 17/04/2024.
17. Mohajerani F, Clark WR, Ronco C, Narsimhan V. Mass Transport in High-Flux Hemodialysis Application of Engineering Principles to Clinical Prescription. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2022 May 1;17(5):749–56.
18. Ronco C, Clark WR. Haemodialysis membranes. *Nat Rev Nephrol*. 2018 Jun 1;14(6):394–410.
19. Martínez Ocaña O. Catéter-fístula: una nueva alternativa en la punción de accesos vasculares. *Rev Soc Esp Enferm Nefrol*. 2010 Apr;13.
20. Cueto Hernández I, de Dios Duarte MJ, Martín Alonso MT. Manual CTO enfermería. enfermería médico quirúrgica. Urología y nefrología. 9th ed. Madrid: CTO, DL; 2019.
21. Lysaght MJ. The History of Hemofiltration. *Hemofiltration*. 1986;1–15.
22. Von Albertini B. Producing on-line ultrapure dialysis fluid. *Contrib Nephrol*. 2011;175:46–56.
23. Section IV. Dialysis fluid purity. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2002;17(SUPPL. 7):45–62.
24. Fernández Lucas M, Teruel Briones JL. Técnicas de Hemodiálisis. En: *Nefrología al Día*. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-tecnicas-hemodialisis-575>. Último acceso: 17/04/2022.
25. Maduell F, Moreso F, Pons M, Ramos R, Mora-Macià J, Carreras J, et al. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013 Feb 28;24(3):487–97.

26. Locatelli F, Hörl WH. Dialysis: A step towards making online haemodiafiltration a gold standard. *Nat Rev Nephrol.* 2013 Jun;9(6):316–8.
27. Chan CT, Blankestijn PJ, Dember LM, Gallieni M, Harris DCH, Lok CE, et al. Dialysis initiation, modality choice, access, and prescription: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 2019 Jul 1;96(1):37–47.
28. Alcalde-Bezhoid G, Alcázar-Arroyo R, Angoso-de-Guzmán M, Arenas MD, Arias-Guillén M, Arribas-Cobo P, et al. Guía de unidades de hemodiálisis 2020. *Nefrología.* 2021 Dec 1;41:1–77.
29. Perez-Garcia R, Alcazar-Arroyo R, de Sequera-Ortiz P. What is the role of expanded hemodialysis in renal replacement therapy in 2020? *Nefrologia.* 2021 May;41(3):227–36.
30. Ibeas J, Roca-Tey R, Vallespín J, Moreno T, Moñux G, Martí-Monrós A, et al. Spanish Clinical Guidelines on Vascular Access for Haemodialysis. *Nefrologia.* 2017 Nov;37 Suppl 1:1–191.
31. Santoro A, Mandreoli M. Chronic renal disease and risk of cardiovascular morbidity-mortality. *Kidney Blood Press Res.* 2014 May 22;39(2–3):142–6.
32. Hillege HL, Fidler V, Diercks GFH, Van Gilst WH, De Zeeuw D, Van Veldhuisen DJ, et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation.* 2002 Oct 1;106(14):1777–82.
33. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *The Lancet.* 2010;375(9731):2073–81.
34. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Biló HJG, Chalmers J, Lambers Heerspink HJ, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: A meta-analysis. *The Lancet.* 2012;380(9854):1662–73.
35. Mahmoodi BK, Matsushita K, Woodward M, Blankestijn PJ, Cirillo M, Ohkubo T, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without hypertension: A meta-analysis. *The Lancet.* 2012;380(9854):1649–61.
36. Jørgensen L, Heuch I, Jenssen T, Jacobsen BK. Association of albuminuria and cancer incidence. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2008 May;19(5):992–8.

37. Wong G, Hayen A, Chapman JR, Webster AC, Jie JW, Mitchell P, et al. Association of CKD and cancer risk in older people. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009 Jun;20(6):1341–50.
38. Shebl FM, Warren JL, Eggers PW, Engels EA. Cancer risk among elderly persons with end-stage renal disease: A population-based case-control study. *BMC Nephrol*. 2012;13(1).
39. Rosner MH, Reis T, Husain-Syed F, Vanholder R, Hutchison C, Stenvinkel P, et al. Classification of Uremic Toxins and Their Role in Kidney Failure. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2021 Dec 1;16(12):1918–28.
40. Hulko M, Dietrich V, Koch I, Gekeler A, Gebert M, Beck W, et al. Pyrogen retention: Comparison of the novel medium cut-off (MCO) membrane with other dialyser membranes. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
41. Maduell F, Rodas L, Broseta JJ, Gomez M, Xipell M, Guillen E, et al. Medium Cut-Off Dialyzer versus Eight Hemodiafiltration Dialyzers: Comparison Using a Global Removal Score. *Blood Purif*. 2019 Aug 1;48(2):167–74.
42. Weiner DE, Falzon L, Skoufos L, Bernardo A, Beck W, Xiao M, et al. Efficacy and safety of expanded hemodialysis with the theranova 400 dialyzer: A randomized controlled trial. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2020 Sep 7;15(9):1310–9.
43. Ebert T, Pawelzik SC, Witasp A, Arefin S, Hobson S, Kublickiene K, et al. Inflammation and premature ageing in chronic kidney disease. *Toxins (Basel)*. 2020 Apr 1;12(4).
44. Sato Y, Yanagita M. Immunology of the ageing kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2019 Oct 1;15(10):625–40.
45. Kooman JP, Kotanko P, Schols AMWJ, Shiels PG, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and premature ageing. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Dec 23;10(12):732–42.
46. Azpiazu D, Gonzalo S, González-Parra E, Egido J, Villa-Bellosta R. Role of pyrophosphate in vascular calcification in chronic kidney disease. *Nefrología*. 2018 May;38(3):250–7.
47. Covic A, Vervloet M, Massy ZA, Torres PU, Goldsmith D, Brandenburg V, et al. Bone and mineral disorders in chronic kidney disease: implications for cardiovascular health and ageing in the general population. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018 Apr 1;6(4):319–31.
48. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Dounousi E, Mertens PR. Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.

