



Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

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. 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.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

Vanessa Sánchez Martos

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu i la inflamació en una població sana

Tesi doctoral

Dirigida per:

Dra. Montserrat Giralt Batista

Dra. Marta Romeu Ferran

Departament Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus, 2017

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FEM CONSTAR que aquest treball, titulat "Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors d'estrès oxidatiu i inflamació en una població sana", que presenta VANESSA SÁNCHEZ MARTOS per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat.

Reus, 22 de Maig de 2017

El/s director/s de la tesi doctoral

Montserrat Giralt Batista

Marta Romeu Ferran

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

Autorització del director/s/a/es de la tesi doctoral



DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL

Títol de la tesi:

Doctorand/a:

Programa de Doctorat:

Departament:

Grup de recerca:

Director/a/s/es:

Correu electrònic director:

Detalls de confidencialitat de la tesi

Si / No

-Existeix un conveni de confidencialitat amb empreses?	<input type="radio"/> <input checked="" type="radio"/>
-Part de la tesi o la totalitat de la tesi és confidencial?	<input type="radio"/> <input checked="" type="radio"/>

INFORME DEL DIRECTOR/A DE TESI

El director/s sotasignats emeten l'informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit, en base a la revisió dels següents elements de qualitat:

	Si / No
La tesi consisteix en un treball original de recerca	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/>
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/>
Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/>
La metodologia està descrita	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/>
Hi consta el procediment	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/>
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/>
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/>
La bibliografia està ben reflectida	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/>

D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques:

Article científic:

"Analytical quality measurements of new cardiovascular disease risk related biomarkers in healthy humans"
EN PROCÉS D'ELABORACIÓ

Pòster:

ACTIVIDAD FÍSICA Y SALUD

Vanessa Sánchez¹, Marta Romeu¹, Laura Llull¹, Rosa Maria Valls², Rosa Solà², Montserrat Giralt¹.

¹Unidad de Farmacología. Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad Rovira i Virgili.

²Unidad de Lípidos y Aterosclerosis. Departamento de Medicina y Cirugía, Universidad Rovira i Virgili.

Presentat al V congrés de la Sociedad Española de Dietistas Nutricionistas. Valladolid, 2011

Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi:

Els resultats d'aquesta tesi doctoral s'han aplicat a la metodologia dels següents articles científics en els quals la doctoranda figura com a autora:

Aranda N et al. Environ Res. 2017;156:644-651.

Romeu M et al. J Agric Food Chem. 2016;64(9):1879-88.

Méndez L et al. J Nutr Biochem. 2014;25(12):1243-53.

Molinar-Tortibio E et al. PLoS One. 2014;9(8):e104637.

Llull L et al. Lipids Health Dis. 2013;12:140.

Llull L et al. Food Chem Toxicol. 2011;49(6):1450-4.

Articles previs a la tesi on la doctoranda és autora:

Romeu M et al. BMC Res Notes. 2010;25:3:20.

Nogués MR et al. J Pineal Res. 2006;41(2):142-9.

I en conclusió, s'emet l'informe FAVORABLE pel tràmit de dipòsit de la tesi doctoral i posterior defensa pública:

Reus

31/05/2017

Director/a de la tesi:


Montserrat Giralt

Director/a de la tesi (si s'escau):

Marta Romeu

Director/a de la tesi (si s'escau):

CPISR-1 C
Montserrat
Giralt Batista
Firmado digitalmente por
CPISR-1 C
Montserrat Giralt
Batista
Fecha: 2017.06.01
09:44:46 +02'00'


CPISR-1 C Marta
Romeu Ferran
2017.05.31
15:26:21
+02'00'

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

A Sergio, Álex y Eloi

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

Agraïments

Vull agrair a totes les persones que m'han donat suport des que vaig arribar a la Facultat de Medicina i durant l'elaboració de la Tesi Doctoral:

Al Dr. Mallol, la Dra. Giralt, la Dra. Nogués i el Dr. Sureda l'oportunitat d'entrar al grup sent una alumna en pràctiques, des d'aquell moment es van forjar les meves ganes de fer ciència. Amb vosaltres he madurat i he après molt de la vida. Gràcies.

Montse, Marta, gràcies per donar-me suport i haver dirigit aquest treball. Marta, de tot cor, gràcies per l'esforç final, per la empenta i pels ànims.

Gràcies també a la Dra. Rosa Solà i al seu equip de la URLA, sense elles no hagués estat possible.

Gràcies a les millors "compis" de laboratori, Laura, Mónica i Nuri, per les *mojito's parties*, pels cafès, per ser amigues i confidents.

Anabel, gràcies pel teu suport i per la paciència que tens sempre per escoltar-me.

A la Silvia O., Montse P., Imma, Nuria P., Amparo, Jose Luís i Joan, a la resta del personal de la FMCS, gràcies a tots per les converses de passadís i rialles.

A l'Alba T., sempre al meu costat, animant-me, preguntant-me, interessant-se pel que faig. Vull ser velleta i seguir anant de passejades amb tu.

A Esther y Kiko, mi otra "familia", gracias por todos y cada uno de los buenos momentos vividos, pero sobretodo, gracias por estar ahí siempre.

A mis padres, que a pesar de no entender del todo lo que hago, lo valoran y aprecian dándome siempre su total apoyo. Soy lo que soy y soy como soy gracias a vosotros. No os cambiaría por nada del mundo. Os quiero.

A mi hermana, gracias por escucharme y animarme siempre.

A mis hermanos y cuñadas, gracias por los buenos momentos y por los mejores regalos que me podríais haber dado nunca, mis sobrinos, Jana, Leo y la pequeña Claudia. Su cariño es tierno e infinito y da luz a mis días.

A mi familia política, Eugenio, Ángeles, Tania y María. Gracias por esos ratos de descanso en los que las neuronas ya no podían más. Ángeles, sobretodo agradecerte a ti el papel que has desarrollado éstos últimos meses, sin tu ayuda, esto no habría sido posible. Gracias, gracias, gracias.

Pero por encima de todo quiero agradecer a mi pequeña familia la paciencia que han tenido conmigo. Sergio, gracias por tu saber estar, tu confianza y por animarme a seguir adelante cuando las fuerzas flaqueaban. Álex y Eloi, mis dos pequeños e inocentes tesoros, no sabéis lo que significa aun todo esto, a vosotros pediros perdón por haberos robado tanto tiempo, tantas tardes sin mamá. Vosotros que habéis vivido más que nadie mis nervios, mi estrés, deciros que gracias a vuestra inocencia, a vuestros besos y sonrisas, he podido seguir a delante. Vuestros gestos diminutos y aparentemente insignificantes causan en mi emociones gigantescas y sobretodo, me enseñáis a quedarme con las cosas buenas de la vida. Os amo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

ÍNDEX

	Pàgina
Fem constar	I
Autorització dels directors de la tesi doctoral	III
Dedicatòria	V
Agraïments	VII
Índex	XI
Índex de Taules	XVII
Índex de Figures	XIX
Abreviatures	XXI
Resum	XXVII
INTRODUCCIÓ	1
1. BIOMARCADORS	3
1.1.-Concepte	3
1.2.-Característiques dels biomarcadors	3
1.3.-Biomarcadors: tipus	5
1.4.-Validació analítica d'un biomarcador	8
1.4.1.-El procés analític	8
1.4.1.1.-Fases del procés analític	9
1.4.2.-Biomarcadors <i>Gold Standard</i>	10
2. EL CONTROL DE LA QUALITAT ANALÍTICA AL LABORATORI	11
2.1.-Introducció a la qualitat	11
2.2.-EL control de la qualitat durant el procés analític	12
2.2.1.-Tipus d'errors al laboratori	12
2.3.-Paràmetres estadístics indicadors de qualitat analítica	15
2.3.1.-Els valors de referència	15
2.3.2.-La distribució de les dades	16
2.3.2.1.-La normalitat	16
2.3.2.1.1.-Tests de normalitat	17
2.3.2.1.2.-La asimetria	18
2.3.2.1.3.-La curtosi	19
2.3.3.-La precisió	21
2.3.3.1.-Mesures de tendència central	22

2.3.3.2.-Mesures de dispersió	23
2.3.4.-L'exactitud	24
2.3.5.-Especificacions de la qualitat: Grau de qualitat analítica	27
2.3.5.1.-Graus de Qualitat (GQ)	27
2.3.5.2.-El coeficient de variabilitat relatiu (CVR)	27
3.EL DANY OXIDATIU I LA INFLAMACIÓ	30
3.1.-El dany oxidatiu	30
3.2.-Biomarcadors del dany oxidatiu	33
3.2.1.-Biomarcadors del sistema de defensa antioxidant	35
3.2.2.- Biomarcadors de les conseqüències del dany oxidatiu	38
3.2.2.1.-Biomarcadors del dany oxidatiu a lípids	38
3.2.2.2.-Biomarcadors del dany oxidatiu a proteïnes	40
3.2.2.3.-Biomarcadors del dany oxidatiu a l'ADN	42
3.2.2.4.- Biomarcadors de la capacitat antioxidant	43
3.2.- La inflamació	44
3.2.1.- Biomarcadors de la inflamació	45
3.2.2.- Biomarcadors de la disfunció endotelial	46
3.2.3.- Biomarcadors de l'activitat trombòtica	48
3.3.- El perfil fèrric	49
3.3.1.- El ferro i el seu paper sobre l'oxidació i la inflamació	49
3.3.2.- Biomarcadors del perfil fèrric	50
HIPÒTESI I OBJECTIUS	51
HIPÒTESI I OBJECTIUS	53
MATERIAL I MÈTODES	55
1.FASE PREANALÍTICA	57
1.1.-Disseny de l'estudi	57
1.2.-Ètica	57
1.3.-Selecció de participants	57
1.4.-Processament i conservació de les mostres	60
1.5.-Estandardització de metodologies: elaboració dels procediments normalitzats de treball (PNTs)	65
1.6.-Control d'equipament	66
2.FASE ANALÍTICA	68
2.1.-Biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu	68

2.1.1.-Mesura dels sistemes de defensa antioxidant enzimàtics (CAT, SOD, GPx) i no enzimàtics (sistema glutatió i Vitamina C)	68
2.1.1.1.-Catalasa (CAT)	68
2.1.1.2.-Superòxid dismutasa (SOD)	69
2.1.1.3.-Glutatió peroxidasa (GPx)	72
2.1.1.4.-Sistema glutatió: Glutatió reduït (GSH) i glutatió oxidat (GSSG)	73
2.1.1.5.-Vitamina C	74
2.1.2.-Mesura de les conseqüències de l'estrès oxidatiu	75
2.1.2.1.-Dany oxidatiu a lípids	75
2.1.2.1.1.-Mesura de les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS)	75
2.1.2.1.2.-8-isoprostà	76
2.1.2.1.3.-LDL oxidada	77
2.1.2.2.-Dany oxidatiu a proteïnes	77
2.1.2.2.1.-Carbonilació de proteïnes (DP)	77
2.1.2.3.-Dany oxidatiu al DNA	79
2.1.2.3.1. 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)	79
2.1.1.4.-Mesura de la capacitat antioxidant del plasma	81
2.1.1.4.1.-ORAC i ORAC _{TCA}	81
2.1.1.4.2.-Capacitat plasmàtica per reduir el ferro (FRAP)	82
2.1.2.-Biomarcadors relacionats amb la inflamació	83
2.1.2.1.-Biomarcadors del perfil lipídic	83
2.1.2.1.1.-Colesterol total	83
2.1.2.1.2.-Triglicèrids	86
2.1.2.1.3.-Colesterol HDL	86
2.1.2.2.-Apolipoproteïna A-1 (ApoA1)	87
2.1.2.3.-Apolipoproteïna B (ApoB)	88
2.1.2.4.-Proteïna C-reactiva d'alta sensibilitat (hsPCR)	88
2.1.2.5.-Interleucina-6 (IL-6)	89
2.1.2.6.-E-selectina	89
2.1.2.7.-sICAM-1	90
2.1.2.8.-sVCAM-1	91
2.1.2.9.-PAI-1	92
2.1.3.-Biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric	93

2.1.3.1.-Ferro en sang	95
2.1.3.2.-Transferrina	95
2.1.3.3.-Ferritina	96
2.1.4.-Estudi del perfil lipídic mitjançant ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-1H)	97
2.1.4.1.-Preparació de les mostres	99
2.1.4.1.1.-Obtenció de l'extracte lipídic per la mesura del perfil lipídic	99
2.1.4.2.-Ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-1H)	99
2.1.4.3.-Identificació i quantificació de metabòlits	100
3.FASE POSTANALÍTICA	102
3.1.-Caracterització analítica de les variables	102
3.1.1.-Mesures de centralitat i de forma	102
3.1.1.1.-La distribució normal	102
3.1.1.2.-La asimetria	102
3.1.1.3.-La curtosi (k)	103
3.1.2.-Mesures de dispersió	104
3.1.2.1.-La desviació estàndard (DE)	104
3.1.2.2.-El rang interquartil	105
3.1.2.3.-L'antilogaritme de la desviació estàndard	105
3.1.3.-El coeficient de variabilitat com a mesura de precisió	106
3.1.4.-Diferències entre grup d'edat i sexe	107
3.1.5.-Límits o intervals de confiança	108
3.2.-Valoració del grau de qualitat analítica	108
3.2.1.-El coeficient de variabilitat relatiu (CVR)	108
3.2.2.-Els graus de qualitat	110
3.2.1.-L'error aleatori (EA)	113
3.2.2.-L'error sistemàtic (ES)	113
3.2.3.-L'error total analític (ETa)	114
RESULTATS I DISCUSSIÓ	117
1.FASE PREANALÍTICA	119
1.1.-Selecció de participants	119
1.2.-Característiques dels participants: voluntaris sans	120

2.-FASE POSTANALÍTICA: TRACTAMENT DE DADES	130
2.1.-Caracterització dels biomarcadors	130
2.1.1.-La distribució dels biomarcadors	130
2.1.1.1.-Test de normalitat, asimetria i curtosi dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu	130
2.1.1.2.-Test de normalitat, asimetria i curtosi dels biomarcadors relacionats amb la inflamació	133
2.1.1.3.-Test de normalitat, asimetria i curtosi dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric	135
2.1.1.4.-Test de normalitat, asimetria i curtosi dels biomarcadors analitzats per RMN-1H	136
2.1.2.-La precisió dels biomarcadors	138
2.1.2.1.-La dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu	139
2.1.2.2.-La dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb la inflamació	145
2.1.2.3.-La dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric	148
2.1.2.4.-La dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors analitzats per RMN-1H	150
2.2.-El control de la qualitat	155
2.2.1.-El control de la qualitat mitjançant el càlcul del coeficient de variabilitat relatiu (CVR)	155
2.2.1.1.-El CVR dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu	156
2.2.1.2.-El CVR dels biomarcadors relacionats amb la inflamació	160
2.2.1.3.-El CVR dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric	163
2.2.1.4.-El CVR dels biomarcadors analitzats per RMN-1H	166
2.2.2.-El control de la qualitat mitjançant els graus de qualitat	170
3.DISCUSSIÓ	175

4.LIMITACIONS DE L'ESTUDI	194
----------------------------------	------------

CONCLUSIONS	195
--------------------	------------

CONCLUSIONS	197
--------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	199
---------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	201
---------------------	------------

ÍNDEX DE TAULES

	Pàgina
Taula 1. Espècies reactives de l'oxigen (ERO) i sistemes de defensa antioxidant	31
Taula 2. Criteris d'inclusió i exclusió	60
Taula 3. Característiques tècnic-analítiques dels biomarcadors analitzats relacionats amb l'estrès oxidatiu	71
Taula 4. Característiques tècnic-analítiques dels biomarcadors analitzats relacionats amb la inflamació	85
Taula 5. Característiques tècnic-analítiques dels biomarcadors analitzats relacionats amb el perfil fèrric	94
Taula 6. Característiques tècnic-analítiques dels biomarcadors analitzats per ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-1H)	98
Taula 7. Criteris de classificació dels biomarcadors en funció del %CVR	110
Taula 8. Classificació dels diferents graus de qualitat analítica, en funció dels errors analítics	112
Taula 9. Característiques antropomètriques de la població estudiada	123
Taula 10. Bioquímica bàsica dels participants	127
Taula 11. Grau d'activitat física de la població estudiada	129
Taula 12. Distribució dels biomarcadors a relacionats amb l'estrès oxidatiu	132
Taula 13. Distribució dels biomarcadors a relacionats amb la inflamació	134
Taula 14. Distribució dels biomarcadors a relacionats amb el perfil fèrric	135
Taula 15. Distribució dels biomarcadors analitzats amb RMN-1H	137
Taula 16. Valors de la dispersió, repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu	142
Taula 17. Valors de la dispersió i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb la inflamació	146

Taula 18. Valors de la dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric	149
Taula 19. Valors de la dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors analitzats amb RMN-1H	152
Taula 20. Correlacions del perfil lipídic analitzat mitjançant tècniques de rutina i RMN-1H	154
Taula 21. Classificació dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu segons el % CVR amb un nivell menys estricte d' excel·lència qualitativa	157
Taula 22. Classificació dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu segons el % CVR amb un nivell més estricte d'excel·lència qualitativa	158
Taula 23. Classificació dels biomarcadors relacionats amb la inflamació segons el % CVR amb un nivell menys estricte d' excel·lència qualitativa	160
Taula 24. Classificació dels biomarcadors relacionats amb la inflamació segons el %CVR amb un nivell més estricte d'excel·lència qualitativa	161
Taula 25. Classificació dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric segons el %CVR amb un nivell menys estricte d' excel·lència qualitativa	163
Taula 26. Classificació dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric segons el %CVR amb un nivell més estricte d' excel·lència qualitativa	164
Taula 27. Classificació dels biomarcadors analitzats per RMN-1H segons el % CVR amb un nivell menys estricte d'excel·lència qualitativa	166
Taula 28. Classificació dels biomarcadors analitzats per RMN-1H segons el % CVR amb un nivell més estricte d'excel·lència qualitativa	157
Taula 29. Classificació dels biomarcadors segons els graus de qualitat	170

ÍNDEX DE FIGURES

	Pàgina
Figura 1. Classificació dels biomarcadors segons evolució de la malaltia.	6
Figura 2. Resum de les característiques que han de complir els biomarcadors en funció del seu propòsit	7
Figura 3. Esquema representatiu de les fases del procés analític.	9
Figura 4. Esquema representatiu de les fases del procés analític i dels possibles errors que es poden cometre durant cada fase del procés.	13
Figura 4. Esquema representatiu de les diferents tècniques més emprades en la determinació del dany oxidatiu.	25
Figura 5. Representació gràfica d'una distribució de dades normal.	17
Figura 6. Esquema representatiu de la tendència positiva o negativa de la simetria, en funció de les dades.	19
Figura 7. Dibuix representatiu de les diferents formes de curtosis, en funció de la concentració de les dades.	20
Figura 8. Diagrama esquemàtic que il·lustra la relació entre la precisió estimada sota diferents condicions de mesura	24
Figura 9. Representació de la precisió i la exactitud d'una anàlisi.	26
Figura 10. Resum de les patologies relacionades amb el dany oxidatiu.	33
Figura 11. Esquema representatiu dels diferents biomarcadors més emprats en la determinació del dany oxidatiu	35
Figura 12. Esquema representatiu del processament dels tubs de sang i orina per les posterior determinacions.	62
Figura 13. Esquema representatiu de les alíquotes realitzades i els pretractaments necessaris per les posteriors determinacions.	64
Figura 14. Diagrama d'elecció de participants.	120
Figura 15. Biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu que presenten diferències significatives entre sexe.	143
Figura 16. Biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu que presenten diferències significatives entre grup d'edat.	144

Figura 17. Biomarcadors relacionats amb la inflamació que presenten diferències entre sexe.	147
Figura 18. Biomarcadors relacionats amb la inflamació que presenten diferències entre grup d'edat.	114
Figura 19. Biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric que presenten diferències entre sexe.	149
Figura 20. Biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric que presenten diferències entre grup d'edat.	150
Figura 21. Biomarcadors analitzats per RMN-1H que presenten diferències significatives entre sexe.	153
Figura 22. Biomarcadors analitzats per RMN-1H que presenten diferències significatives entre grup d'edat.	153
Figura 23. Freqüència de biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu en funció del CVR més o menys estricte.	153
Figura 24. Freqüència de biomarcadors relacionats amb la inflamació en funció del CVR més o menys estricte	153
Figura 25. Freqüència de biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric en funció del CVR més o menys estricte.	153
Figura 26. Freqüència de biomarcadors analitzats per RMN-1H en funció del CVR més o menys estricte	153
Figura 27. Correlació entre el CVR i l'ETa de tots els biomarcadors analitzats.	153
Figura 28. Correlació entre el CVR i l'ETa dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu.	153
Figura 29. Correlació entre el CVR i l'ETa dels biomarcadors relacionats amb la inflamació.	153
Figura 30. Correlació entre el CVR i l'ETa dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric	153
Figura 31. Correlació entre el CVR i l'ETa dels biomarcadors analitzats per RMN-1H.	153
Figura 32. Freqüència de biomarcadors en funció del CVR més o menys estricte	190

ABREVIATURES

A

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropà) dihidroclorur
AchE	acetilcolinesterasa
ADN	Àcid deoxiribonucleic
ApoA1	Apolipoproteïna A1
ApoB	Apolipoproteïna B

B

BHT	2,6-di-tert-butil-4-metilfenol
-----	--------------------------------

C

CAT	Catalasa
c-LDL	Colesterol- <i>Low Density Lipoprotein</i>
Colesterol HDL	Colesterol d'alta densitat
COS	Centre de Ciències Òmiques
CTNS	Centre Tecnològic de Nutrició i Salut
Cu	Coire
CVa	Coefficient de Variabilitat interindividual analític
CVi	Coefficient de Variabilitat intraindividual
CVR	Coefficient de Variabilitat Relatiu

D

DE	Desviació Estàndard
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina

E

E. ST	Error Estàndard
EA	Error Aleatori
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EFSA	Autoritat Europea de Seguretat Alimentaria
ELISA	<i>Enzim Linked Immuno Assay</i>
ER	Eritròcit

ERO	Espècies Reactives de l'Oxigen
ES	Error Sistemàtic
ETa	Error Total analític
F	
Fe	Ferro
FMCS	Facultat Medicina i Ciències de la Salut
FOX	Oxidació
FRAP	Fèrrica del Xilenol taronja Poder antioxidant del ferro
G	
GPx	Glutatió Peroxidasa
GPXe	Glutatió peroxidasa eritrocitària
GPXp	Glutatió peroxidasa plasmàtica
GQ	Graus de Qualitat segons el Model d'Estocolm
GR	Glutatió Reductasa
GSH	Glutatió reduït
GSHe	Glutatió reduït eritrocitari
GSHp	Glutatió reduït plasmàtic
GSSG	Glutatió oxidat
GSSGe	Glutatió oxidat eritrocitari
GSSGp	Glutatió oxidat plasmàtic
GST	Glutatió-S-Transferasa
H	
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
HCl	Clorur d'Hidrogen
He-Li	Heparina Liti
HMDB	Base de dades del Metaboloma Humà
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HOO [·]	Radical hidroperoxil
HPLC	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
hsPCR	Proteïna-C-Reactiva d'Alta Sensibilitat

HUSJ	Hospital Universitari Sant Joan de Reus
HVC	Hospital Universitari Verge de la Cinta de Tortosa
I	
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
IISPV	Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índex Massa Corporal
ISO	Organització Internacional de Normalització
IsoPs	Isoprostans
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K	
K	curtosi
K ₂ HPO ₄	Hidrogen fosfat de potassi
KCl	Clorur Potàssic
KH ₂ PO ₄	Dihidrogen fosfat de potassi
K-S	Kolmogorov-Smirnov
L	
L(R)O [·]	Radical alcoxil
L(R)OO	Radical perxil
L(R)OOH	Radical hidroperòxid
LDL	Lipoproteïna de baixa Densitat
LDLox	Lipoproteïna de Baixa Densitat oxidada
M	
MDA	Malondialdehid
MeSH	<i>Medical Subject Heading</i>
MET	Equivalent de Taxa Metabòlica

Mn	Manganès
N	
Na ₂ CO ₃	Carbonat de Sodi
Na ₂ HPO ₄	Hidrogen Fosfat de Sodi
NaCl	Clorur Sòdic
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleòtid Fosfat
NaHCO ₃	Hidrogen carbonat de sodi
NEM	N-etil-maleïmida
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NO [·]	Radical òxid nítric
NO ₂ [·]	Radical diòxid de nitrogen
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
O	
O	Orina
O ₂ ^{·-}	Radical superòxid
[·] OCl	Radical hipoclorit
[·] OH	Radical hidroxil
OMS	Organització Mundial de la Salut
ONOO [·]	Radical peroxinitrit
OPT	O-ptalaldehid
ORAC	Capacitat antioxidant del plasma
ORAC _{TCA}	Capacitat antioxidant del plasma sense proteïnes
P	
P. cintura	Perímetre de la cintura
PAI-1	Inhibidor del Plasminògen 1
PBS	Solució Tampó de Fosfat
PCR	Proteïna-C-Reactiva
PCR	Proteïna-C-Reactiva
PL	Plasma
PNT	Procediment Normalitzats de Trellall

PNT-PG0709-FAR.OX-T00X	Procediment Normalitzat de Treball-Grup FARmacologia. divisió estrès Oxidatiu-Tècnica número X
PNTs	Procediments Normalitzats de Treball
R	
RLL	Radicals Lliures
RMN-1H	Ressonància Magnètica Nuclear de protó
S	
Se	Seleni
SE	Sèrum
SEQC	Societat Espanyola de Bioquímica Clínica i Patologia Molecular
sICAM-1	Molècula soluble d'adhesió Intercel·lular-1
sim	Asimetria
SOD	Superòxid Dismutasa
sVCAM-1	Molècula soluble d'adhesió vascular-1
T	
TBA	Àcid Tiobarbitúric
TBARS	Substàncies Reactives a l'Àcid Tiobarbitúric
t-BUOOH	Tert-Butil hidroperòxid
TCA	Àcid tricloracètic
TEAC	Capacitat antioxidant relativa al trolox
TG	Triglicèrids
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF- α	Factor de Necrosi Tumoral alfa
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TRAP	Quantitat de radicals totals atrapats
TRFN	Transferrina
U	

URLA	Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi
V	
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat
VSG	Velocitat de Sedimentació Globular
Z	
Zn	Zinc
ALTRES	
$^1\Delta\text{O}_2$	Oxigen singlet
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxi-guanosina

RESUM

Els biomarcadors són paràmetres biològics mesurables i quantificables, indicadors d'estat de salut i relacionats amb processos fisiopatològics.

Un biomarcador ha de ser metodològicament vàlid respecte del seu propòsit d'ús. Quan parlem de biomarcador no solament fem referència a la molècula en si, sinó que cal tenir en compte la metodologia emprada per a la seva quantificació. Una de les característiques analítiques que un biomarcador ha de complir és que presenti repetibilitat i reproductibilitat. La repetibilitat i la reproductibilitat són dos paràmetres indicadors de qualitat analítica, els quals es representen mitjançant la desviació estàndard i els coeficients de variació dels biomarcadors en unes condicions determinades. En el cas de la repetibilitat, que pot ser interindividual o intraindividual, es mesura la precisió en les mateixes condicions d'anàlisi (mateix operador, mateixos instruments), mentre que la reproductibilitat mesura la repetibilitat en condicions diferents (compara dos laboratoris: mateix mètode, diferents equips, diferent personal). No obstant això, existeixen altres mesures qualitatives per determinar el nivell de precisió que un laboratori arriba a tenir, com és el cas del coeficient de variabilitat relatiu o bé els graus de qualitat analítica a partir de la imprecisió, l'error estàndard i l'error total analític.

El dany oxidatiu és el dany biomolecular causat per l'atac de radicals lliures i altres espècies reactives de l'oxigen sobre els constituents dels organismes vius. El dany oxidatiu és considerat el major contribuent a l'envelliment, les malalties degeneratives com l'Alzheimer o el

Parkinson, el càncer, les malalties renals o les malalties cardiovasculars, entre d'altres.

Els organismes vius necessiten les espècies reactives de l'oxigen per diferents processos fisiològics com la senyalització cel·lular o la mort programada de les cèl·lules. Per tant, l'organisme requereix d'un sistema de defensa que controli la producció normal d'espècies reactives de l'oxigen. Aquest sistema de defensa s'encarrega de la prevenció del dany oxidatiu i està format pels sistemes antioxidants endògens o exògens.

El sistema de defensa antioxidant endogen està format pels enzims antioxidants, com la superòxid dismutasa, la catalasa o la glutatió peroxidasa; a més a més, està format per molècules denominades no enzimàtiques, com el sistema glutatió, la transferrina, la vitamina E o l'àcid ascòrbic, entre d'altres.

Atès que el dany oxidatiu es pot esdevenir tant per la sobreproducció d'espècies reactives de l'oxigen com per la davallada dels sistemes de defensa antioxidants, existeixen multitud de biomarcadors aptes per a la seva mesura. Aquests biomarcadors es poden mesurar de forma directa, a partir de la producció d'espècies reactives de l'oxigen, i de forma indirecta, a partir dels productes d'oxidació o dels sistemes de defensa antioxidants.

La inflamació és la resposta del sistema immunològic per reparar teixits vascularitzats malmesos. Aquesta pot ser aguda o crònica. La cronificació de la inflamació contribueix a l'aparició de l'artritis, l'arteriosclerosi, el càncer, la demència o la diabetis, entre d'altres.

En la inflamació es veuen involucrats multitud de mediadors químics, vies de senyalització i tipus cel·lulars que causen canvis estructurals i funcionals. Aquests canvis funcionals poden ser la disfunció endotelial, la migració de molècules d'adhesió vascular o l'activació de l'activitat antitrombòtica. De la mateixa manera que passa amb el dany oxidatiu, la multitud de processos que participen en la inflamació fa que no hi hagi un únic biomarcador per poder determinar-la.

Tenint en compte això, creiem que el coneixement del coeficient de variabilitat relatiu, l'error sistemàtic i l'error total analític de diferents biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, la inflamació i el perfil fèrric ens aportarà més informació de qualitat analítica que la desviació estàndard i el coeficient de variabilitat.

Per comprovar-ho, vam mesurar diferents biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu (la catalasa, la superòxid dismutasa, la glutatió peroxidasa, el sistema glutatió, la vitamina C, les espècies reactives a l'àcid tiobarbitúric, el 8-isoprostà, la LDL oxidada, la carbonilació de proteïnes, la 8-hidrixi-2-deoxiguanosina, la capacitat antioxidant del plasma i el poder reductor del ferro), la inflamació (el perfil lipídic, les apolipoproteïnes A 1 i B, la proteïna-C-reactiva, la interleucina-6, la e-selectina, les molècules d'adhesió vascular ICAM-1 i VCAM-1 i el PAI-1) i el perfil fèrric (el ferro sèric, la transferrina i la ferritina) en una població sana. A més a més, es va mesurar el perfil lipídic metabolòmic per mitjà de la ressonància magnètica nuclear de protó. De tots aquests biomarcadors, es van determinar els intervals de confiança, la

distribució de les dades, la desviació estàndard, el coeficient de variabilitat intraindividual i l'interindividual. El grau de qualitat es va establir a partir del coeficient de variabilitat relatiu, la imprecisió, l'error sistemàtic, l'error analític i l'error total analític.

Els biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu que presenten millor precisió són la catalasa, el glutatió reduït eritrocitari, les espècies reactives a l'àcid tiobarbitúric i el poder antioxidant del ferro. Dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, el colesterol total, l'apolipoproteïna A1, l'apolipoproteïna B i les molècules d'adhesió vascular ICAM-1 i VCAM-1 són els que presenten una millor precisió, mentre que la transferrina és el biomarcador del perfil fèrric que presenta una millor precisió.

El càlcul del coeficient de variabilitat relatiu a partir de la variabilitat intraindividual i interindividual, l'error sistemàtic i l'error total analític són millors indicadors de qualitat analítica que no la desviació estàndard i la imprecisió. Paral·lelament, el coeficient de variabilitat relatiu és un bon indicador de qualitat analítica per a un laboratori de recerca; l'establiment del grau de qualitat en funció de la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític és un sistema de control excessiu per a un laboratori de recerca.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

1. BIOMARCADORS

1.1. Concepte

El terme biomarcador va ser introduït a l'any 1989 pel *National Institutes of Health* (NIH) com a *Medical Subject Heading (MeSH) term*, i el definia com a paràmetre biològic mesurable i quantificable en sang, teixits o altres fluids corporals, indicador de salut i relacionat amb processos fisiopatològics (Vasan, 2006; Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Però, a la pràctica, atès la innovació tecnològica i que l'estudi dels biomarcadors i les seves metodologies analítiques ha guanyat valor científic i clínic (Lee, 2009) quan parlem de biomarcadors no només parlem de la biomolècula que és vol analitzar, sinó que també parlem de les metodologies i matrius que s'utilitzen per quantificar-los (Mayeux, 2004). En aquest sentit, en funció de la matriu a analitzar podem trobar biomarcadors moleculars, que són aquelles molècules analitzables químicament, biomarcadors de registre, que són aquelles dades obtingudes de la persona com l'electrocardiograma i biomarcadors d'imatge, els quals són imatges mesurables i quantificables, com per exemple una radiografia (Prescott, 2013).

1.2.- Característiques dels biomarcadors

Els biomarcadors poden indicar el nivell d'exposició a un factor ambiental, la resposta genètica a exposicions, la resposta a una teràpia, o poden indicar estadis clínics o subclínic d'una malaltia. Per tant els

biomarcadors poden tenir diferents propòsits d'ús, depenent del què i del perquè es volen mesurar.

En aquest sentit, el propòsit d'ús en recerca bàsica dels biomarcadors és principalment el de buscar nous biomarcadors que millorin el diagnòstic de les malalties, o bé, el d'identificar els mecanismes moleculars implicats en les malalties, el que permetria identificar dianes terapèutiques.

Els biomarcadors han de ser biològicament i metodològicament vàlids respecte al seu propòsit d'ús (Vasan, 2006). Que un biomarcador sigui biològicament vàlid vol dir que està relacionat amb el procés que indica i que es coneix la seva variabilitat dins la població diana. Mentre que, que un biomarcador sigui metodològicament vàlid, significa que el mètode analític emprat en la seva mesura aporta evidències objectives de que és compleixen els requisits particulars del procés analític per a la aplicació prevista (Asociación Española de Normalización y Certificación, 2000).

De manera general, aquestes evidències objectives o requisits particulars que els biomarcadors han de complir es poden classificar segons si es tracten de requisits generals o requisits tecnicoanalítics (Vasan, 2006).

D'entre els requisits generals trobem:

- Es específic del procés fisiològic.
- Està inclòs a l'avaluació clínica.
- Es acceptable pel pacient.
- La relació entre la variació del biomarcador i la variació de la malaltia és lineal.