49. Stoyanova E, Sandoval SB, Zúñiga LA, El-Yamani N, Coll E, Pastor S, et al. Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Mar;25(3):879–85.
50. Kang TC. Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) and Mitochondrial Dynamics/Mitophagy in Neurological Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 15;9(7):1–20.
51. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018 Dec 1;108:656–62.
52. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med*. 2019 Dec 1;51(12).
53. LEHNINGER AL. Oxidative phosphorylation. *Harvey Lect*. 1953;49:176–215.
54. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018 Jan 1;13:757–72.
55. Tretter V. Special Issue: Cellular Oxygen Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2022 May 1;23(9).
56. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015 Jan 1;30(1):11–26.
57. Corredor Z, Stoyanova E, Rodríguez-Ribera L, Coll E, Silva I, Diaz JM, et al. Genomic damage as a biomarker of chronic kidney disease status. *Environ Mol Mutagen*. 2015 Apr 1;56(3):301–12.
58. Marotte C, Zeni SN. Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2013;47(4):661–74.
59. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015 Apr 21;97:55–74.
60. Martín-Fernández B, Gredilla R. Mitochondrial oxidative stress and cardiac ageing. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*. 2018 Mar 1;30(2):74–83.
61. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Nov 1;19(11).
62. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105–21.
63. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther*. 2021 Jan 1;17(1):22–8.
64. Otoupalova E, Smith S, Cheng G, Thannickal VJ. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis. *Compr Physiol*. 2020 Apr 1;10(2):509–47.

65. An Y, Xu B tuo, Wan S rong, Ma X mei, Long Y, Xu Y, et al. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol*. 2023 Dec 1;22(1).
66. Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bull Exp Biol Med*. 2021 May 1;171(2):179–89.
67. Winiarska A, Knysak M, Nabrdalik K, Gumprecht J, Stompór T. Inflammation and oxidative stress in diabetic kidney disease: The targets for SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 1;22(19).
68. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardioplipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 21;20(39):14205–18.
69. Lee J, Park JS, Roh YS. Molecular insights into the role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Pharm Res*. 2019 Nov 1;42(11):935–46.
70. Modlinger PS, Wilcox CS, Aslam S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin Nephrol*. 2004;24(4):354–65.
71. Cachofeiro V, Goicochea M, De Vinuesa SG, Oubña P, Lahera V, Lño J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int*. 2008 Dec;74(SUPPL. 111).
72. Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*. 2022 Feb 1;11(3).
73. Mehdi MM, Solanki P, Singh P. Oxidative stress, antioxidants, hormesis and calorie restriction: The current perspective in the biology of aging. *Arch Gerontol Geriatr*. 2021 Jul 1;95.
74. Martemucci G, Portincasa P, Di Ciaula A, Mariano M, Centonze V, D'Alessandro AG. Oxidative stress, aging, antioxidant supplementation and their impact on human health: An overview. *Mech Ageing Dev*. 2022 Sep 1;206.
75. World Health Organization. Environmental Health Criteria. BIOMARKERS IN RISK ASSESSMENT: VALIDITY AND VALIDATION. 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9241572221>. Último acceso: 10/04/2024.
76. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol*. 2017 Mar 1;76:9.23.1-9.23.17.
77. Wang J, Tan GJ, Han LN, Bai YY, He M, Liu H Bin. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2017;14(2):135–50.

78. Sandoval SB, Pastor S, Stoyanova E, Rodríguez-Ribera L, García-Quispes WA, Coll E, et al. Genomic instability in chronic renal failure patients. *Environ Mol Mutagen*. 2012 Jun;53(5):343–9.
79. Atha DH, Reipa V. Standards for Quantitative Measurement of DNA Damage in Mammalian Cells. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 1;24(6).
80. Mitchelmore CL, Chipman JK. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res*. 1998 Mar 20;399(2):135–47.
81. Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005;96(SUPPL. 1):1–42.
82. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291–8.
83. McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):183–90.
84. Azqueta A, Ladeira C, Giovannelli L, Boutet-Robinet E, Bonassi S, Neri M, et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2020 Jan 1;783.
85. Huk A, Collins AR, Yamani N El, Porredon C, Azqueta A, De Lapuente J, et al. Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. *Mutagenesis*. 2015 Jan 1;30(1):85–8.
86. Aycicek A, Kocyigit A, Erel O, Senturk H. Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. *J Pediatr (Rio J)*. 2008 Mar;84(2):141–6.
87. Zhu Y, Yin J. A quantitative comet assay: imaging and analysis of virus plaques formed with a liquid overlay. *J Virol Methods*. 2007 Jan;139(1):100–2.
88. de Lapuente J, Lourenço J, Mendo SA, Borràs M, Martins MG, Costa PM, et al. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Front Genet*. 2015;6(JUN):180.
89. Hobbs CA, Swartz C, Maronpot R, Davis J, Recio L, Hayashi S mo. Evaluation of the genotoxicity of the food additive, gum ghatti. *Food Chem Toxicol*. 2012 Mar;50(3–4):854–60.
90. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184–91.
91. Collins AR, Dušinská M, Gedik CM, Štětina R. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect*. 1996;104(SUPPL. 3):465–9.