- Es una molècula estable.
- Una mesura única es representativa.
- Es aplicable a homes, dones, grups d'edat diferents i ètnies diferents.
- Reproduïble en diferents estudis.

Mentre que dins els requisits tecnicoanalítics trobem:

- Està internacionalment estandarditzat.
- Té elevada sensibilitat.
- Té elevada especificitat.
- Es precís.
- Es exacte.
- Es reproduïble.
- El cost-efectivitat és raonable.

1.3.- Biomarcadors: tipus

Els biomarcadors es poden classificar seguint diferents criteris com són el propòsit d'ús del biomarcador o bé segons la matriu a analitzar.

En funció del propòsit d'ús trobem que de forma general els biomarcadors es poden classificar en dos tipus: els biomarcadors d'exposició i els biomarcadors d'efecte.

Els biomarcadors d'exposició estan formats per aquelles molècules que formen part de la malaltia i és correlacionen amb la seva clínica mentre que els biomarcadors d'efecte són les molècules que indiquen canvis en la funció biològica com a resposta a una intervenció (Vasan, 2006).

Introducció

En relació a la malaltia els biomarcadors es classifiquen en funció de l'evolució de la malaltia, de manera que s'estableixen cinc tipus de biomarcadors diferents (figura 1) (Mayeux, 2004).

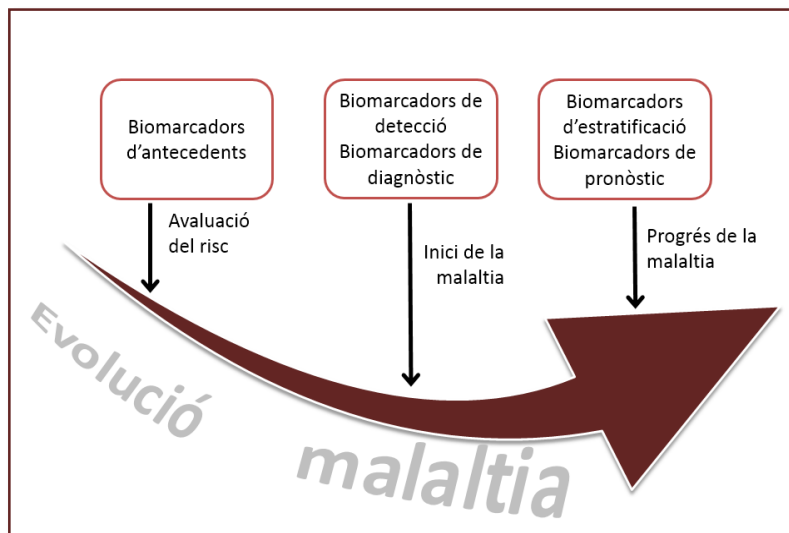


Figura 1. Classificació dels biomarcadors segons l'evolució de la malaltia. Adaptada de Mayeux, 2004.

Els biomarcadors d'antecedents són aquelles molècules que identifiquen el risc de desenvolupar la malaltia, dins aquest grup trobaríem els biomarcadors emprats en recerca.

Els biomarcadors de detecció són aquelles molècules que identifiquen malalties subjacents, mentre que els de diagnòstic són aquelles que identifiquen la malaltia primària.

Els biomarcadors d'estratificació són aquelles molècules amb les que s'estratifica la severitat de la malaltia un cop ha aparegut, i els de

pronòstic, els que donen informació sobre l'evolució de la malaltia o bé de l'eficàcia terapèutica.

Tenint en compte la relació dels biomarcadors amb l'evolució de la malaltia i, els requisits que un biomarcador ha de complir per a que sigui vàlid, trobem que en funció del propòsit del biomarcador els requisits que ha de complir poden variar (figura 2).

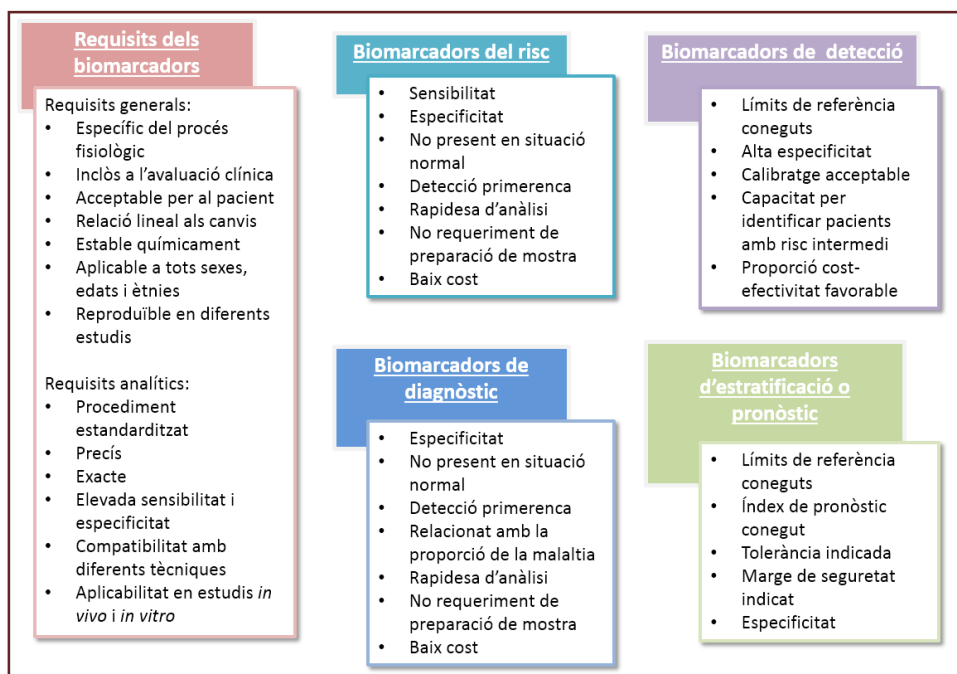


Figura 2. Resum de les característiques que han de complir els biomarcadors en funció del seu propòsit. Adaptada de (Vasan, 2006).

De manera que per als biomarcadors d'exposició del risc (risc i detecció) és més important que siguin sensibles, específics o de baix cost, mentre que per als biomarcadors d'efecte (diagnòstic i pronòstic) es primordial

que no estiguin present en situacions normals o que petits canvis de la malaltia siguin visibles al biomarcador.

1.4.- Validació analítica d'un biomarcador

A l'actualitat, atès el context d'expansió tecnològica podríem entendre que qualsevol molècula descoberta a l'organisme podria ser candidata a esdevenir un biomarcador d'algun procés fisiopatològic, però a la pràctica això no és així, ja que un biomarcador ha de ser validat per a ser utilitzat al laboratori.

1.4.1.- El procés analític

Parlem de procés **analític** quan fem referència al conjunt de mètodes i tècniques analítiques necessàries per obtenir coneixement de la composició, la identitat o la constitució de la mostra (part representativa dels biofluids constituents de l'organisme, ja sigui sang, orina, femta, esput, etc).

El **mètode analític** és el concepte que engloba totes les operacions implicades en l'anàlisi des de l'elecció del procediment analític fins la consecució del resultat final, mentre la **tècnica analítica** engloba el medi utilitzat per a dur a terme l'anàlisi, és a dir, les tasques necessàries per mesurar el biomarcador al laboratori.

La tècnica analítica és duta a terme per **l'operador o analista**, que és la persona encarregada de dur a terme l'anàlisi.

1.4.1.1.- Fases del procés analític

Un procés implica una seqüència de fases des de la definició del problema o la formulació de la hipòtesi, fins l'elaboració d'un informe i les seves conclusions. El procés analític és divideix en tres etapes (Plebani, 2009) (figura 3):

Fase preanalítica

Aquesta etapa és del conjunt processos que és realitzen abans de l'anàlisi. Aquesta etapa inclou la petició de l'anàlisi per part del metge/investigador, la selecció de participants, l'obtenció de les mostres i/o transport de les mateixes, el processament i/o pretractament de les mostres, i la conservació i/o emmagatzematge quan l'anàlisi no és immediat.

Fase analítica

Es la segona etapa del procés analític. En aquesta fase és contempen aquells processos propis de l'anàlisi al laboratori del biomarcador, com la preparació de protocols, la preparació de reactius o l'ús i control de l'equipament que és fa servir.

Fase postanalítica

Es la última etapa del procés analític. Aquesta fase inclou els càlculs necessaris, i, per tant, l'ús de programaris i/o eines informàtiques (programes d'estadística), per poder elaborar els informes clínics necessaris o bé per arribar a les conclusions d'un estudi de recerca. En aquesta fase també s'avalua la fiabilitat dels resultats obtinguts.

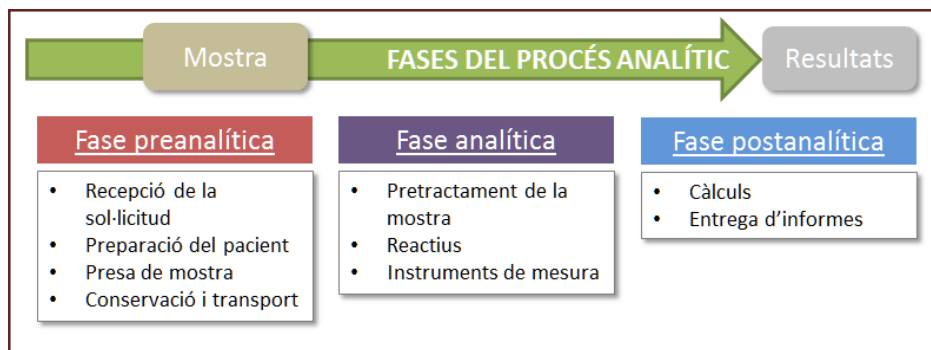


Figura 3. Esquema representatiu de les fases del procés analític

1.4.2.- Biomarcadors Gold Standard

El desenvolupament tecnològic que ha tingut lloc durant els últims 30 anys, està representant l'edat d'or en la cerca de biomarcadors, ja que proporciona multitud de noves tècniques analítiques per a mesurar una mateixa molècula i, paral·lelament, és descobrint noves molècules que podrien ser candidates a ser biomarcadors d'algun procés fisiopatològic (Ortega, 2010).

L'elecció d'una tècnica analítica o una altra per a la quantificació d'un biomarcador, depèn de molts factors. Com hem dit anteriorment, aquest elecció pot anar en funció del propòsit d'ús del biomarcador, o bé, per a la facilitat per quantificar-lo, la sensibilitat de la tècnica, el cost, la repetibilitat o reproductibilitat (Libby, Ridker, & Hansson, 2009).

Les tècniques ELISA són les més emprades per a la mesura dels biomarcadors quan la seva concentració és relativament elevada. No obstant, per mesurar biomarcadors en concentracions més baixes, l'espectrometria de masses és la millor opció (Christenson, 2012).

Donada aquesta variabilitat tecnològica, un laboratori ha d'assegurar que els resultats d'un biomarcador analitzat per diferents metodologies són equivalents. Aquesta equivalència s'aconsegueix a partir de la estandardització. El procés d'estandardització s'inicia amb l'obtenció d'un mètode de referència o *Gold Standard*, per tant, quan parlem de biomarcadors *Gold Standard* fem referència a la millor eina disponible per a mesurar un biomarcador (Claassen, 2005).

2.- EL CONTROL DE LA QUALITAT ANALÍTICA AL LABORATORI

2.1.- Introducció a la qualitat

Entenem per **qualitat** el grau en què un conjunt de característiques compleixen amb els requisits preestablerts (International Standard Organization, 2000).

L'assegurament de la qualitat en l'àmbit de recerca és una característica necessària ja que els laboratoris han de demostrar que els seus procediments analítics proporcionen resultats fiables i vàlids a la seva finalitat o propòsit (International Standard Organization, 2005).

Que uns resultats siguin **fiables** vol dir que el mètode emprat en l'anàlisi d'una mostra és capaç de detectar correctament la substància a analitzar de forma exacta i precisa, mentre que uns resultats siguin **vàlids** vol dir que el mètode analític emprat en la seva mesura aporta evidències objectives que és compleixen els requisits particulars del procés analític

per a l'aplicació prevista (International Standard Organization, 2005). Per tal d'aconseguir-ho, els laboratoris han de disposar de sistemes de control de qualitat.

El **control de la qualitat** és la part de la gestió del procés analític orientada al compliment dels requisits de la qualitat (International Standard Organization, 2000).

2.2.- EL control de la qualitat durant el procés analític

La mesura dels biomarcadors requereix que els mètodes analítics emprats siguin capaços de donar resultats precisos i reproduïbles.

Els errors al laboratori són difícilment identificables, i quan s'identifiquen, són difícilment compresos en comparació amb altres tipus d'errors. No obstant, existeixen diferents estudis que exploren quines són les principals fonts d'error durant els processos analítics i en quina fase del procés analític és produeixen (Plebani, 2009; Ashakiran, Sumati, 2011; Plebani, 2010; Coppens, 2010; Thammasitboon, 2013).

2.2.1.- Tipus d'errors al laboratori

Entenem per un **error de laboratori** aquell fracàs per no haver completat una acció planejada, tal i com és pretenia, o no haver aconseguit un objectiu pretès. Aquest és produeix en qualsevol part del cicle del laboratori, des de la prescripció de l'analítica fins a la informació dels resultats o la interpretació apropiada (Plebani, 2010).

El procés analític és la raó de ser dels laboratoris, per la qual mantenir el control sobre els resultats que donen és el seu objectiu principal.

Els errors analítics comunament tenen lloc durant la fase preanalítica, on la estandardització de protocols és mínima (Ashakiran, 2011; Plebani, 2010). L'automatització, la millora tecnològica als laboratoris, l'estandardització de metodologies, la definició dels controls de qualitat i la millor eficiència del personal han fet que en les últimes dècades, els errors de laboratori s'hagin reduït dràsticament. (Plebani, 2010).

Atès que el procés analític és divideix en tres fases, a la figura 4 podem trobar de forma resumida les principals fonts d'error durant el procés analític.

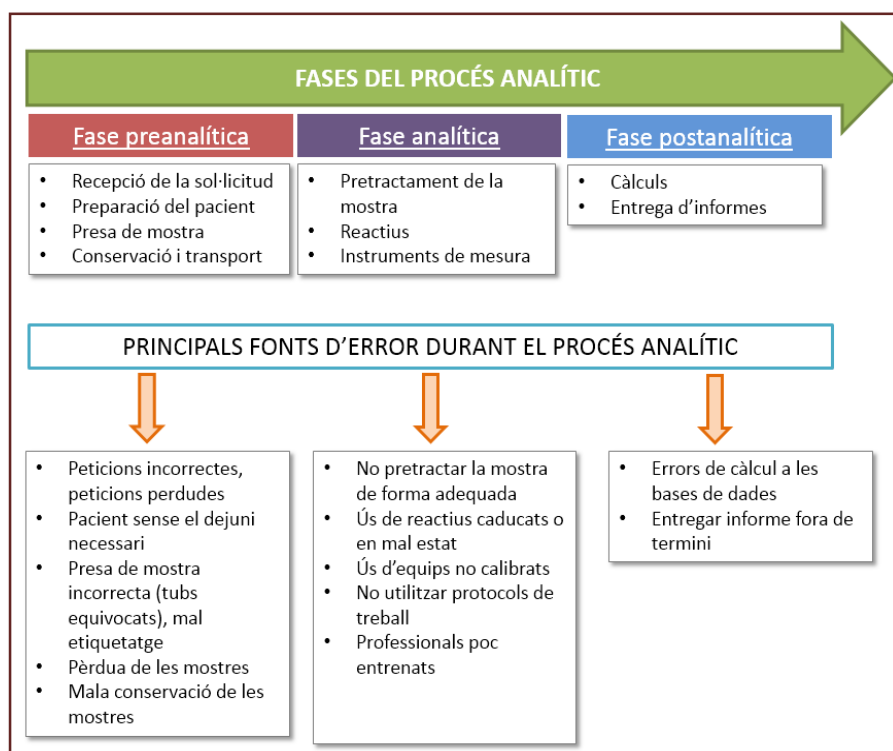


Figura 4. Esquema representatiu de les fases del procés analític i dels possibles errors que és poden cometre durant cada fase del procés. Adaptada de Plebani, 2009.

Durant la fase preanalítica, els errors més comuns que es poden trobar tenen lloc a partir de peticions incorrectes, mala o absent identificació de mostres, deficiències en l'obtenció de la mostra (mostra no suficient, mostres hemolitzades), o bé, mala conservació, manipulació (pipeteig erroni, errors en la centrifugació per disminució del temps o de la velocitat) o transport de les mostres (Plebani, 2009).

El laboratori és responsable de la correcta informació de les mostres, així com el d'informar dels requeriments analítics que una mostra requereix, com per exemple l'ús d'un o altre anticoagulant quan la mostra és sanguínia (Coppens, 2010).

Per tal de disminuir els errors preanalítics cal tenir en compte que els medis tècnics per si sols no són suficients, ja que les aportacions personals són molt més importants (Ashakiran, 2011).

A la fase analítica, els errors més comuns provenen del mal funcionament dels equips de mesura, interferències o errors amb els controls de qualitat. Segons Taverniers, existeixen dues formes de controlar que els resultats són fiables i vàlids (Taverniers, 2004): mitjançant la comparació entre laboratoris o mitjançant el compliment dels requisits de les normes internacionals, com per exemple els indicadors de qualitat de la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC).

A la Comunitat Europea existeixen diferents agències reguladores que tenen com a finalitat establir els sistemes de control per tal de garantir la qualitat del producte o servei. Una de les més internacionals, l'Organització Internacional de Normalització (ISO) proveeix normes

internacionals pràctiques per fer front a molts desafiaments globals en el sector de la salut, l'alimentació, el canvi climàtic, etc.

2.3.- Paràmetres estadístics indicadors de qualitat analítica

2.3.1.- Els valors de referència

Durant molt de temps s'ha emprat el terme *valors normals* per designar els valors de les persones suposadament sanes, però aquest terme, segons el context en el qual s'utilitzi, pot tenir diferents significats, per la qual cosa és recomana emprar el terme de valors de referència (Martínez-González, 2014).

L'ús dels valors de referència és molt important tant en clínica com en recerca, ja que gràcies a ells és podran observar valors anòmals en la mesura dels biomarcadors.

Els valors de referència poden dividir-se en individuals o poblacionals (valors de referència en diabètics, valors de referència en embarassades, etc.). Aquests es diferencien perquè els valors de referència individuals corresponen als valors previs d'una persona en un estat de salut específic, mentre que els valors de referència poblacionals s'obtenen analitzant un grup de persones de referència ben definit.

Per tal de determinar els valors de referència d'un biomarcador s'ha de seguir diferents passos:

1. Selecció de les persones de referència.
2. Obtenció de les mostres.
3. Realització dels procediments analítics.

4. Anàlisi estadístic.

En aquest apartat ens centrarem en l'anàlisi estadístic de les dades per determinar els valors de referència d'un biomarcador.

2.3.2.- La distribució de les dades

2.3.2.1.- La normalitat

La normalitat és l'estudi de la dispersió de les dades. L'observació de la distribució d'un conjunt de dades té per objectiu conèixer la forma que adopta la distribució, si és gaussiana o no, si hi ha valors aberrants o bé, la quantitat de pics que pot tenir la corba de distribució (bimodal o polimodal).

L'ideal per un bon biomarcador és que la distribució de valors sigui gaussiana, la denominada normal. En una distribució normal (figura 5), la mitjana, la mediana i la moda coincideixen al mateix punt ja que la distribució de les dades és simètrica.

En una distribució normal del 95%, els valors obtinguts en l'anàlisi d'un biomarcador es troben dins l'interval comprès entre -2σ - 2σ , això vol dir que la majoria de les dades estan incloses dins l'interval mitjana \pm 2 desviacions estàndard.

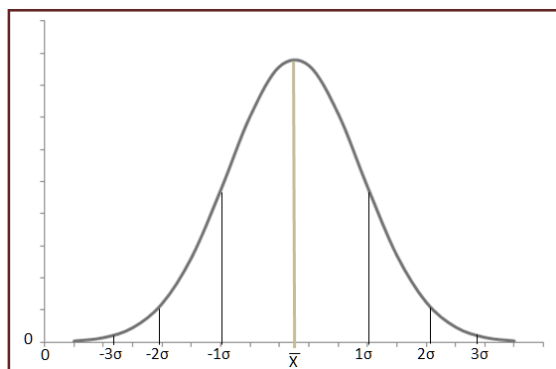


Figura 5. Representació gràfica d'una distribució de dades normal.

La binomialitat o polimodalitat de la distribució ve definida per a la quantitat de pics que hi trobem en la representació gràfica de les dades. Quan hi ha un sol pic és diu que és binomial, quan hi ha dos o mes, és diu que és polimodal. La utilitat de saber si és binomial o polimodal rau a l'hora d'establir els valors de referència d'un biomarcador. En el cas que surti polimodal, cal revisar els criteris de selecció de les persones o fraccionar les dades segons edat, sexes o algun altre factor.

2.3.2.1.1.- Tests de normalitat

Estadísticament existeixen diferents tests per calcular la normalitat: Test de Shapiro-Wilk W , el test de Shapiro-Francia W' , el test d'Agostino, el test de Kolmogorov-Smirnov i el test de Lilliefors entre altres (Martínez-González, 2014).

L'elecció d'un test o altre va en funció del nombre de dades que s'han d'analitzar. El test Shapiro Wilk W és un test per un conjunt de dades amb un nombre de mostres inferior a 30, mentre que el Shapiro-Francia W' és la versió reduïda de l'anterior, per a un conjunt de dades de 3

mostres. El test de Kolmogorov-Smirnov és un test per a un conjunt de dades superior a 50. Per últim, el test de Lilliefors és una modificació del Kolmogorov-Smirnov específica per aquells casos on la mitjana i la variància són desconegudes (Pedrosa, 2014).

2.3.2.1.2.-La asimetria

La asimetria és l'observació de la forma que adopta la distribució d'un conjunt de dades (Martínez-González, 2014).

Estadísticament ens podem trobar en tres situacions diferents de asimetria (figura 6):

- a) Asimetria positiva (coeficient de asimetria > 0). La asimetria positiva és dona quan el valor de la mediana és major que el de la mitjana aritmètica, per la qual és produeix una desviació de la corba cap a la dreta (biaix a la dreta).
- b) Simetria (coeficient de asimetria = o aproximat a 0). Una distribució de dades és simètrica quan, els valors de la mitjana aritmètica, mediana i moda coincideixen en el mateix valor.
- c) Asimetria negativa (coeficient de asimetria < 0). La asimetria negativa és dona quan el valor de la mediana és menor que el de la mitjana aritmètica, per la qual és produeix una desviació de la corba cap a l'esquerra (biaix a l'esquerra).

L'ideal és que un conjunt de dades tingui una distribució simètrica, el que significarà que la distribució és normal.

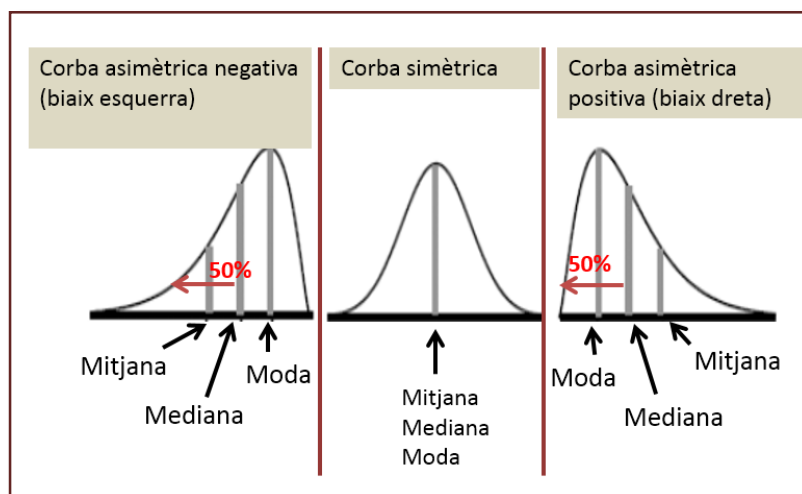


Figura 6. Esquema representatiu de la tendència positiva o negativa de la simetria, en funció de les dades.

2.3.2.1.3.- La curtosi

La curtosi és una altra mesura, que juntament amb la asimetria és necessària per considerar una distribució de dades com "normal" (Martínez-González, 2014).

Amb la curtosi, s'observa el grau d'apuntament o convexitat d'una distribució de dades.

En un conjunt de dades, l'ideal és que el coeficient de curtosi no sigui gran ja que per a la majoria de procediments estadístics és requereix que les dades tinguin una distribució normal.

Estadísticament ens podem trobar en tres situacions diferents de curtosi (figura 7):

- Curtosi leptocúrtica (coeficient de curtosi > 0): és diu que una corba és leptocúrtica quan la major concentració de dades és

troba per sobre dels valors centrals de la variable (curtosis positiva).

- b) Curtosi mesocúrtica (coeficient de curtosi = 0). Quan els valors presenten un apuntament mitjà de la corba, és a dir, quan la major concentració de dades és troba al voltant dels valors centrals de la variable s'anomena mesocúrtica, el mateix que presenta una distribució normal.
- c) Curtosi platicúrtica (coeficient de curtosi < 0). S'anomena platicúrtica quan la major concentració de dades és troba per sota dels valors centrals de la variable.

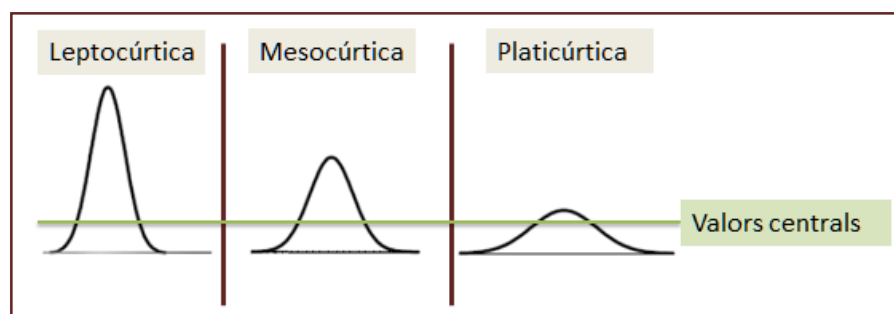


Figura 7. Dibuix representatiu de les diferents formes de curtosis, en funció de la concentració de les dades.

La importància de que un conjunt de dades tingui una distribució normal, sigui simètric i mesocúrtic, rau a l'hora de fer estadística inferencial, ja que si no presenten una distribució normal, les dades hauran d'ajustar-se a una distribució normal, mitjançant un estudi dels valors aberrants i la transformació de les variables mitjançant l'ús de la escala logarítmica o bé calculant l'arrel quadrada (Ricós, 2010).

2.3.3.- La precisió

La precisió, generalment s'expressa com a imprecisió. és la capacitat d'un mateix procediment analític de donar valors pròxims entre sí entre diferents mesures repetides, sota condicions específiques de repetibilitat o de reproductibilitat (Eurachem, 2011).

Es parla de condicions de **repetibilitat** d'una mesura quan aquestes condicions inclouen el mateix procediment analític, la mateixa tècnica, els mateixos operadors, el mateix mètode d'anàlisi, les mateixes condicions d'operació (instruments), el mateix lloc i una mateixa sessió de treball. Existeix el concepte de repetibilitat intermèdia, el qual és tracta de la mesura de la repetibilitat sota condicions que inclouen el mateix procediment de mesura, el mateix lloc de mesura, però mesures repetides del mateix paràmetre en diferents sessions de treball (diferents dies). Aquest paràmetre permet estudiar altres tipus de variabilitat, com operadors diferents i/o, l'ús de controls de qualitat diferents.

Les condicions de **reproductibilitat** és donen quan les operacions de mesura inclouen diferents llocs de mesura, diferents operadors, diferents controls de qualitat, però emprant el mateix procediment analític, i les mateixes mostres. Aquest paràmetre s'acostuma a fer servir per estandarditzar processos analítics, i és mesurada mitjançant estudis interlaboratori.

La precisió, habitualment s'expressa de forma numèrica a través de les mesures de tendència central (com la mitjana aritmètica, mediana o mitjana geomètrica) i les mesures de dispersió (com la desviació típica,

la variància o el coeficient de variació). Però una altra forma d'expressar la precisió és mitjançant l'error aleatori.

L'error aleatori (EA) és aquella desviació que és produeix sempre i de igual mesura, que no afecta a la mitjana i que no és pot evitar. L'error aleatori és calcula en base a la desviació estàndard del procediment, multiplicat pel factor de cobertura t , que per un nivell de confiança del 95%, el més emprat, és d'1,96 (Westgard, 2012).

2.3.3.1.- Mesures de tendència central

El principal valor de mesura de la tendència central és la **mitjana aritmètica**. és la mesura més emprada, el seu inconvenient és que és troba influenciada pels valors extrems, especialment si el conjunt de dades és petit.

La **mediana** és tracta del valor central del conjunt de dades ordenat. és el valor que és troba al mig, útil en aquells conjunt de dades amb poca quantitat de valors.

La **mitjana geomètrica** és útil per a aquells biomarcadors amb un comportament exponencial. és més robusta que la mitjana aritmètica, ja que els valors extrems la influeixen poc.

2.3.3.2.- Mesures de dispersió

La **desviació típica** i la **variància** mesuren el grau de dispersió dels valors que formen el conjunt de dades.

El **rang** és una altra mesura de dispersió que consisteix en la resta del valor major menys el menor. Quan una distribució de dades és

asimètrica, és preferible emprar el rang com a mesura de dispersió de la mediana (mesura de tendència central).

El **coeficient de variació** és el quocient entre la desviació estàndard i la mitjana aritmètica d'un conjunt de mesures, expressat en percentatge. Serveix per comparar biomarcadors que tenen unitats de mesura diferents.

La repetibilitat interindividual fa referència a la capacitat d'un mètode analític de donar valors pròxims entre sí, en l'anàlisi de diferents individus. És mesura amb el **coeficient de variabilitat analític (CVa)**.

La repetibilitat intraindividual fa referència a la capacitat d'una tècnica analítica de donar valors pròxims entre sí dintre la mateixa mostra, és a dir, la repetibilitat entre rèpliques (diferents mesures d'una mateixa mostra en una mateixa cubeta/alíquota) o duplicats/triplicats, etc. (diferents mesures d'una mateixa mostra en diferents alíquotes). És mesura amb el **coeficient de variabilitat intraindividual (CVi)**.

L'ideal per a un bon biomarcador és que les mesures de dispersió siguin mínimes, ja que això significa que el biomarcador és precís. De forma esquemàtica, a la figura 8 podem veure de quina manera les condicions de mesura fan variar el valor de la desviació estàndard. A mesura que es va introduint una variant a l'anàlisi, ja sigui diferent operador, diferent equip, diferent mostra o bé diferent laboratori, la desviació és major (Eurachem, 2014).

Introducció

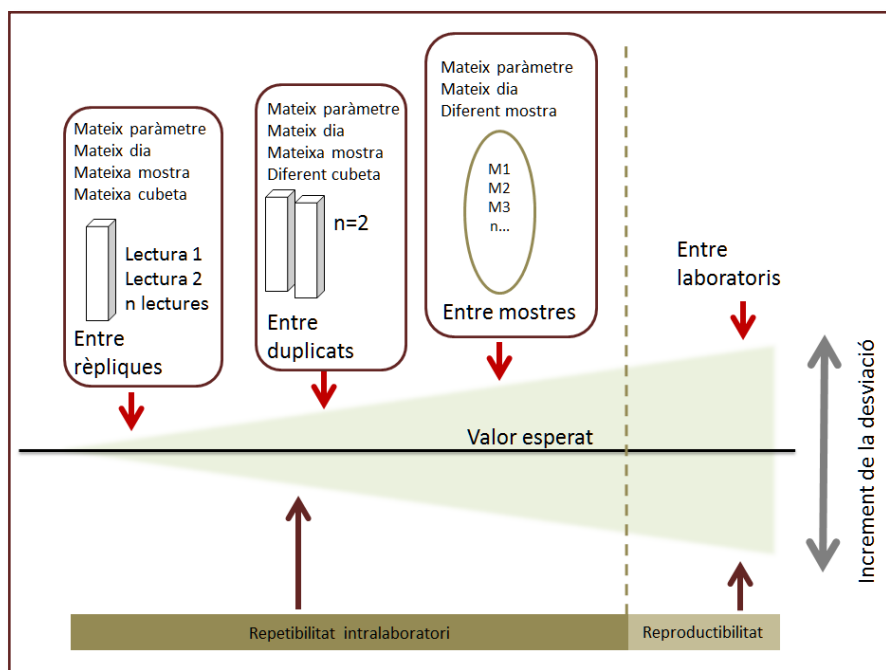


Figura 8. Diagrama esquemàtic que il·lustra la relació entre la precisió estimada sota diferents condicions de mesura. Adaptada d'Eurachem, 2014.

2.3.4.- L'exactitud

El concepte d'exactitud d'una mesura fa referència a la capacitat d'un procediment analític de donar valors pròxims entre el valor mesurat i el valor verdader.

El concepte d'exactitud en si mateix no dona un valor numèric, sinó que s'anomena "poc exacte o molt exacte". No obstant això, la quantificació de l'exactitud es pot dur a terme mitjançant el càlcul de l'error sistemàtic (Eurachem, 2011).

L'error sistemàtic (ES) fa referència a la desviació que té un sistema analític en relació amb el valor real. L'error sistemàtic pot ser constant al llarg de tot el procés. Una forma d'eliminar-lo és la d'afegir duplicats, triplicats al procés. L'error sistemàtic es calcula mitjançant la resta del valor obtingut i del valor verdader. El valor verdader és el valor que esperem que doni com a resultat, pot ser donat per un estàndard, pot ser el valor d'una substància emprada com a control, etc., però sinó el tenim, com a valor verdader s'utilitza la mitjana aritmètica de totes les mesures.

L'exactitud i la precisió es representen de forma conjunta mitjançant un gràfic en forma de diana. Com podem observar a la figura 9, trobem quatre tipus de representació diferents:

- A. En el dibuix A es representen mesures poc repetitives i poc properes al valor de referència.
- B. En el dibuix B tot i presentar una elevada precisió, les mesures són poc properes al valor de referència.
- C. En el dibuix C es representen mesures poc precises però properes al valor de referència.
- D. En el dibuix D trobem representades les característiques analítiques ideals: precisió en les mesures i exactitud amb el valor de referència.