92. Collins A, Møller P, Gajski G, Vodenková S, Abdulwahed A, Anderson D, et al. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nat Protoc.* 2023 Mar 1;18(3):929–89.
93. Miller JM, Mardhekar NM, Rajasekaran V, Zhang J, Kannappan R. Assessing stem cell DNA integrity for cardiac cell therapy. *Journal of Visualized Experiments.* 2019 Jan 1;2019(143).
94. Fang L, Neutzner A, Turtschi S, Flammer J, Mozaffarieh M. Comet assay as an indirect measure of systemic oxidative stress. *Journal of Visualized Experiments.* 2015 May 22;2015(99).
95. Collins AR. The Use of Bacterial Repair Endonucleases in the Comet Assay. *Methods Mol Biol.* 2017;1641:173–84.
96. Aykanat B, Demircigil GC, Fidan K, Buyan N, Gulleroglu K, Baskin E, et al. Basal damage and oxidative DNA damage in children with chronic kidney disease measured by use of the comet assay. *Mutat Res.* 2011 Oct 9;725(1–2):22–8.
97. Bajpayee M, Kumar A, Dhawan A. The Comet Assay: A Versatile Tool for Assessing DNA Damage. *Issues in Toxicology.* 2016 Oct 7;2017-January(30):3–64.
98. Sandoval SB, Stoyanova E, Coll E, Pastor S, Reyes J, Andrés E, et al. Genetic damage in chronic renal failure patients is associated with the glomerular filtration rate index. *Mutagenesis.* 2010 Nov;25(6):603–8.
99. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007 Mar;28(3):625–31.
100. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000 Nov 20;455(1–2):155–66.
101. Sears DA, Udden MM. Howell-jolly bodies: A brief historical review. *American Journal of the Medical Sciences.* 2012;343(5):407–9.
102. Dawson DW, Bury HP. The significance of Howell-Jolly bodies and giant metamyelocytes in marrow smears. *J Clin Pathol.* 1961;14:374–80.
103. Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sá Júnior PL, Nozima BHN, Ito ET, et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother.* 2015 May 1;72:74–82.
104. MacLean-Fletcher S, Pollard TD. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell.* 1980;20(2):329–41.
105. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011 Jan;26(1):125–32.

106. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. *Genes (Basel)*. 2020 Oct 1;11(10):1–13.
107. Rodríguez-Ribera L, Corredor Z, Sandoval SB, Coll E, Silva I, Diaz JM, et al. Radiosensitivity in patients suffering from chronic kidney disease. *Int J Radiat Biol*. 2015 Feb 1;91(2):172–8.
108. Malachi T, Zevin D, Gafter U, Chagnac A, Slor H, Levi J. DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients. *Kidney Int*. 1993;44(2):385–9.
109. Friedman J, Levi J, Malachi T, Slor H. Pronounced depressed ability of dna repair in uremic human lymphocytes. *Transplantation*. 1988;45(3):665–6.
110. Matsushita K, Ballew SH, Wang AYM, Kalyesubula R, Schaeffner E, Agarwal R. Epidemiology and risk of cardiovascular disease in populations with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2022 Nov 1;18(11):696–707.
111. Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Buccianti G, Lowenfels AB, et al. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: An international collaborative study. *Lancet*. 1999 Jul 10;354(9173):93–9.
112. Webster AC, Nagler E V., Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*. 2017 Mar 25;389(10075):1238–52.
113. Coll E, Stoyanova E, Rodríguez-Ribera L, Solozábal M, Pastor S, Silva I, et al. Genomic damage as an independent predictor marker of mortality in hemodialysis patients. *Clin Nephrol*. 2013;80(2):81–7.
114. Schupp N, Stopper H, Rutkowski P, Kobras K, Nebel M, Bahner U, et al. Effect of different hemodialysis regimens on genomic damage in end-stage renal failure. *Semin Nephrol*. 2006;26(1):28–32.
115. Corredor Z, Rodríguez-Ribera L, Silva I, Díaz JM, Ballarín J, Marcos R, et al. Levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients undergoing standard hemodialysis vs on-line hemodiafiltration: A comet assay investigation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016 Sep 15;808:1–7.
116. Stopper H, Treutlein AT, Bahner U, Schupp N, Schmid U, Brink A, et al. Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008 Oct;23(10):3272–9.
117. Corredor Z, Rodríguez-Ribera L, Coll E, Montañés R, Diaz JM, Ballarin J, et al. Unfermented grape juice reduce genomic damage on patients undergoing hemodialysis. *Food Chem Toxicol*. 2016 Jun 1;92:1–7.
118. Rodríguez-Ribera L, Corredor Z, Silva I, Díaz JM, Ballarín J, Marcos R, et al. Vitamin E-coated dialysis membranes reduce the levels of oxidative genetic damage in

- hemodialysis patients. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2017 Mar 1;815:16–21.
119. Rodríguez-Ribera L, Stoyanova E, Corredor Z, Coll E, Silva I, Diaz JM, et al. Time in hemodialysis modulates the levels of genetic damage in hemodialysis patients. *Environ Mol Mutagen*. 2014;55(4):363–8.
 120. Stoyanova E, Pastor S, Coll E, Azqueta A, Collins AR, Marcos R. Base excision repair capacity in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis treatment. *Cell Biochem Funct*. 2014;32(2):177–82.
 121. Rodríguez-Ribera L, Pastor S, Corredor Z, Silva I, Diaz JM, Ballarin J, et al. Genetic damage in patients moving from hemodialysis to online hemodiafiltration. *Mutagenesis*. 2016 Mar 1;31(2):131–5.
 122. Corredor Z, Rodríguez-Ribera L, Coll E, Silva I, Díaz JM, Ballarín J, et al. DNA damage in kidney transplant patients. Role of organ origin. *Environ Mol Mutagen*. 2017 Dec 1;58(9):712–8.
 123. Pastor S, Rodríguez-Ribera L, Corredor Z, da Silva Filho MI, Hemminki K, Coll E, et al. Levels of DNA damage (Micronuclei) in patients suffering from chronic kidney disease. Role of GST polymorphisms. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2018 Dec 1;836:41–6.
 124. Pastor S, Coll E, Rodríguez-Ribera L, Stoyanova E, Corredor ZF, Marcos R. Influence of Carnicor, Venofer, and Sevelamer on the levels of genotoxic damage in end-stage renal disease patients. *Environ Mol Mutagen*. 2018 May 1;59(4):302–11.
 125. Jiang B, Kauffman AE, Li L, McFee W, Cai B, Weinstein J, et al. Health impacts of environmental contamination of micro- and nanoplastics: a review. *Environ Health Prev Med*. 2020 Jul 14;25(1).
 126. Ivleva NP. Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives. *Chem Rev*. 2021 Oct 13;121(19):11886–936.
 127. Rodrigues ACB, de Jesus GP, Waked D, Gomes GL, Silva TM, Yariwake VY, et al. Scientific Evidence about the Risks of Micro and Nanoplastics (MNPLs) to Human Health and Their Exposure Routes through the Environment. *Toxics*. 2022 Jun 1;10(6).
 128. Cózar A, Echevarría F, González-Gordillo JI, Irigoien X, Úbeda B, Hernández-León S, et al. Plastic debris in the open ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 15;111(28):10239–44.
 129. Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options,. Paris: OCDE Library.; 2022.