Introducció

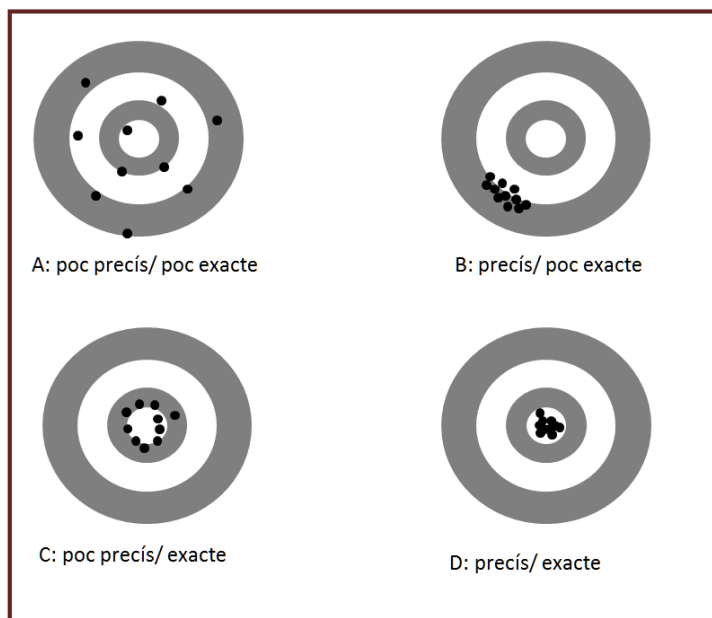


Figura 9. Representació de la precisió i l'exactitud d'una anàlisi.

En relació als biomarcadors, com hem explicat anteriorment, un biomarcador ha de complir amb uns requisits analítics, entre ells estan que sigui precís i que sigui exacte. Si observem la figura 9, l'ideal per a un biomarcador és que les seves mesures siguin precises i exactes, per tant que estiguin representades amb el dibuix D.

2.3.5.- Especificacions de la qualitat analítica

2.3.5.1.- Graus de qualitat (GQ)

El laboratori ha d'assegurar que la informació que produeix satisfà les necessitats dels investigadors.

Al llarg dels anys diferents investigadors han proposat models amb criteris que permetessin al laboratori comprovar el grau de compliment en qualitat de les seves prestacions analítiques.

L'any 1999 la *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, la Organització Mundial de la Salut (OMS) i la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)* van reunir un ampli grup de professionals per estudiar i debatre les especificacions globals de la qualitat al laboratori clínic, on van consensuar un model jeràrquic per definir els criteris analítics per establir les especificacions de qualitat. Aquest model jeràrquic defineix tres nivells de qualitat: òptim, desitjable o mínim, segons la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític (Esteve, 2010). El laboratori ha de ser qui escull quin nivell d'excel·lència vol aplicar al seu laboratori tenint en compte l'objectiu de l'anàlisi, el seu nivell tecnològic, l'entrenament dels treballadors, el nivell d'automatització, etc.

2.3.5.2.- El coeficient de variabilitat relatiu (CVR)

No obstant, existeixen altres paràmetres indicadors de qualitat analítica, com és el **coeficient de variabilitat relatiu (CVR)**. El CVR va ser descrit per primera vegada per Tonks a l'any 1958. Aquest és el quocient entre el coeficient de variabilitat biològic (CVa) i el coeficient de variabilitat

analític (CVi). El coeficient de variabilitat biològic és el coeficient de variabilitat que un mètode analític presenta al analitzar diferents persones, mentre que el coeficient de variabilitat analític és el coeficient de variabilitat que presenta una tècnica analítica al realitzar rèpliques d'una mateixa mostra. Per tant, el CVR mesura la correlació entre la variació biològica i la variació analítica (Terres-Speziale, 2006).

Aquest paràmetre indicador de qualitat és menys estricte que el model jeràrquic de la qualitat definit a la Conferència d'Estocolm. Amb aquest quocient és poden establir objectius de qualitat en qualsevol biomarcador mentre que les seves mesures es trobin dins l'interval de confiança del biomarcador i és determini el coeficient de variació de cada tècnica (Terres-Speziale, 2007).

En mètodes ben controlats, aquest coeficient ha de ser sempre inferior a 1. Quan aquest valor és superior a 1 significa que la tècnica analítica emprada per a la mesura del biomarcador no és prou precisa, amb lo qual, caldria revisar si és la tècnica adequada o si hi ha hagut algun problema durant l'anàlisi.

Aquest sistema de control del grau de la qualitat analítica estableix diferents tipus de grau d'acompliment: no conforme, conforme a Tonks, conforme a Aspen i conforme a *six sigma*, que correspon al nivell màxim de qualitat.

A mes a mes, existeixen diferents nivells d'exigència qualitativa que ens permeten classificar el CVR dels biomarcadors en dos nivells de qualitat, un mes estricte que l'altre (Terres-Speziale 2006; Esteve, 2010).

El nivell Tonks equival al nivell de qualitat mínim. En aquest nivell s'afirma que la variabilitat analítica és menor en un 25% a la variabilitat

metodològica o biològica en la seva versió més estricta. En la versió menys estricta, s'accepta que la variabilitat analítica sigui igual que la biològica o metodològica.

Posteriorment, aquest criteri va ser modificat per E. Coltove i acceptat a la conferència del Col·legi Americà de Patòlegs al 1977, que va tenir lloc a Aspen, d'aquí el seu nom. En aquesta conferència, es va establir que la variabilitat analítica havia de ser com a màxim, un 12,5% inferior a la biològica, en el seu nivell més estricte. Mentre que per al nivell de qualitat menys estricte, s'accepta una variabilitat analítica de fins al 50%.

El nivell *six sigma* equival al nivell màxim de qualitat. Amb aquest nivell en la seva forma més estricta s'accepta com a màxim una diferència del 17%, mentre que en la versió menys estricta, s'accepta que la variabilitat analítica és menor fins a un 4% que la variabilitat metodològica o biològica (Terres-Speziale, 2006; Terres-Speziale, 2007).

3.- EL DANY OXIDATIU I LA INFLAMACIÓ

3.1.- El dany oxidatiu

El dany oxidatiu és defineix com el dany biomolecular causat per l'atac de radicals lliures i altres espècies reactives de l'oxigen (ERO), sobre els constituents dels organismes vius (lípid, proteïnes i àcids nucleics) (Halliwell, 2004).

Els radicals lliures (RLL) són espècies químiques (taula 1) que presenten un o més d'un electró desaparellats en la seva estructura (Halliwell, 1999).

Les espècies reactives d'oxigen, són el conjunt de molècules que engloben els RLL i altres molècules no radicals (Halliwell, 1999).

En els organismes vius, els RLL és formen a partir de la reducció de l'oxigen molecular durant la cadena respiratòria mitocondrial. També és produeixen quan ens exposem a factors externs com el tabac, l'alcohol, la contaminació ambiental, la radiació ultra-violeta, entre d'altres (Albano, 2006).

Els organismes vius necessiten les ERO per a la seva supervivència ja que les seves funcions estan associades amb processos fisiològics, com la senyalització cel·lular o la mort programada de les cèl·lules. Aquesta producció normal d'ERO és manté controlada per a la eficiència dels sistema de transport d'electrons, el sistema antioxidant enzimàtic, i el sistema antioxidant no enzimàtic (Chabot, 1998).

Els organismes vius tenen un sistema de defensa antioxidant que s'encarrega de la prevenció del dany oxidatiu. Un antioxidant és qualsevol substància que evita, retarda o prevé el dany oxidatiu en una diana biològica (Halliwell, 2007).

Taula 1. Espècies reactives de l'oxigen (ERO) i sistemes de defensa antioxidant

Espècies reactives d'oxigen

Radicals: Hidroxil ($\cdot\text{OH}$), Peroxil ($\text{L(R)OO}\cdot$), Alcoxil ($\text{L(R)O}\cdot$), Hidroperoxil ($\text{HOO}\cdot$), Superòxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Òxid nítric ($\text{NO}\cdot$), Diòxid de Nitrogen ($\text{NO}_2\cdot$).

No radicals: Peroxinitrit ($\text{ONOO}\cdot$), Hipoclorit ($\cdot\text{OCl}$), Hidroperòxid (L(R)OOH), Oxigen singulet ($^1\Delta\text{O}_2$), Peròxid d'hidrogen (H_2O_2).

Sistemes de defensa antioxidant

Endògens

Enzimàtics: Superòxid dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutatió peroxidasa (GPx), Glutatió Reductasa (GR), Glutatió-S-Transferasa (GST).

No enzimàtics: Sistema glutatió (GSH i GSSG), Transferrina, urat, l'ubiquinol, melatonina

Exògens

Vitamina E, B-carotè, Àcid ascòrbic, polifenos, Microelements (Zn, Se, Mn, Cu, Fe).

Extret de Abuja, 2001; Roth, Manhart, 2004.

Els sistemes antioxidants poden ser endògens o exògens. (taula 1). Els sistemes antioxidants endògens és classifiquen segons la seva naturalesa en antioxidants enzimàtics o no enzimàtics. Els sistemes exògens provenen de la dieta (Abuja, 2001; Roth, 2004). Aquests sistemes estan coordinats per proveir mecanismes de defensa biològica, de manera que són capaços d'augmentar la seva concentració, tot adaptant-se a les necessitats de canvi i, mantenint el balanç entre la producció d'ERO i el sistema de defensa antioxidant (Niki, 2010).

El dany oxidatiu és considerat el major contribuent a l'envelliment, a les malalties degeneratives com l'Alzheimer, el Parkinson, el càncer, les malalties renals, la malaltia cardiovascular i el deteriorament del sistema immunològic (figura 10) (Dalle-Donne, 2003).

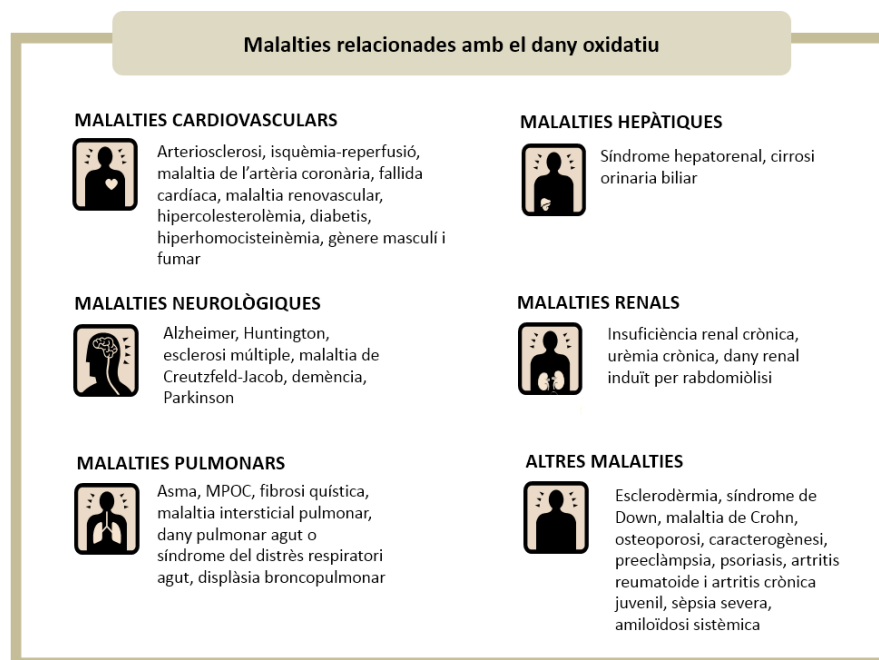


Figura 10. Resum de les patologies relacionades amb el dany oxidatiu. Adaptada de Dalle-Donne, 2004.

3.2.- Biomarcadors del dany oxidatiu

Atès que l'aparició del dany oxidatiu pot esdevenir per un increment en la producció d'ERO o bé per una disminució dels sistemes de defensa antioxidants, com a biomarcadors del dany oxidatiu és necessari mesurar tant la formació de RLL i ERO com mesurar els components del sistema de defensa antioxidant. Aquest fet implica que existeixin multitud de molècules que és poden analitzar per determinar el dany oxidatiu, per la qual cosa genera la necessitat de tenir biomarcadors específics per cadascun dels processos implicats en l'aparició del dany oxidatiu.

El dany oxidatiu és pot mesurar de dues formes (figura 11)

(Ďuračková, 2010):

1. De forma directa *in vivo*, mitjançant la mesura de la formació dels radicals lliures, principalment H_2O_2 i $\cdot\text{OH}$ amb espectroscòpia de ressonància de l'espín electrònic.

La ressonància espectroscòpica paramagnètica, o altrament coneguda com a ressonància de l'espín electrònic, és una tècnica analítica que s'utilitza per detectar i quantificar les espècies químiques que posseeixen electrons desaparellats, com ara els RLL i els compostos que contenen ions de metalls de transició, mitjançant l'absorció de microones per part dels espins electrònics quan se'ls aplica un camp magnètic estàtic.

Aquesta tècnica presenta dues limitacions:

- a) La reactivitat dels radicals lliures. Aquestes dues tècniques analitzen els RLL aïlladament. L'alta reactivitat dels RLL no facilita la seva mesura de forma aïllada, ja que normalment és troba formant complexos en les cèl·lules, teixits o fluids corporals.
 - b) La seva vida mitjana, que és molt curta (microsegons). Analíticament, és difícil mesurar una molècula amb una vida mitjana tan molt curta.
2. De forma indirecta: L'excessiva reactivitat dels radicals lliures facilita la interacció-reacció amb altres biomolècules, generalment més estables i mesurables, com són els productes d'oxidació, o bé els enzims antioxidants, i per això els mètodes indirectes de detecció del dany oxidatiu són els més emprats.

L'elecció per part d'un grup d'investigació d'un mètode o d'un altre per determinar el dany oxidatiu depèn principalment del que es vol mesurar, però l'elecció de l'anàlisi d'un determinat biomarcador també depèn dels recursos materials, econòmics i humans de què disposa. En l'actualitat, s'està apostant per les tècniques d'última generació (ciències òmiques) gràcies a l'augment del seu abast.

En aquest treball ens centrarem en els biomarcadors indirectes del dany oxidatiu.

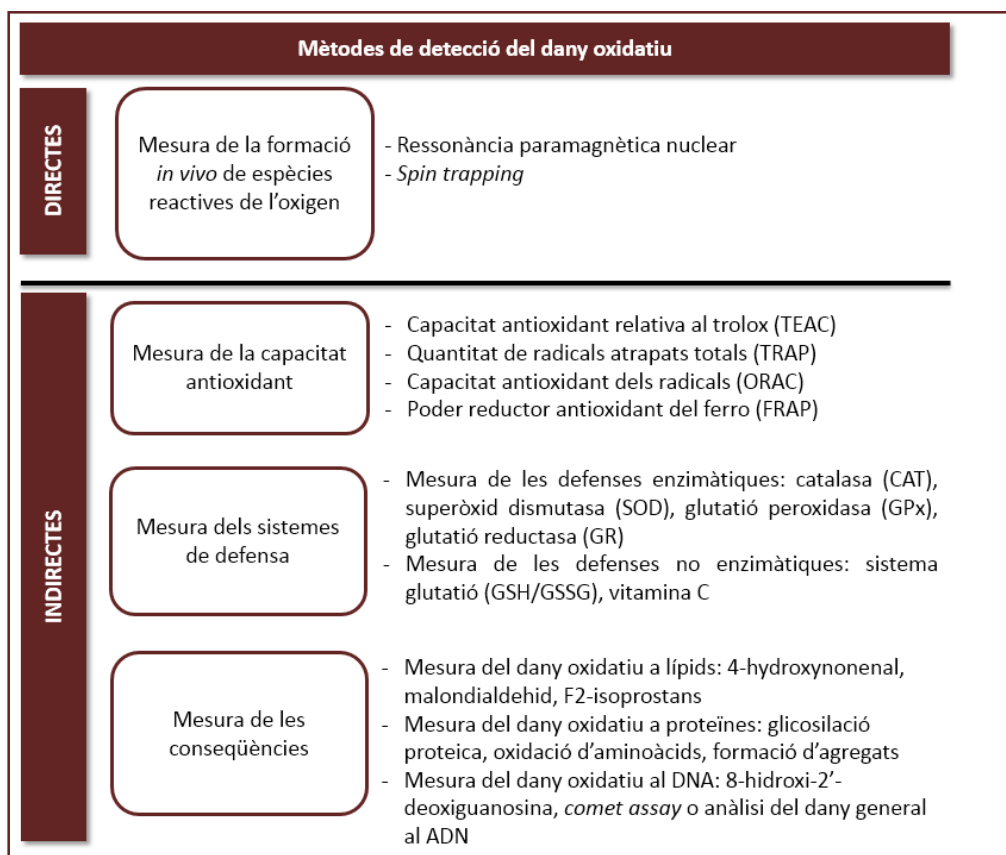


Figura 11. Esquema representatiu dels diferents biomarcadors mes emprats en la determinació del dany oxidatiu. Adaptada de Poljsak, 2013.

3.2.1.- Biomarcadors del sistema de defensa antioxidant

Malgrat la importància que tenen els radicals lliures, quan aquests excedeixen els nivells fisiològics normals, és necessari que existeixin mecanismes que controlin la seva producció i l'eliminació per prevenir efectes adversos. Per això, l'organisme humà ha desenvolupat un sistema de defensa antioxidant.

El sistema de defensa antioxidant de l'organisme actua per mitjà de dues vies (Victor, 2004):

- La primera via, de prevenció, mitjançant els sistemes de defensa antioxidant endògens, que eviten la formació en excés de les ERO.
- La segona via, d'eliminació, mitjançant els antioxidants exògens, que eliminen els radicals que ja han estat formats.