130. Cincinelli A, Scopetani C, Chelazzi D, Lombardini E, Martellini T, Katsoyiannis A, et al. Microplastic in the surface waters of the Ross Sea (Antarctica): Occurrence, distribution and characterization by FTIR. *Chemosphere*. 2017;175:391–400.
131. Cunningham EM, Ehlers SM, Dick JTA, Sigwart JD, Linse K, Dick JJ, et al. High Abundances of Microplastic Pollution in Deep-Sea Sediments: Evidence from Antarctica and the Southern Ocean. *Environ Sci Technol*. 2020 Nov 3;54(21):13661–71.
132. Yee MSL, Hii LW, Looi CK, Lim WM, Wong SF, Kok YY, et al. Impact of Microplastics and Nanoplastics on Human Health. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Feb 16;11(2):1–23.
133. Rubio L, Barguilla I, Domenech J, Marcos R, Hernández A. Biological effects, including oxidative stress and genotoxic damage, of polystyrene nanoparticles in different human hematopoietic cell lines. *J Hazard Mater*. 2020 Nov 5;398.
134. Wright SL, Thompson RC, Galloway TS. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environ Pollut*. 2013;178:483–92.
135. Loos C, Syrovets T, Musyanovych A, Mailänder V, Landfester K, Nienhaus GU, et al. Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio-nano interactions. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2014;5(1):2403–12.
136. Mattsson K, Johnson E V., Malmendal A, Linse S, Hansson LA, Cedervall T. Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
137. Lehner R, Weder C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environ Sci Technol*. 2019;
138. Domenech J, Hernández A, Rubio L, Marcos R, Cortés C. Interactions of polystyrene nanoplastics with in vitro models of the human intestinal barrier. *Arch Toxicol*. 2020 Sep 1;94(9):2997–3012.
139. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*. 2012 Oct;50(10):3725–40.
140. Murakami K, Ohashi A, Hori H, Hibiya M, Shoji Y, Kunisaki M, et al. Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients. *Blood Purif*. 2007 Jul;25(3):290–4.
141. Dodds EC, Goldberg L, Lawson W, Robinson B. OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds. *Nature* 1938 141:3562. 1938 Mar 1;141(3562):247–8.
142. González-Parra E, Herrero JA, Elewa U, Bosch RJ, Arduán AO, Egido J. Bisphenol a in chronic kidney disease. *Int J Nephrol*. 2013;2013.
143. Sonavane M, Gassman NR. Bisphenol A co-exposure effects: a key factor in understanding BPA's complex mechanism and health outcomes. *Crit Rev Toxicol*. 2019 May 28;49(5):371–86.

144. Lambré C, Barat Baviera JM, Bolognesi C, Chesson A, Cocconcelli PS, Crebelli R, et al. Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*. 2023 Apr 1;21(4).
145. No consumer health risk from bisphenol A exposure. 2015. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150121>. Último acceso: 17/04/2024.
146. Peivasteh-roudsari L, Barzegar-bafrouei R, Sharifi KA, Azimisalim S, Karami M, Abedinzadeh S, et al. Origin, dietary exposure, and toxicity of endocrine-disrupting food chemical contaminants: A comprehensive review. *Heliyon*. 2023 Jul 1;9(7).
147. Cambien G, Dupuis A, Belmouaz M, Bauwens M, Bacle A, Ragot S, et al. Bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A assessment in end stage renal disease patients: Impact of dialysis therapy. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2024 Jan 15;270.
148. Andújar N, Gálvez-Ontiveros Y, Zafra-Gómez A, Rodrigo L, Álvarez-Cubero MJ, Aguilera M, et al. Bisphenol A analogues in food and their hormonal and obesogenic effects: A review. *Nutrients*. 2019 Sep 1;11(9).
149. Carwile JL, Ye X, Zhou X, Calafat AM, Michels KB. Canned soup consumption and urinary bisphenol A: A randomized crossover trial. *JAMA*. 2011;306(20):2218–20.
150. Food Contact Material Legislation. Disponible en: https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/food-contact-materials/legislation_en. Último acceso: 17/04/2024.
151. Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, Schurman SH, Twaddle NC, Churchwell MI, et al. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ Int*. 2015 Oct 1;83:107–15.
152. Taylor JA, vom Saal FS, Welshons W V., Drury B, Rottinghaus G, Hunt PA, et al. Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: Relevance for human exposure. *Environ Health Perspect*. 2011 Apr;119(4):422–30.
153. Mathew M, Sreedhanya S, Manoj P, Aravindakumar CT, Aravind UK. Exploring the interaction of bisphenol-S with serum albumins: A better or worse alternative for bisphenol A? *Journal of Physical Chemistry B*. 2014 Apr 10;118(14):3832–43.
154. Quiroga B. Strategies to Protect Dialysis Patients against Bisphenol A. *Biomolecules*. 2021 Sep 1;11(9).
155. Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Apr 1;228(1):114–34.
156. Cimmino I, Fiory F, Perruolo G, Miele C, Beguinot F, Formisano P, et al. Potential mechanisms of bisphenol a (BPA) contributing to human disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 2;21(16):1–22.

157. Lemmen JG, Arends RJ, van Boxtel AL, van der Saag PT, van der Burg B. Tissue- and time-dependent estrogen receptor activation in estrogen reporter mice. *J Mol Endocrinol*. 2004 Jun;32(3):689–701.
158. Le Maire A, Bourguet W, Balaguer P. A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Apr;67(8):1219–37.
159. Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol*. 1998;158(3):327–39.
160. Rahman MS, Kang KH, Arifuzzaman S, Pang WK, Ryu DY, Song WH, et al. Effect of antioxidants on BPA-induced stress on sperm function in a mouse model. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
161. Amjad S, Rahman MS, Pang MG. Role of Antioxidants in Alleviating Bisphenol A Toxicity. *Biomolecules*. 2020 Aug 1;10(8):1–26.
162. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006 Sep 21;226(2–3):79–89.
163. Ryu DY, Pang WK, Adegoke EO, Rahman MS, Park YJ, Pang MG. Abnormal histone replacement following BPA exposure affects spermatogenesis and fertility sequentially. *Environ Int*. 2022 Dec 1;170.
164. Pivonello C, Muscogiuri G, Nardone A, Garifalos F, Provisiero DP, Verde N, et al. Bisphenol A: An emerging threat to female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020 Mar 14;18(1).
165. Naomi R, Yazid MD, Bahari H, Keong YY, Rajandram R, Embong H, et al. Bisphenol A (BPA) Leading to Obesity and Cardiovascular Complications: A Compilation of Current In Vivo Study. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 1;23(6).
166. Yan S, Chen Y, Dong M, Song W, Belcher SM, Wang HS. Bisphenol A and 17 β -estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling. *PLoS One*. 2011 Sep 27;6(9).
167. Liu G, Cai W, Liu H, Jiang H, Bi Y, Wang H. The association of bisphenol a and phthalates with risk of breast cancer: A meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Mar 1;18(5):1–15.
168. Xiong S, Wang Y, Li H, Zhang X. Low Dose of Bisphenol A Activates NF- κ B/IL-6 Signals to Increase Malignancy of Neuroblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2017 Aug 1;37(6):1095–103.
169. Rebolledo-Solleiro D, Castillo Flores LY, Solleiro-Villavicencio H. Impact of BPA on behavior, neurodevelopment and neurodegeneration. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 2021 Jan 1;26(2):363–400.

170. Welch C, Mulligan K. Does Bisphenol A Confer Risk of Neurodevelopmental Disorders? What We Have Learned from Developmental Neurotoxicity Studies in Animal Models. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 1;23(5).
171. Bosch RJ, Quiroga B, Muñoz-Moreno C, Olea-Herrero N, Arenas MI, González-Santander M, et al. El bisfenol A: un factor ambiental implicado en el daño nefrovascular. *Nefrología.* 2016 Jan;36(1):5–9.
172. Krieter DH, Canaud B, Lemke HD, Rodriguez A, Morgenroth A, von Appen K, et al. Bisphenol A in chronic kidney disease. *Artif Organs.* 2013 Mar;37(3):283–90.
173. Li M, Bi Y, Qi L, Wang T, Xu M, Huang Y, et al. Exposure to bisphenol A is associated with low-grade albuminuria in Chinese adults. *Kidney Int.* 2012 Jun 1;81(11):1131–9.
174. Olea-Herrero N, Arenas MI, Muñoz-Moreno C, Moreno-Gómez-Toledano R, González-Santander M, Arribas I, et al. Bisphenol-A induces podocytopathy with proteinuria in mice. *J Cell Physiol.* 2014;229(12):2057–66.
175. Moreno-Gómez-Toledano R, Arenas MI, González-Martínez C, Olea-Herrero N, Reventún P, Di Nunzio M, et al. Bisphenol A impaired cell adhesion by altering the expression of adhesion and cytoskeleton proteins on human podocytes. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1).
176. Hu J, Wang Y, Xiang X, Peng C, Gao R, Goswami R, et al. Serum bisphenol A as a predictor of chronic kidney disease progression in primary hypertension: A 6-year prospective study. *J Hypertens.* 2016 Feb 1;34(2):332–7.
177. Hu J, Yang S, Wang Y, Goswami R, Peng C, Gao R, et al. Serum bisphenol A and progression of type 2 diabetic nephropathy: a 6-year prospective study. *Acta Diabetol.* 2015 Dec 1;52(6):1135–41.
178. Testai E, Hartemann P, Rodríguez-Farre E, Rastogi SC, Bustos J, Gundert-Remy U, et al. The safety of the use of bisphenol A in medical devices. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2016 Aug 1;79:106–7.
179. Yamasaki H, Nagake Y, Makino H. Determination of bisphenol A in effluents of hemodialyzers. *Nephron.* 2001;88(4):376–8.
180. Mas S, Bosch-Panadero E, Abaigar P, Camarero V, Mahillo I, Civantos E, et al. Influence of dialysis membrane composition on plasma bisphenol A levels during online hemodiafiltration. *PLoS One.* 2018 Mar 1;13(3).
181. Bosch-Panadero E, Mas S, Sanchez-Ospina D, Camarero V, Pérez-Gómez M V., Saez-Calero I, et al. The choice of hemodialysis membrane affects bisphenol a levels in blood. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2016 May 1;27(5):1566–74.
182. Quiroga B, Bosch RJ, Fiallos RA, Sánchez-Heras M, Olea-Herrero N, López-Aparicio P, et al. Online Hemodiafiltration Reduces Bisphenol A Levels. *Therapeutic Apheresis and Dialysis.* 2017 Feb 1;21(1):96–101.