Com hem vist a la taula 1, els sistemes de defensa antioxidant és divideixen en enzimàtics i no enzimàtics. Dins dels enzimàtics trobem la superòxid dismutasa, la catalasa, la glutatió peroxidasa, i la glutatió reductasa; dins els no enzimàtics trobem el sistema glutatió i la vitamina C, entre altres.

La **superòxid dismutasa (SOD)** es troba present en tots els tipus cel·lulars i té un paper molt important davant del dany oxidatiu. Aquest enzim catalitza el radical superòxid fins a peròxid d'hidrogen i aigua (Sturtz, 2001).

La **catalasa (CAT)** és un dels enzims mes abundants a la natura, i és troba àmpliament distribuït al nostre organisme. A les cèl·lules és situa

principalment en l'àmbit mitocondrial i en els peroxisomes, exceptuant als eritròcits que és troba al citosol. és caracteritza per a la seva alta eficiència catalítica del peròxid d'hidrogen (Wittmann, 2012).

La **glutatió reductasa (GR)** és un flavoenzim depenent de la nicotinamina adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) que catalitza la reducció del glutatió oxidat (GSSG) a glutatió reduït (GSH) (Lam, 1993).

La **glutatió peroxidasa (GPx)** és un enzim seleni depenent que participa en les transformacions de les espècies reactives d'oxigen tot catalitzant la reducció del peròxid d'hidrogen o el radical lipoperòxid, però amb l'ajuda del glutatió reduït. Té major afinitat pel substrat que la CAT (Lam, 1993).

El **sistema glutatió (GSSG/GSH)** està format pel glutatió oxidat (GSSG) i el glutatió reduït (GSH). és un tripèptid d'àcid glutàmic, cisteïna i glicina. Gairebé en trobem en tots els teixits, però no a totes les cèl·lules. El GSH és una de les molècules antioxidants mes importants, funciona com a reductor intracel·lular, de manera que protegeix les cèl·lules davant els radicals lliures. El GSH detoxifica el peròxid d'hidrogen i els peròxids lipídics. El GSH és manté en un cicle redox amb el GSSG dins el mitocondri i és regenerat per a la GR. Quan existeix un increment de l'activitat dels RLL, a l'interior de les cèl·lules és produeix un augment del GSSG per activació del mecanisme protector del GSH. Aquest GSSG és transportat a l'exterior cel·lular. L'expulsió del GSSG a l'exterior de la cèl·lula, fa variar la ràtio GSSG/GSH, per la qual aquesta ràtio és emprada com a índex d'estrès oxidatiu intracel·lular (Victor, 2004).

La **vitamina C** és considera un potent agent reductor i proveeix la principal línia de defensa antioxidant dels lípids en plasma, davant

l'acció de diferents oxidants com poden ser els radicals hidroxils i l'àcid hipoclorós, entre altres (Ďuračková, 2010).

Diferents metodologies s'han desenvolupat i optimitzat amb l'objectiu de identificar i quantificar els enzims antioxidants i els sistemes de defensa antioxidant no enzimàtics en mostres biològiques, les quals inclouen tècniques ELISA, tècniques espectrofotomètriques, tècniques fluorimètriques, combinades o no amb cromatografia líquida o de gasos d'alt rendiment, i mes recentment, les tècniques d'espectrometria de masses acoblada a cromatografia líquida per ionització de masses (Giustarini, 2009).

3.2.2.- Biomarcadors de les conseqüències del dany oxidatiu

Es conegut que l'estrès oxidatiu juga un paper important en la fisiopatologia de nombroses malalties, d'aquí la importància de desenvolupar mètodes i tècniques analítiques que puguin mesurar de forma sensible i precisa el dany causat per l'estrès oxidatiu (Czerska, 2015).

3.2.2.1.-Biomarcadors del dany oxidatiu a lípids

Els lípids cel·lulars, a causa de a l'abundància de dobles enllaços en la seva estructura, són una diana principal per les ERO. Les ERO, són altament reactives i quan és troben prop de les membranes cel·lulars, ataquen als seus fosfolípids provocant la seva oxidació. Aquest procés és coneix com lipoperoxidació i genera la formació del radical peroxil, així

com altres productes, com el malondialdehid, l'età i l'etilè, que poden desencadenar edema i la mort cel·lular (Rahal, 2014).

El dany oxidatiu als lípids és poden mesurar de forma directa mitjançant (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA)s, 2011):

- La quantificació dels F₂-isoprostans: Els isoprostans són una família de compostos similars a les prostaglandines, que és produeixen per un mecanisme no enzimàtic a partir de la peroxidació de l'àcid araquidònic, present els en els fosfolípids de les membranes cel·lulars. Aquests, són conduïts al torrent sanguini, per la qual cosa poden ser quantificats en diferents matrius com sang, orina i teixits. De la família dels isoprostans, els F₂-isoprostans són els mes estables i, per tant, reflecteixen millor l'estrès oxidatiu. Els F₂-isoprostans és poden mesurar en orina, a partir de tècniques d'espectrometria de masses o bé a partir de tècniques ELISA. L'ús de kits comercials d'immunoassaig per a la seva detecció està molt estès per a la seva senzillesa i el seu cost, però els seus resultats és correlacionen poc amb els obtinguts per espectrometria de masses a causa de a la falta de especificitat, ja que amb aquest tipus de tècnica és generen reaccions creuades amb altres prostaglandines (Ho, 2013).
- La quantificació de la LDL oxidada: la oxidació i glicació de la LDL i dels fosfolípids pot tenir lloc per catalització enzimàtica o no. AL LDL oxidada és pot mesurar mitjançant tècniques ELISA emprant anticossos monoclonals específics, els quals presenten

una especificitat adequada (Ho, 2013; EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA)s, 2011).

- La quantificació dels fosfatidilcolina hidroperòxids, en sang o teixits per cromatografia líquida d'alta resolució.
- La quantificació del malondialdehid (MDA): El malondialdehid és un aldehid produït per a la lipoperoxidació dels àcids grassos poliinsaturats de les membranes cel·lulars. El MDA és pot mesurar en plasma a partir de tècniques ELISA o bé emprant cromatografia líquida d'alt rendiment.
- La quantificació de les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS): El mètode més àmpliament utilitzat per mesurar la peroxidació lipídica és la tècnica TBARS que mesura les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric, entre les que és troba el MDA. El MDA reacciona amb l'àcid tiobarbitúric i produeix un compost cromògen, quantificable o bé per espectrofotometria, o bé, per cromatografia líquida d'alt rendiment. L'inconvenient d'aquest mètode és la falta de especificitat, ja que no mesura sols el MDA, sinó que mesura altres aldehids que hi poden haver a la mostra (Dalle-Donne, 2006).

3.2.2.2.- Biomarcadors del dany oxidatiu a proteïnes

Els sistemes biològics estan contínuament exposats a oxidants tant endògens com exògens. Les proteïnes són els components no aquosos majoritaris a l'organisme, per tant, són una de les principals dianes d'oxidació (Davies, 2016). Com a resultat de les modificacions proteiques trobem la fosforilació mitjançant les quinases i la desfosforilació per mitjà de fosfatases, les quals afecten a la estructura

de la proteïna de forma permanent (Ghesquière, 2014). Qualsevol residu aminoacídic de les proteïnes és susceptible a la oxidació per el radical $\cdot\text{OH}$. Els aminoàcids principalment afectats són la cisteïna, la metionina, el triptòfan, la fenilalanina, la tirosina, la histidina, l'arginina, la lisina, la prolina, la treonina i el glutamil, donant lloc a l'oxidació dels tiols, les hidroxilacions aromàtiques i la formació de grups carbonils. Aquestes modificacions oxidatives es poden classificar en dues categories: reversibles o irreversibles (Cai, 2013).

La cisteïna i la metionina són particularment sensibles a la oxidació per les ERO. Els sistemes biològics tenen sistemes de reparació que converteixen aquests productes de l'oxidació a la seva forma inicial. Aquestes són les úniques modificacions oxidatives de les proteïnes que es poden revertir. En el cas de la metionina, aquesta s'oxida a metionina sulfòxid i per acció d'una reductasa, repara la metionina a la seva estructura no modificada (Berlett, 1997).

La modificació irreversible més abundant que podem trobar és la introducció de grups carbonils a la cadena lateral d'aminoàcids com la prolina, arginina, lisina i treonina. La introducció de grups carbonil en els residus aminoacídics de les proteïnes és per tant, un indicador de modificació oxidativa (Méndez, 2014; Rogowska-Wrzesinska, 2014). La detecció i quantificació dels grups carbonils al laboratori és pot realitzar a partir de tècniques espectrofotometria, espectrofotometria acoblada a cromatografia líquida d'alta resolució, per tècniques ELISA o per electroforesis i *Western blot* immunoassaig (Dalle-Donne, 2003). La mesura dels grups carbonils a partir del 2,4-dinitrofenilhidrazon, un adducte estable, producte de la derivació del grup carbonil a partir de la

2,4-dinitrophenilidrazina és una de les tècniques més sensibles per a la detecció dels grups carbonils. Aquest adducte pot ser detectat de diferents formes: espectrofotomètricament, ja que aquest absorbeix la llum ultraviolada, a partir de cromatografia líquida d'alta resolució, tècnica més sensible i específica, i també, pot detectar-se per mitjà de tècniques ELISA (Dalle-Donne, 2003).

3.2.2.3.- Biomarcadors del dany oxidatiu a l'ADN

El dany oxidatiu a l'ADN és menys freqüent que el dany a proteïnes o lípids. Existeixen dues teories que expliquen les causes del dany oxidatiu ADN. La primera que diu que el dany al ADN és el resultat de l'atac del radical hidroxil a les bases purina o pirimidínica, provocant el trencament d'una o de les dues cadenes d'ADN. La segona, que diu que l'estrès oxidatiu incrementa la concentració d'ions de calci, el qual activa les nucleases que disgreguen l'ADN (Dąbrowska, 2017).

Els radicals desencadenen mutacions puntuals que poden esdevenir, si els sistemes de reparació no intervenen, en carcinogènesis o canvis de l'expressió per dany a un gen específic (Krishnan, 2008).

La interacció dels radicals hidroxils amb la guanina produeix la 8-hidroxil-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). Aquesta és produïda després de la reparació de l'ADN com a conseqüència de la interacció de la guanosina amb els RLL. Per tant, la 8-OHdG és el biomarcador més àmpliament emprat per a la mesura del dany oxidatiu a l'ADN, ja que la guanosina és la base més oxidable de l'ADN (Di Minno, 2016).

La mesura de la 8-hidroxi-2-deoxi-guanosina (8-OHdG) en sang, teixits i orina ha estat àmpliament estudiada en la quantificació del dany oxidatiu a l'ADN (Kroese, 2014).

Existeixen diferents metodologies per quantificar la 8-OHdG, com els ELISA, la cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses, la cromatografia líquida d'alt rendiment amb detecció electroquímica, o la cromatografia líquida amb espectrometria de masses en tàndem. Els ELISA són les tècniques més àmpliament emprades en la quantificació de la 8-OHdG. Tot i que els ELISA presenten repetibilitat i sensibilitat i un cost-efectivitat baix, les tècniques espectromètriques de masses són més sensibles i específiques, però amb un cost-efectivitat més elevat. (Cherubini, 2005; Kroese, 2014; Dąbrowska, 2017).

3.2.2.4.- Biomarcadors de la capacitat antioxidant

Existeixen abundants evidències bioquímiques, biològiques i clíniques de que l'estrès oxidatiu, induït per radicals lliures, està involucrat en la patogènesi de diferents malalties i l'envelliment. L'organisme, per contrarestar l'aparició de RLL, té uns mecanismes antioxidants potents, els quals han estat objectiu de molts estudis com a biomarcadors de la capacitat antioxidant. Diferents metodologies s'han desenvolupat per mesurar la capacitat antioxidant, però solament uns pocs és consideren estandarditzats (Takashima, 2012).

Molts dels mètodes emprats en l'avaluació de la capacitat antioxidant és basen en la capacitat total per atrapar radicals lliures, de les quals, la tècnica més emprada és la capacitat del plasma per absorbir radicals de l'oxigen, el test ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Aquest

mètode és basa en la capacitat dels antioxidants del plasma a eliminar radicals lliures en competició amb la fluoresceïna, donant com a resultat una disminució de la fluorescència. Aquesta tècnica serveix per avaluar la peroxidació en plasma, sèrum i altres teixits i productes alimentaris. Per la qual és el test més emprat per determinar la capacitat antioxidant (Pinchuk, 2012). Tot i que l'ORAC és un mètode simple, relativament ràpid i convenient, té dos inconvenients principals, primer, depèn de la fluoresceïna, la qual sobreestima la capacitat dels antioxidants dèbils, i segon, no és capaç de mesurar els solubles en lípids (Takashima, 2012). Una altra tècnica per mesurar la capacitat antioxidant és a partir de la **capacitat antioxidant del Trolox (TEAC)**. Aquest mètode és basa en la reducció del ABTS en presència de la mioglobina fèrrica, activada a través del peròxid d'hidrogen. **El poder oxidant de reducció de l'ió fèrric (FRAP) és** una altra tècnica de mesura la capacitat antioxidant que és basa en l'efecte dels antioxidants sobre les reaccions de transferència d'electrons. Aquesta metodologia no té en compte importants antioxidants com els tiols (GSH). En absència d'un biomarcador *Gold Standard*, l'elecció d'un mètode analític depèn principalment de la facilitat d'ús, o la instrumentació disponible. En aquest cas, el biomarcador més comunament emprat esdevé *de facto* el biomarcador *gold Standard*. No obstant, el mètode més comunament emprat no significa que sigui el millor, fàcil, rellevant o precís (Pinchuk, 2012).

3.2.- La inflamació

La inflamació és la resposta del sistema immunològic de l'organisme al dany causat, a les cèl·lules i teixits vascularitzats, per patògens

bacterians o per qualsevol altre agressor de naturalesa biològica, química, física o mecànica, amb la finalitat d'eliminar el causant, i reparar el teixit danyat (Kvietys, 2012).

La inflamació pot esdevenir un procés agut o crònic, depenent de la durada del procés, no obstant, poden coexistir en l'organisme. Quan no és possible resoldre la resposta aguda, la inflamació es torna crònica. La inflamació crònica és coneguda com la major contribuent a moltes malalties, com per exemple, l'artritis, l'arteriosclerosi, el càncer, la demència, la diabetis, la síndrome metabòlica o, les malalties vasculars (Chung, 2009).

La cronificació de la inflamació implica interaccions complexes entre cèl·lules i els mediadors que secreten, produint-se una infiltració per cèl·lules mononuclears (inclòs macròfags, limfòcits i cèl·lules plasmàtiques), augment de les concentracions plasmàtiques de les proteïnes de fase aguda (per exemple, proteïna C-reactiva), i, destrucció tissular. Aquest augment de les concentracions plasmàtiques de la proteïna C-reactiva (PCR) i el fibrinogen és mediat principalment per a la IL-6 (da Silva, 2017).

La inflamació crònica és una condició patològica caracteritzada per una contínua resposta inflamatòria. Macròfags, neutròfils, eosinòfils estan involucrats directament en la producció de citocines inflamatòries. La inflamació crònica té relació amb l'aparició de malalties relacionades amb l'envelliment. El procés inflamatori indueix estrès oxidatiu i redueix la capacitat antioxidant de les cèl·lules, per mitjà de l'increment en la producció de radicals lliures que reaccionen amb els fosfolípids de les membranes cel·lulars (Reuter, 2010).

3.2.1.- Biomarcadors de la inflamació

La inflamació és un procés complex que involucra la participació de molts mediadors químics, vies de senyalització i tipus cel·lulars.

La microcirculació, la qual és crítica per a la iniciació i perpetuació de la resposta inflamatòria, pateix molts canvis funcionals i estructurals com a resposta a la inflamació. Com hem dit anteriorment, aquestes alteracions van des de la disfunció endotelial, la migració de les molècules d'adhesió, angiogènesi, i activació de l'activitat plaquetària (Piccardi, 2017).

La proteïna-C-reactiva d'alta sensibilitat (hsPCR) ha estat el biomarcador mes extensament estudiat com a biomarcador de la inflamació durant els últims 15 anys. Durant la fase aguda la PCR és sintetitzada al fetge com a resposta a l'increment de les molècules pro inflamatòries (interleucina-6, interleucina-1 i el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α)) (Krintus, 2014).

Tot i que la hsPCR no és un potent biomarcador de la inflamació, existeixen evidències de que participa de forma directa en el procés inflamatori de l'aterogènesi. (Zakynthinos, 2009).

Les tècniques analítiques mes freqüentment emprades en la mesura de la hsPCR és basen en la immunonefelometria i la immunoturbidimetria, essent el mètode turbidimètric el mes emprat per a la menor aparició d'interferències (Dominici, 2008).

Un altre biomarcador de la inflamació són les citocines. Les citocines inclouen diferents proteïnes com la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10). La IL-1 i la IL-6 condueixen la producció de

proteïnes reactants de fase aguda, com la PCR (Zakyntinos, 2009). Tot i el cost que suposa mesurar la IL-6 per tècniques ELISA, la mesura de la IL-6 a partir de tècniques ELISA està àmpliament acceptada per a la seva facilitat, elevada especificitat i sensibilitat (Nordan, 2001).

3.2.2.- Biomarcadors de la disfunció endotelial

Durant les dues últimes dècades s'ha vist que l'endoteli vascular és un òrgan indispensable per a la regulació del to vascular i pel manteniment de la homeòstasi vascular. L'endoteli vascular, el qual regula el pas de macromolècules i cèl·lules circulatòries als teixits, és la major diana per l'estrès oxidatiu, jugant un paper important en la fisiopatologia de moltes malalties vasculares. Específicament, l'estrès oxidatiu incrementa la permeabilitat vascular i promou l'adhesió de leucòcits (Hadi, 2005).