183. Shankar A, Teppala S, Sabanayagam C. Bisphenol A and peripheral arterial disease: results from the NHANES. *Environ Health Perspect*. 2012 Sep 29;120(9):1297–300.
184. Trasande L, Attina TM, Trachtman H. Bisphenol A exposure is associated with low-grade urinary albumin excretion in children of the United States. *Kidney Int*. 2013;83(4):741–8.
185. Bacle A, Dupuis A, Belmouaz M, Bauwens M, Cambien G, Venisse N, et al. Overexposure to bisphenol a and its chlorinated derivatives of patients with end-stage renal disease during online hemodiafiltration. *Biomolecules*. 2019 Sep 1;9(9).
186. Haq Z, Wang X, Cheng Q, Dias GF, Moore C, Piecha D, et al. Bisphenol A and Bisphenol S in Hemodialyzers. *Toxins (Basel)*. 2023 Jul 1;15(7).
187. Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. *Environ Health Perspect*. 2015 Jul 6;123(7):643–50.
188. Varghese S V., Hall JM. Bisphenol A substitutes and obesity: a review of the epidemiology and pathophysiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14.
189. Liao C, Liu F, Kannan K. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. *Environ Sci Technol*. 2012 Jun 19;46(12):6515–22.
190. Liao C, Kannan K. A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2014;67(1):50–9.
191. Jurek A, Leitner E. Analytical determination of bisphenol A (BPA) and bisphenol analogues in paper products by GC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2017 Jul 3;34(7):1225–38.
192. Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi VD, Mohd MA, Moon HB, et al. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: Occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol*. 2012 Jun 19;46(12):6860–6.
193. Feng Y, Yin J, Jiao Z, Shi J, Li M, Shao B. Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicol Lett*. 2012 Jun 1;211(2):201–9.
194. Chen MY, Ike M, Fujita M. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ Toxicol*. 2002;17(1):80–6.
195. Oliviero F, Marmugi A, Viguié C, Gayraud V, Picard-Hagen N, Mselli-Lakhal L. Are BPA Substitutes as Obesogenic as BPA? *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 1;23(8).
196. Abrantes-Soares F, Lorigo M, Cairrao E. Effects of BPA substitutes on the prenatal and cardiovascular systems. *Crit Rev Toxicol*. 2022;52(6):469–98.

197. Moreno-Gómez-Toledano R. Relationship between emergent BPA-substitutes and renal and cardiovascular diseases in adult population. *Environmental Pollution*. 2022 Nov 15;313.
198. Yuan X, Chen K, Zheng F, Xu S, Li Y, Wang Y, et al. Low-dose BPA and its substitute BPS promote ovarian cancer cell stemness via a non-canonical PINK1/p53 mitophagic signaling. *J Hazard Mater*. 2023 Jun 15;452.
199. Martínez M, Blanco J, Rovira J, Kumar V, Domingo JL, Schuhmacher M. Bisphenol A analogues (BPS and BPF) present a greater obesogenic capacity in 3T3-L1 cell line. *Food Chem Toxicol*. 2020 Jun 1;140.
200. Pan Y, Wu M, Shi M, Shi P, Zhao N, Zhu Y, et al. An Overview to Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors for the Detection of Bisphenol A. *Sensors (Basel)*. 2023 Oct 23;23(20).
201. Raysyan A, Zwigart SD, Eremin SA, Schneider RJ. BPA Endocrine Disruptor Detection at the Cutting Edge: FPIA and ELISA Immunoassays. *Biosensors (Basel)*. 2023 Jun 1;13(6).
202. Ďurovcová I, Kyzek S, Fabová J, Makuková J, Gálová E, Ševčovičová A. Genotoxic potential of bisphenol A: A review. *Environmental Pollution*. 2022 Aug 1;306.
203. Hercog K, Maisanaba S, Filipič M, Sollner-Dolenc M, Kač L, Žegura B. Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Science of the Total Environment*. 2019 Oct 15;687:267–76.
204. Frenzilli G, Martorell-Ribera J, Bernardeschi M, Scarcelli V, Jönsson E, Diano N, et al. Bisphenol A and Bisphenol S Induce Endocrine and Chromosomal Alterations in Brown Trout. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Mar 11;12.
205. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40(5):373–83.
206. González N, Marquès M, Cunha SC, Fernandes JO, Domingo JL, Nadal M. Biomonitoring of co-exposure to bisphenols by consumers of canned foodstuffs. *Environ Int*. 2020 Jul 1;140.
207. González N, Cunha SC, Monteiro C, Fernandes JO, Marquès M, Domingo JL, et al. Quantification of eight bisphenol analogues in blood and urine samples of workers in a hazardous waste incinerator. *Environ Res*. 2019 Sep 1;176.
208. Hoeijmakers JHJ. DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2009 Oct 8;361(15):1475–85.