El biomarcador *Gold Standard* per l'avaluació de la funció endotelial requereix una tècnica invasiva d'angiografia, a partir de l'administració d'acetilcolina. L'acetilcolina és un vasodilatador de l'endoteli. Amb aquesta tècnica és mesura el canvi de diàmetre de l'artèria coronària (Hadi, 2005).

S'han proposat diferents biomarcadors no invasius per a la determinació de la disfunció endotelial com són les citocines inflamatòries o les molècules d'adhesió a l'endoteli (e-, p-, l-selectines, sVCAM-1 i sICAM-1) (Ghiadoni, 2008).

Les selectines són molècules d'adhesió cel·lular expressades a la superfície de la cèl·lula. Les selectines són molècules clau en el procés inflamatori, ja que contribueixen al pas de leucòcits cap a les cèl·lules. La e-selectina és un excel·lent indicador de l'activació de l'endoteli tant

en la inflamació aguda com en la crònica. El millor avantatge de la E-selectina com a biomarcador és la seva facilitat per ser detectada a la sang mitjançant tècniques d'ELISA (Aman P. Mann, 2011).

De forma similar a les selectines, les cèl·lules d'adhesió vascular (sVCAM-1 i sICAM-1), contribueixen a l'adhesió dels leucòcits al endoteli (Paulus, 2011).

3.2.3.- Biomarcadors de l'activitat trombòtica

Com a mesura funcional de la fibrinòlisis, s'utilitza el biomarcador de la inhibició de l'activador del plasminogen (PAI-1). La PAI-1 és una glicoproteïna, de la família de les serines, inhibidora de proteïnases, emprada comunament en l'avaluació de l'activitat trombòtica, involucrada en la migració cel·lular en el procés inflamatori. La mesura del PAI-1 a partir de tècniques ELISA està àmpliament acceptada per a la seva facilitat, elevada especificitat i sensibilitat (Paulus, 2011).

3.3.- El perfil fèrric

3.3.1.- El ferro i el seu paper sobre l'oxidació i la inflamació

El ferro és un oligoelement essencial per tots els organismes vius, ja que juga un paper important en multitud de funcions cel·lulars del metabolisme, com el creixement o diferenciació cel·lular, en el transport i emmagatzematge de l'oxigen, la producció d'energia pel cicle cel·lular i la síntesi de l'ADN. Però a la vegada, el seu excés és potencialment tòxic per a la seva capacitat de donar electrons per produir radical hidroxil, a partir de la reacció de Fenton. El radical lliure hidroxil causa estrès

oxidatiu i indueix dany oxidatiu a l'ADN, lípids i proteïnes, i porta a la mort cel·lular (Orino, 2008). El control de la seva disponibilitat a les cèl·lules depèn de la ferritina com a proteïna transportadora i d'altres proteïnes amb funció detoxificants (Finazzi, 2014).

L'estudi del perfil fèrric en els processos inflamatoris i oxidatius té la seva importància per dos motius:

1. El ferro és un metall de transició que podem trobar en dos estats diferents a l'organisme, en estat ferrós (Fe^{2+}) i en estat fèrric (Fe^{3+}). El ferro ferrós catalitza diferents reaccions relacionades amb les espècies reactives d'oxigen, com la reacció de Fenton, i promou, com hem explicat anteriorment, la formació de radicals hidroxils i peròxid d'hidrogen, fet que alhora, promou la inflamació (Lapice, 2013).
2. La secreció de mediadors químics afecten a la hemostàsia del ferro. Els mediadors inflamatoris, com la IL-6 intervenen en el metabolisme de la hepcidina (hormona hepàtica que regula l'absorció del ferro), incrementant la seva secreció. L'increment de la hepcidina degrada la ferroportina (proteïna transportadora del ferro) pel qual, disminueix l'absorció cel·lular del ferro de la dieta (Karlsson, 2015).

3.3.2.- Biomarcadors del perfil fèrric

El biomarcador *gold standard* per mesurar els dipòsits de ferro a l'organisme és l'anàlisi químic de biòpsia de fetge, tècnica invasiva i costosa (Beilfuss, 2012). No obstant, en la pràctica existeixen diferents biomarcadors serològics per mesurar l'estat fèrric, com el ferro sèric, la

transferrina, la saturació de la transferrina, la ferritina, els receptors solubles de la transferrina, l'hemoglobina, el volum corpuscular mitjà (Muñoz, 2009), on els més comunament emprats per a la seva facilitat i cost, són la determinació del contingut en ferro, ferritina i transferrina al sèrum (Lapice, 2013).

La **ferritina** és la principal proteïna emmagatzemadora de ferro en els essers humans, animals i plantes, a més, evita els efectes nocius que pot generar el ferro lliure. La seva quantificació en sang i fluids s'utilitza per diagnosticar les anèmies ferropèniques. El seu valor és proporcional al dels dipòsits de ferro, ja que indica la quantitat de ferro lliure disponible. La ferritina sèrica és el millor biomarcador dels dipòsits de ferro perquè és no invasiu i altament específic (Ren, 2014).

Quan l'organisme requereix ferro per a la síntesi de proteïnes i enzims, la **transferrina**, la proteïna transportadora del ferro, s'encarrega de transportar el ferro a través del plasma.

La transferrina sèrica és un biomarcador útil per persones amb deficiència en ferro. La quantitat de transferrina sèrica és correlacionada amb la quantitat de receptor de la transferrina a la membrana dels eritroblasts. La seva mesura és menys precisa que la de la ferritina, a causa de la variable sensibilitat i especificitat dels mètodes emprats en la seva mesura (Terres-Speziale, 2007).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

Els resultats de les mesures que un laboratori ofereix han de tenir prou qualitat per a donar resposta a les necessitats de la societat. Aquests resultats de recerca es publiquen en revistes científiques i es reutilitzen com a base d'altres estudis, càlculs de mides mostrals, metanàlisi... Per tant, és molt important no proporcionar a la comunitat científica dades poc precises o esbiaixades.

La qualitat analítica d'un laboratori es pot estimar a través d'indicadors com la imprecisió, amb els coeficients de variació, l'error sistemàtic i l'error total analític. Actualment reflectim la qualitat dels nostres resultats a partir de la desviació estàndard de les mesures i dels coeficients de variació.

Donada la semblança en les rutines de laboratori i l'elevat nivell d'automatització, els laboratoris d'anàlisi clínics hospitalaris poden acollir-se a programes de garantia de la qualitat externs, promoguts per Comissions de Qualitat de Societats Científiques. Els laboratoris de recerca, a diferència d'aquests, no podem acollir-nos a aquests sistemes de gestió principalment per la falta d'automatització. Per tant, hem d'implementar un sistema de control de la qualitat analítica de forma interna.

Tenint en compte tot això, la nostra hipòtesi de treball és que:

El coneixement del coeficient de variabilitat relatiu, l'error sistemàtic i l'error total analític de diferents biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, la inflamació, i el perfil fèrric aportarà més informació de qualitat analítica, que el càlcul de la imprecisió a partir de la desviació estàndard i el coeficient de variabilitat.

OBJECTIU PRINCIPAL

Establir el grau de qualitat analítica que presenten diferents biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, la inflamació i el perfil fèrric, en població sana, mitjançant el càlcul del coeficient de variabilitat relatiu, la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític.

Per dur a terme aquest objectiu, necessitem de forma secundària:

- Determinar la distribució dels biomarcadors analitzats a partir de la normalitat, la simetria i la curtosi.
- Determinar el rang de referència dels biomarcadors analitzats a partir dels intervals de confiança.
- Determinar la imprecisió dels biomarcadors analitzats a partir de les mesures de dispersió i del coeficient de variabilitat interindividual i intraindividual.
- Determinar el coeficient de variabilitat relatiu a partir de la variabilitat intraindividual i interindividual.
- Determinar el grau de qualitat analítica en funció del valor del coeficient de variabilitat relatiu.
- Determinar l'error sistemàtic i l'error total analític dels biomarcadors analitzats.
- Determinar el grau de qualitat analític en funció de la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

MATERIAL I MÈTODES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

1.- FASE PREANALÍTICA

1.1.- Disseny de l'estudi

Es tracta d'un estudi observacional transversal en voluntaris sans en el qual es pretén caracteritzar qualitativament, en termes de precisió, diferents biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, la inflamació i el perfil fèrric.

1.2.- Ètica

El protocol d'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus (08-01-31/proj1).

Tots els participants van donar el consentiment informat i autorització per utilitzar les seves dades tant en aquest com en posteriors estudis.

1.3.- Selecció de participants

Amb l'objectiu de minimitzar la influència dels factors estacionals en la presa de mostres, els participants van ser reclutats a l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus, en dues fases: la primera del març al juliol de 2008, i la segona del febrer al juliol de 2009. Els subjectes elegibles van ser homes i dones d'entre 18 i 75 anys, sans, no fumadors i que no prenién cap medicament i/o suplement alimentici. A la taula 2 es detallen els criteris d'exclusió.

Es va realitzar una exploració física per mesurar:

- El pes i la talla sense sabates amb una balança calibrada i un estadiòmetre.
- El perímetre de la cintura es va mesurar al punt mitjà entre l'última costella i la cresta ilíaca al final d'una aspiració normal.
- La pressió arterial va ser mesurada amb un esfigmòmetre automàtic.

Totes les dades obtingudes en l'exploració física van ser recollides per personal degudament entrenat i per duplicat.

Amb el pes i la talla es va obtenir l'Índex de massa corporal mitjançant la fórmula:

$$\text{IMC} = \text{pes (Kg)} / \text{talla (m)}^2$$

Es va fer una extracció de sang a tots els participants mitjançant punció venosa. La sang es va recollir en tubs diferents (EDTA, sèrum, heparina-liti i citrat) per adequar a la tècnica. També es va recollir mostra d'orina.

Es va avaluar l'activitat física com a hàbit de vida saludable, mitjançant el *Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire*, versió espanyola (Elosua, 1994). Els resultats de l'activitat física es van quantificar mitjançant la fórmula de la intensitat total (IT) (González, 2007):

$$\text{IT} = \text{mitjana de tots els ítems del qüestionari (METs Minnesota x minuts/dia pràctica x dies/setmana de pràctica)}$$

La intensitat de l'activitat física reflexa la velocitat a la que es realitza l'activitat, o bé la magnitud de l'esforç necessari per realitzar un exercici o activitat. La intensitat de l'activitat física es va expressar mitjançant els

equivalents metabòlics (MET), on un MET es defineix com el cost energètic d'estar assegut tranquil·lament i, equival a un consum de 1kcal/kg/h (González, 2007).

Posteriorment, l'activitat física dels participants es va classificar en tres categories:

- ≤ 3 METs com baixa intensitat
- de 3 a 6 METs com intensitat moderada (accelera de forma perceptiva la freqüència cardíaca)
- ≥ 6 METs com intensitat elevada (requereix gran esforç, provoca respiració ràpida i un increment elevat de la freqüència cardíaca).

Taula 2. Criteris d'inclusió i exclusió de l'estudi

CRITERIS D'INCLUSIÓ

1. Consentiment informat signat
2. No complir criteris d'exclusió

CRITERIS D'EXCLUSIÓ

1. Nivell de c-LDL > 189 mg/dl
2. Triglicèrids > 350 mg/dl
3. Alcoholisme crònic
4. IMC > 30 kg/m²
5. Història de malaltia cardiovascular
6. Tractament amb fàrmacs
7. Patir *diabetis mellitus*
8. Malaltia renal
9. Patir malalties infeccioses agudes, neoplàsies, insuficiència hepàtica severa, insuficiència respiratòria o endocrines associades
10. Requeriments nutricionals especials
11. Haver participat en un assaig clínic en els últims 3 mesos
12. Incapacitat per seguir a l'estudi
13. Història de malaltia gastrointestinal
14. Síndrome depressiu o idees d'autòlisi
15. Presa de complementos vitamínics
16. Fumadors
17. Patir anèmia (hemoglobina en dones ≤ 12 g/dl i en homes ≤ 14 g/dl)

C-LDL: colesterol baix pes molecular; IMC: índex massa corporal.

1.4.- Processament i conservació de les mostres

Per tal de minimitzar variacions en el processament (figura 12), pretractament (figura 13), emmagatzematge i conservació de les mostres biològiques, aquests processos es van centralitzar al laboratori central del Biobanc-REUS-IISPV.

Els tubs d'EDTA, heparina-liti i citrat es van centrifugar durant 15 minuts a 1700 *xg* i a 4 °C. La fracció plasmàtica es va separar de l'eritrocitària, i la capa leucocitària es va descartar.

La mostra d'orina es va centrifugar a 1900 *xg*, durant 10 minuts a 4 °C.

El tub del sèrum, es va deixar reposar durant 30 minuts a temperatura ambient. Un cop passat el temps de repòs, es va centrifugar a 1700 *xg*, durant 15 minuts a 20 °C.

Als eritròcits se'ls va realitzar dos cicles de rentat amb un tampó fosfat (PBS: 8 g/L NaCl Prolabo-ref. 2781029, 0,2 g/L KCl Panreac-ref. 141494, 2 g/L Na₂HPO₄ Panreac-ref. 131679, 0,15 g/L KH₂PO₄ Panreac-ref. 131509, pH: 7,4) i una posterior centrifugació a 1300 *xg* durant 5 minuts i 4 °C, en cada cicle de rentat.

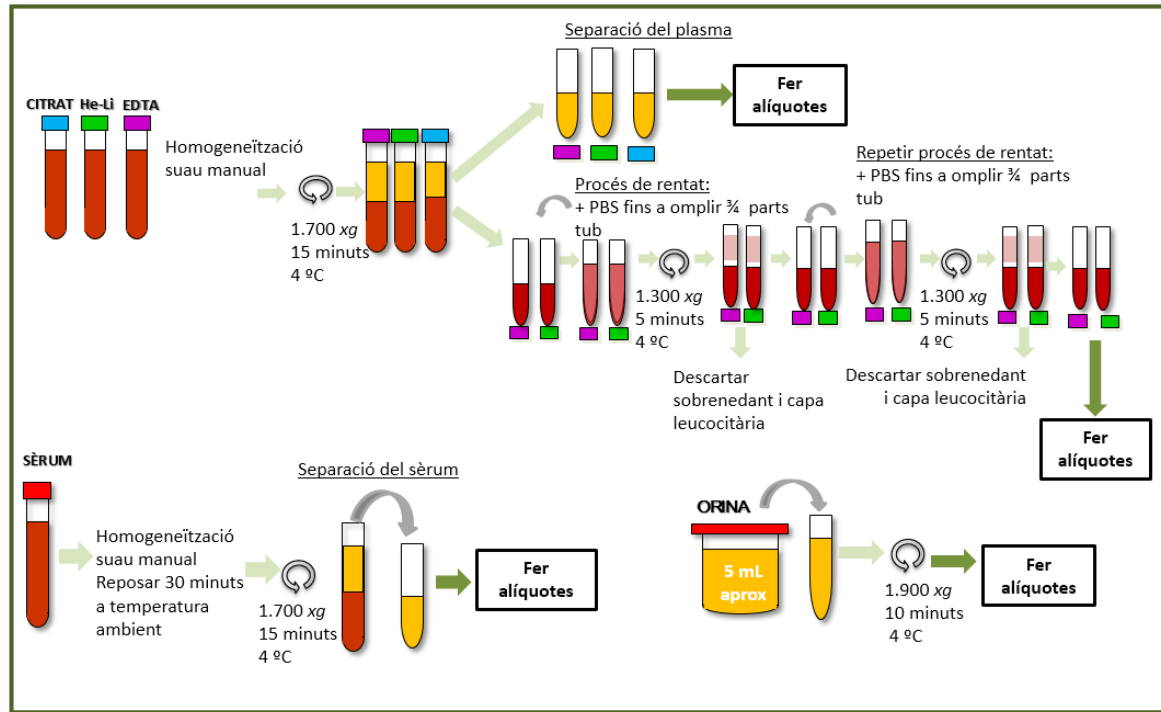


Figura 12. Esquema del processament dels tubs de sang i orina. Als tubs d'EDTA, heparina-liti i citrat se'ls va realitzar una centrifugació per separar el plasma dels eritròcits. La fase leucocitària es va descartar. Als eritròcits se'ls va realitzar dos processos de rentat amb un tampó fosfat. El tub del sèrum es va deixar reposar durant 30 minuts i posteriorment es va centrifugar. L'orina es va traspasar del pot a un tub i aquest es va centrifugar. He-Li: heparina liti; PBS: tampó fosfat. Amb l'objectiu de preservar les mostres de l'oxidació, a l'alíquota de la LDLox i la del 8-isoprostà, es van afegir 10 µL de 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol 5 mg/mL (BHT: Fluka *minimum* 99%-ref. 34750)

Per eliminar les proteïnes de la mostra per a la realització el test ORAC_{TCA}, i del sistema glutatió, es va afegir àcid tricloroacètic al 70% (TCA: Panreac-ref. 131067). Es van deixar reposar durant 20 minuts a 4 °C i es van centrifugar a 850 *xg* durant 5 min, recollint el sobrenedant per a la posterior determinació.

L'alíquota de la glutatió peroxidasa eritrocitària i la catalasa es va diluir 1:20 amb aigua destil·lada freda.