209. Shan S, Zhang Y, Zhao H, Zeng T, Zhao X. Polystyrene nanoplastics penetrate across the blood-brain barrier and induce activation of microglia in the brain of mice. *Chemosphere*. 2022 Jul 1;298.
210. Chen G, Xiong S, Jing Q, van Gestel CAM, van Straalen NM, Roelofs D, et al. Maternal exposure to polystyrene nanoparticles retarded fetal growth and triggered metabolic disorders of placenta and fetus in mice. *Sci Total Environ*. 2023 Jan 1;854.
211. Li Y, Burns KA, Arao Y, Luh CJ, Korach KS. Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor α and β in vitro. *Environ Health Perspect*. 2012 Jun;120(7):1029–35.
212. Malling H V. History of the science of mutagenesis from a personal perspective. *Environ Mol Mutagen*. 2004;44(5):372–86.
213. Beale G. The discovery of mustard gas mutagenesis by Auerbach and Robson in 1941. *Genetics*. 1993;134(2):393–9.
214. Muller HJ. The Production of Mutations by X-Rays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1928 Sep;14(9):714–26.
215. Çelik A, Ekinci SY, Güler G, Yildirim S. In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. *DNA Cell Biol*. 2014 Mar 1;33(3):148–54.
216. Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, Shimamoto A, Furuichi Y. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(2):206–10.
217. Ullah A, Pirzada M, Jahan S, Ullah H, Khan MJ. Bisphenol A analogues bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S induce oxidative stress, disrupt daily sperm production, and damage DNA in rat spermatozoa: a comparative in vitro and in vivo study. *Toxicol Ind Health*. 2019 Apr 1;35(4):294–303.
218. Xin F, Jiang L, Liu X, Geng C, Wang W, Zhong L, et al. Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014 Jul 15;769:29–33.
219. Ruberto S, Santovito A, Simula ER, Noli M, Manca MA, Sechi LA. Bisphenols induce human genomic damage and modulate HERVs/env expression. *Environ Mol Mutagen*. 2022;63(6).
220. Fic A, Žegura B, Sollner Dolenc M, Filipič M, Peterlin Mašič L. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2013 Jun 1;64(2):189–200.

221. Mokra K, Kuźmińska-Surowaniec A, Woźniak K, Michałowicz J. Evaluation of DNA-damaging potential of bisphenol A and its selected analogs in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem Toxicol.* 2017 Feb 1;100:62–9.
222. Karzi V, Ozcagli E, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Fragkiadoulaki I, Kalliantasi A, et al. DNA Damage Estimation after Chronic and Combined Exposure to Endocrine Disruptors: An In Vivo Real-Life Risk Simulation Approach. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 1;24(12).

11. ANEXOS

11.1 ANEXO 1. Hoja informativa para participar en el estudio.

HOJA DE INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO TITULADO:

Efectos del Bisfenol A en marcadores de pronóstico y senescencia en pacientes con enfermedad renal crónica.

La insuficiencia renal crónica es una enfermedad que se caracteriza por tener una gran comorbilidad asociada. Los pacientes afectados de dicha patología en fase de tratamiento sustitutivo con hemodiálisis se caracterizan por presentar una mayor incidencia de patología tumoral y cardiovascular, así como envejecimiento prematuro cuando se les compara con una población sana equivalente en cuanto a edad y sexo. El objetivo de este estudio es profundizar en los mecanismos que intervienen en el desarrollo exagerado de dichas patologías.

Para este estudio necesitamos su colaboración de la siguiente forma:

Si usted es uno de los pacientes en hemodiálisis incluidos en el estudio, se solicita su consentimiento informado para poder comparar la técnica de diálisis habitual realizada con dos modelos de filtros distintos durante 6 meses. Los dos filtros son ampliamente utilizados de forma generalizada y no constituyen ningún riesgo para su salud. Precisamos de 2 extracciones analíticas (pre y post diálisis) separadas 6 meses entre sí en las que le extraeremos 10-15 ml de sangre extra para realizar estudios genéticos y de algunos biomarcadores de su enfermedad.

Durante el desarrollo de dicho estudio, el investigador principal y los colaboradores que deban trabajar con la información personal, trabajarán en la más estricta confidencialidad.

Sus datos serán recogidos y tratados de forma disociada de acuerdo a lo que establece la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal, y serán usados exclusivamente para los fines de este estudio que se han descrito en el presente documento de información. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador principal del ensayo, Dra. Elisabet Coll Pera (Fundació Puigvert, Servicio de Nefrología, c/ Cartagena 340-350, 08025 Barcelona. Teléfono de contacto: 934169700).

El acceso a su información personal quedará restringido al investigador, personal autorizado y a las Autoridades Sanitarias, todos ellos sujetos al deber de confidencialidad.

En el caso de que sus datos se transfieran a otros países, esto se hará de forma disociada y el investigador garantizará la aplicación de todas las medidas necesarias para la protección de dicha información de acuerdo con lo establecido en la Legislación Española.

11.2 ANEXO 2. Consentimiento informado para la participación en el estudio.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

Efectos del Bisphenol A en marcadores de pronóstico y senescencia en pacientes con enfermedad renal crónica.

Yo,

.....

DNI.....

Declaro:

- Haber leído éste documento de información y haber sido informado correctamente.
- Comprendo que mi participación en este estudio es voluntaria.
- Comprendo que puedo no aceptar mi participación en este estudio: Sin tener que dar explicaciones.
Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
Presto libremente mi conformidad para colaborar en el estudio.

Firma del/ de la participante

Información proporcionada por el/la

Dr.Dra.....

Nº.....

Firma del investigador

Barcelona, adede.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS GENÉTICAS EN SANGRE

Título del proyecto:

Efectos del Bisphenol A en marcadores de pronóstico y senescencia en pacientes con enfermedad renal crónica.

Responsable del proyecto: Dra Elisabet Coll

Médico que
informa _____

Nombre _____

Paciente: _____

COMPRENDO que la decisión de participar en este proyecto es completamente voluntaria y que soy libre de participar en el mismo

DECLARO bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información para la realización de este estudio y he comprendido su significado. Me han explicado las características y objetivos del estudio y los posibles riesgos y beneficios esperados. He sido informado suficientemente y estoy de acuerdo en el tipo de estudio genético en el que voy a participar.

CONSIENTO que la Fundació Puigvert pueda utilizar estas muestras para el estudio genético de mi enfermedad, en el propio Hospital y/o en otros centros designados por éste, siempre de acuerdo con las normas éticas vigentes:

SÍ NO

CONSIENTO que la Fundació Puigvert pueda conservar y utilizar la muestra sobrante para posibles investigaciones futuras sobre mi enfermedad:

SÍ NO

DESEO ser informado de los resultados obtenidos en caso de que los hallazgos tengan una implicación para mi salud:

SÍ NO

COMPRENDO que soy libre de retirar mi consentimiento a la Fundació Puigvert para conservar y utilizar mis muestras con fines de investigación cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Barcelona, a _____ de _____ de _____

Firma del participante

Firma del médico que informa

Este consentimiento se formula de acuerdo con lo establecido en la LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica, publicada en el BOE nº 159, del 4 de julio de 2007

11.3 ANEXO 3. Ficha técnica dializador VitaPES LF (Palex Medical).

VitaPES®

Dialysator/ Dialyzer VitaPES® LF PLUS

MTP Medical Technologies GmbH
 Kunstseidenstraße 4, 01796 Pirna, Germany
 Phone + 49 3501 465 910, Fax + 49 3501 520 066
 info@mtp-pirna.de, www.mtp-pirna.de

	VitaPES® LF 18 ^{90/120}	VitaPES® LF 19 ^{90/120}	VitaPES® LF 20 ^{90/120}	VitaPES® LF 22 ^{90/120}
In vitro performance				
Ultrafiltrationskoeffizient (ml/h/mmHg) Ultrafiltration coefficient (ml/h/mmHg)	16	19	21	23
Clearance: Q_b 200 ml/min				
Harnstoff/ Urea	192	194	195	197
Kreatinin/ Creatinine	182	187	189	190
Phosphat/ Phosphate	164	170	173	181
Vitamin B ₁₂ / Vitamin B ₁₂	105	113	119	125
Clearance: Q_b 300 ml/min				
Harnstoff/ Urea	258	264	266	273
Kreatinin/ Creatinine	231	244	248	253
Phosphat/ Phosphate	202	210	218	234
Vitamin B ₁₂ / Vitamin B ₁₂	119	129	136	144
Clearance: Q_b 400 ml/min				
Harnstoff/ Urea	298	306	309	321
Kreatinin/ Creatinine	260	278	284	290
Phosphat/ Phosphate	223	235	244	267
Vitamin B ₁₂ / Vitamin B ₁₂	126	138	145	154
Massentransferkoeffizient/ Mass transfer coefficient				
KoA (Harnstoff/ urea) *	930	1027	1064	1214
Technische Angaben/ Technical information				
Membranfläche (m ²) Membrane Surface Area (m ²)	1,5	1,7	1,9	2,1
Wandstärke/ Innendurchmesser (µm) Wall thickness / Internal diameter (µm)	35/200			
Füllvolumen (ml)/ Priming volume (ml)	85	95	109	119
Membran/ Membrane	PUREMA® Polyethersulfone			
Gehäusematerial/ Vergussmaterial Housing material/ Potting compound	Polycarbonate/ Polyurethane			
Sterilisation/ Sterilization	Electron Beam			
St. pro Karton/ Palette Units per box/ pallet	30/960			
Art.-Nr./ Art.-No. REF	70115818	70115919	70115820	70115822
Best.-Nr./ Order No.	7818	7819	7820	7822

In-vitro Leistungsdaten entspr. EN ISO 8637 (UF- Koeffizient: Humanblut,
 Clearance: Q_b=500 ml/min, Q_d=0)
 In vitro performance according to EN ISO 8637 (UF coefficient: human blood,
 Clearance: Q_b=500 ml/min, Q_d=0)
 PUREMA® is a trademark of Membrana GmbH, Wuppertal, Germany.
 *KoA berechnet aus Clearance bei Q_d=300 ml/min, Q_b=500 ml/min
 *KoA calculated from clearance at Q_d=300 ml/min, Q_b=500 ml/min



3DS15000/1



11.4 ANEXO 4. Ficha técnica dializador ELISIO- M (NIPPRO Medical)

ELISIO™-M SERIES

MEDIUM FLUX

PERFORMANCE

Clearance (ml/min) ⁵	Qb/ Qd (ml/min)	11M	13M	15M	17M	19M	21M
Urea	200/500	187	190	193	194	195	197
	300/500	240	249	257	265	268	274
	400/500	275	288	300	311	321	331
	400/800	306	320	331	347	352	362
	500/800	331	351	367	383	394	406
Creatinine	200/500	178	184	188	192	193	195
	300/500	221	234	239	248	253	260
	400/500	246	264	272	288	299	305
	400/800	270	290	303	317	328	339
	500/800	300	322	331	349	361	379
Phosphate	200/500	151	159	167	174	177	181
	300/500	173	189	200	213	221	228
	400/500	188	204	217	232	242	252
	400/800	215	232	251	270	284	297
	500/800	227	251	264	286	296	314
Vitamin B12	200/500	95	105	114	124	127	135
	300/500	103	114	126	136	143	156
	400/500	108	122	136	146	157	165
	400/800	112	126	146	157	168	182
	500/800	122	137	155	167	176	191

Ultrafiltration Coefficient

KUF (ml/hr/mmHg) ⁶	15	17	20	22	25	27
-------------------------------	----	----	----	----	----	----

Sieving Coefficient⁷

Vitamin B12	0.880
Inulin	0.440
Myoglobin	< 0.01
Albumin	< 0.01

SPECIFICATIONS

Effective surface area (m ²)	1.1	1.3	1.5	1.7	1.9	2.1
Priming volume (ml)	68	80	91	108	115	128
Effective length (mm)	228	245	259	271	281	290
Inner Diameter (µm)	200	200	200	200	200	200
Membrane thickness (µm)	40	40	40	40	40	40
Maximum TMP (mmHg)	500	500	500	500	500	500
Material	Membrane	Polynephron™				
	Housing and Header	Polypropylene				
	Potting compound	Polyurethane				
Sterilization method	Dry gamma					
Package	24 pcs/box					