Per l'obtenció de l'alíquota del sistema glutatió eritrocitari, es van diluir 1:20 els eritròcits d'heparina liti amb un tampó fosfat sòdic 10mM (Na₂HPO₄ Panreac-ref.131679, NaH₂PO₄ Panreac-ref.131677) EDTA 1 mM pH:6.25, la qual es va preservar de l'oxidació afegint-li TCA al 70% (Panreac-ref. 131067). Es va deixar en repòs durant 20 minuts a 4 °C i es va centrifugar a 850 *xg* durant 5 minuts i a 4 °C, i es va recollir el sobrenedant per a la posterior determinació.

Les mostres es van conservar a -80 °C als ultracongeladors del Biobanc, fins del dia de la seva determinació. Aquest procés d'ultracongelació preserva les mostres de la formació de cristalls de gel en emmagatzematges de llarga durada.

Material i mètodes

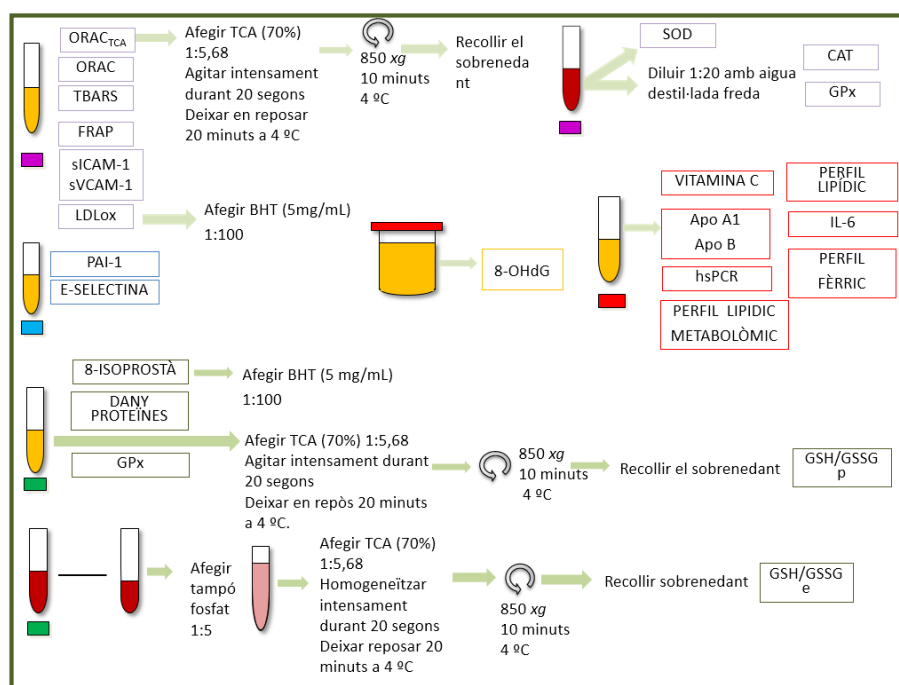


Figura 13. Esquema representatiu de les alíquotes realitzades i els pretractaments necessaris per les posteriors determinacions. Les alíquotes del plasma d'EDTA estan en lila, les del citrat en blau, les d'heparina liti en verd, les del sèrum en vermell i les de l'orina en groc. Per a la GPx i la CAT es va realitzar una dilució 1:20 amb aigua destil·lada freda. Per l'ORAC_{TCA} i els GSH/GSSG es va realitzar una precipitació de proteïnes amb TCA al 70% a una proporció 1:5,68. Es va afegir BHT (5mg/mL) 1:100 pel 8-isoprostà i la LDLox. ORAC: capacitat antioxidant del plasma; ORAC_{TCA}: capacitat antioxidant del plasma desproteïnit; TCA: àcid tricloroacètic; TBARS: substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric; FRAP: capacitat reductora del ferro en plasma; sICAM-1: molècula soluble d'adhesió intracel·lular-1; sVCAM-1: molècula d'adhesió de cèl·lules vasculares-1; LDLox: lipoproteïna baixa densitat oxidada; PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminògen-1; GPx: enzim glutatió peroxidasa; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina; SOD: enzim superòxid dismutasa; CAT: catalasa; Apo A1: apolipoproteïna A1; Apo B: apolipoproteïna B; hsPCR: proteïna-C- reactiva d'alta sensibilitat; IL-6: interleucina 6; GSHe: glutatió reduït eritrocitari; GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari; GSHp: glutatió reduït plasmàtic; GSSGp: glutatió oxidat plasmàtic.

1.5.- Estandardització de metodologies: elaboració dels procediments normalitzats de treball (PNT)

L'estandardització és el fenomen de crear i utilitzar estàndards o normes que defineixen certes característiques, qualitats o paràmetres que cal que compleixin els productes, o les activitats científiques, industrials o econòmiques. Quan aquests productes o activitats compleixen aquestes característiques especificades es pot dir que són conformes o que compleixen aquest estàndard.

Per tal de garantir l'homogeneïtat dels processos emprats en l'anàlisi al laboratori dels biomarcadors estudiats, es van elaborar tants Procediments Normalitzats de Treball (PNT) com biomarcadors s'han analitzat. A més, es van elaborar tants PNT com solucions/dissolucions/reactius o tampons es van necessitar en l'anàlisi dels biomarcadors, i tants PNT com equipaments es van fer servir, des de balances o banys maria fins a les campanes d'extracció per a la gestió dels residus.

Aquests PNT segueixen una estructura bàsica comuna que inclou els diferents apartats:

- Objectiu del document: inclou quin contingut es pot trobar en cada PNT.
- Principi d'operació: inclou el fonament del mètode analític que es vol emprar, així com les referències bibliogràfiques.
- Reactius necessaris: inclou tots els reactius necessaris per a la realització de la tècnica analítica, així com el codi del PNT per

preparar-los. També inclou el tipus de mostra necessària per a la realització de la tècnica.

- **Equipament:** inclou tot l'equipament necessari per a la realització de la tècnica, amb el codi PNT que conté les instruccions d'ús.
- **Procediment:** és la part que inclou pas a pas com s'ha de realitzar la tècnica analítica.
- **Seguretat:** aquest apartat inclou les mesures de seguretat que s'han de seguir com a mesures de protecció individual.
- **Control de qualitat:** aquí s'inclouen quins són els indicadors que la tècnica s'està realitzant sota control de qualitat, com per exemple, si es fa servir una recta patró, quins són els valors que han de donar, o si s'està tot emprant un sèrum control, quin és el valor que ha de donar.
- **Condicions d'emmagatzematge:** en aquest apartat venen definides accions com les de l'eliminació de residus.
- **Problemes i millores:** quan un operari troba alguna anomalia en algun PNT o una millora, ho anota dins aquest apartat, amb la finalitat que es revisi i s'avaluï la idoneïtat de modificar el document i es posi en comú amb tot el personal.

1.6.- CONTROL D'EQUIPAMENT

Per tal de proporcionar confiança en la validesa dels resultats en les mesures de laboratori, els equips de mesura han de calibrar-se o verificar-se, o ambdues coses, amb patrons de mesura traçables, i amb una periodicitat establerta.

El control d'equipament es va realitzar a partir d'uns plans de manteniment i calibratge, revisats amb una periodicitat semestral.

El manteniment dels equipaments que va des de la neteja fins al canvi de fonts de llum dels equipaments de lectura era realitzat pel propi personal de laboratori.

El pla de calibratge té com a finalitat que tot l'equipament considerat crític per a la recerca, és a dir, tot aquell equipament indispensable per a la realització de les nostres determinacions, sigui verificat de forma periòdica, per tal d'assegurar-nos que les mesures que obtenim són fiables. Aquest pla es va dividir en dues parts, una que es va realitzar de forma externa per personal tècnic d'empreses acreditades per a tal fi, o bé, pel personal tècnic de l'empresa fabricant, i una d'interna, realitzada per personal del laboratori.

De manera externa es van verificar els equips de lectura, com els espectrofotòmetres, les balances i els patrons emprats per les verificacions internes, com la sonda de temperatura o les peses per les balances. Amb la verificació externa es van obtenir també tots els certificats de calibratge dels patrons utilitzats en les verificacions dels equips.

De forma interna, i amb més periodicitat que l'externa, es van verificar les balances, les micropipetes, el pH-metre i els equips de mesura (mitjançant l'ús de controls interns de qualitat, com rectes patró).

2. FASE ANALÍTICA

Els biomarcadors estudiats es van analitzar amb la col·laboració de diferents laboratoris: el Laboratori de l'Hospital Sant Joan de Reus, el Laboratori de l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, el Centre de Ciències Òmiques del Centre de Nutrició i Salut (CTNS) de Reus, i, els Laboratoris de Recerca de les Unitats de Lípids i Arteriosclerosi i Farmacobiologia Cel·lular, de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus.

2.1.- Biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu

S'han analitzat 12 biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, que podem trobar de forma resumida a la taula 3.

2.1.1.- Mesura dels sistemes de defensa antioxidant enzimàtics (CAT, SOD, GPx) i no enzimàtics (sistema glutatió i Vitamina C)

2.1.1.1.- Catalasa (CAT)

L'activitat enzimàtica de la catalasa es va quantificar per duplicat, tot seguint el protocol de treball PNT-PG0709-FAR.OX-T006, basat en el mètode de Cohen i col·laboradors (Cohen, 1970).

Aquest mètode mesura de forma indirecta l'activitat enzimàtica de la catalasa a partir de la descomposició del peròxid d'hidrogen en aigua i oxigen per acció de la catalasa present a la mostra.

En una cubeta de quars es van barrejar 2,98 ml d'una solució tampó fosfat potàssic 100 mM pH: 7,5 (KH_2PO_4 Panreac-ref. 121509.1210 i K_2HPO_4 Panreac-ref. 141512.1210) amb peròxid d'hidrogen 17% (H_2O_2 Merck-ref. 8599) amb 20 μl de mostra diluïda 1:5 amb aigua destil·lada. Es mesura la desaparició del peròxid d'hidrogen a 240 nm, durant un minut, a intervals de 30 segons, en un espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 2.

En base a això, es va calcular el decrement/minut i els resultats es van expressar en mmol/min/g Hb, fent referència als mmols d' H_2O_2 transformats.

2.1.1.2.-Superòxid dismutasa (SOD)

L'activitat enzimàtica de la superòxid dismutasa es va mesurar un sol cop, seguint el protocol normalitzat de treball PNT-PG0709-FAR.OX-T007, basat en el mètode de Misra i Fridovic (Misra, 1972).

Aquest mètode es basa en la determinació espectrofotomètrica d'un adrenocrom, producte de l'oxidació de l'epinefrina, en una corba amb 5 dilucions diferents de la mostra. La SOD elimina els superòxids i els transforma en peròxid d'hidrogen i oxigen, de manera que evita la formació de l'adenocrom.

Abans de realitzar la determinació es va tractar la mostra per extreure la SOD dels eritròcits, per això, es va congelar i descongelar dues vegades, per tal d'afavorir el trencament de les membranes dels eritròcits. Un cop descongelada per segona vegada, es va afegir aigua destil·lada freda i es va homogeneïtzar suaument. A aquesta barreja es va afegir etanol/cloroform (6,25:3,75), i es va agitar enèrgicament durant 2

Material i mètodes

minuts. Es va centrifugar durant 5 minuts a 1900 $\times g$ a 4 °C. Es va separar el sobrenedant i es va guardar en fred per a la seva posterior anàlisi.

Per a la determinació de l'activitat de la SOD es necessita una solució d'epinefrina 6 mM (Sigma-ref. E4375) en HCl 1 mM (Panreac-ref. 131.020), conservada a 4 °C per evitar la seva oxidació.

En cada mostra es va avaluar la corba d'autooxidació de l'epinefrina, de manera que en una cubeta es van barrejar 2,5 ml de tampó carbonat Na_2CO_3 (Merck-ref. 6392)- NaHCO_3 (Probus-ref.2030) 50 mM pH: 10,2 més EDTA 0,1 mM (Titriplex®III Merck-ref. 8418.0100) amb 300 μl d'aigua bidestil·lada i 200 μl d'epinefrina 6 mM (Sigma-ref. E-4375) en HCl 1mM (Panreac-ref. 131.020). A les cubetes corresponents a les dilucions de la mostra, es van substituir els 300 μl d'aigua bidestil·lada per 300 μl de la dilució corresponent (1:100, 1:50, 1:25, 3:50, 2:25). La lectura es realitza cada 40 segons durant un període de 15 minuts a 30°C en un espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 2 a 480 nm.

Per al càlcul de la I_{50} es va fer una regressió lineal i logarítmica de la representació del percentatge d'activitat respecte als mg Hb/mL eritròcits de cada mostra. Per conèixer quina concentració va donar aquesta inhibició del 50%, es va extrapolar el 50% d'activitat a la regressió que millor es va a justar.

Els resultats es van expressar en U/g Hb, on una U (unitat) és la quantitat de proteïna que inhibeix en un 50% la transformació de l'epinefrina en adenocrom.

Taula 3. Característiques tecnicoanalítiques dels biomarcadors analitzats relacionats amb l'estrès oxidatiu

Biomarcador	Principi mètode	Equip	Ubicació
Mesura dels sistemes de defensa antioxidant, enzimàtics o no			
Enzimàtics	CAT	Valoració, en eritròcits provinents de sang amb EDTA, de l'activitat enzimàtica de la CAT de la mostra a partir de la degradació del peròxid d'hidrogen	Perkin Elmer Lambda 2 Laboratori Farmacologia-FMCS
	SOD	Valoració, en eritròcits provinents de sang amb EDTA, de l'activitat enzimàtica de la SOD de la mostra a partir de l'oxidació de l'epinefrina en presència de superòxids	Perkin Elmer Lambda 2 Laboratori Farmacologia-FMCS
	GPx	Valoració de la desaparició del NADPH o NADP ⁺ en eritròcits provinents de sang amb EDTA i plasma provinent d'heparina-liti, a partir de la reacció amb t-butil hidroperòxid	Perkin Elmer Lambda 2 Laboratori Farmacologia-FMCS
No enzimàtics	Sistema glutatió	Valoració del GSH i GSSG present a eritròcits i plasma provinent d'heparina-liti, a partir de la reacció amb l'O-phtalaldehid a pH 8 i 12, respectivament	Perkin Elmer LS50B Laboratori Farmacologia-FMCS
	Vitamina C	Valoració de la presència d'àcid ascòrbic en sèrum, a partir de la reducció de Fe ³⁺ a Fe ²⁺	BioWhittaker Kinetik-QCL Laboratori Farmacologia-FMCS
Mesura de les conseqüències de l'estrès oxidatiu			
Dany oxidatiu a lípids	TBARS	Valoració de la susceptibilitat del plasma, provinent de sang amb EDTA, de reaccionar davant de les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric	Perkin Elmer LS50B Laboratori Farmacologia-FMCS
	8-Isoprostà	Valoració, en plasma provinent d'heparina-liti, de la presència de fosfolípids oxidats a la mostra a partir d'un immunoassaig enzimàtic competitiu	BioWhittaker Kinetik-QCL Laboratori Farmacologia-FMCS
	LDL oxidada	Valoració, en plasma provinent de sang amb EDTA, de la presència de LDL oxidada a partir d'un immunoassaig enzimàtic tipus <i>Sandwich</i>	BioWhittaker Kinetik-QCL Laboratori Farmacologia-FMCS
Dany oxidatiu a proteïnes	Carbonilació de proteïnes	Valoració, en plasma provinent d'heparina-liti, de la presència de grups carbonils als residus aminoacídics de les proteïnes	BioWhittaker Kinetik-QCL Laboratori Farmacologia-FMCS
Dany oxidatiu al DNA	8-OHdG	Valoració de la presència d'adductes de l'ADN en orina, a partir d'un immunoassaig enzimàtic competitiu	BioWhittaker Kinetik-QCL Laboratori Farmacologia-FMCS
Mesura de la capacitat antioxidant del plasma			
ORAC i ORAC _{TCA}	ORAC: Valoració de la capacitat del plasma provinent d'EDTA per absorbir radicals peroxils a partir de la disminució de la fluoresceïna sòdica ORAC _{TCA} : Valoració de la capacitat del plasma provinent d'EDTA, sense proteïnes, per absorbir radicals peroxils a partir de la disminució de la fluoresceïna sòdica	Fluoroscann Ascent Laboratori Farmacologia-FMCS	Laboratori Farmacologia-FMCS
FRAP	Determinació de la capacitat antioxidant del plasma provinent d'EDTA per reduir el ferro del 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a pH baix	Perkin Elmer Lambda 2 Laboratori Farmacologia-FMCS	Laboratori Farmacologia-FMCS

CAT: catalasa; SOD: superòxid dismutasa; GPx: glutatió peroxidasa; TBARS: substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina; ORAC: de l'anglès *oxygen radical absorption capacity*; ORAC_{TCA}: de l'anglès *oxygen radical absorption capacity non protein content*; FRAP: de l'anglès *ferric reducing ability of plasma*; GSH: glutatió reduït; GSSG: glutatió oxidat; FMCS: Facultat Medicina i Ciències de la Salut.

2.1.1.3.- Glutatió peroxidasa (GPx)

L'activitat enzimàtica de la glutatió peroxidasa tant en eritròcits com en plasma es va determinar per duplicat, mitjançant el protocol normalitzat de treball PNT-PG0709-FAR.OX-T010, basat en el mètode descrit per Wheeler i col·laboradors (Wheeler, 1990).

Aquest mètode es basa en la valoració de la desaparició del NADPH o NADP⁺. La glutatió peroxidasa utilitza el glutatió reduït (GSH) per catalitzar la reducció del peròxid d'hidrogen i dels hidroperòxids tot formant glutatió oxidat (GSSG). La seva eficàcia va lligada a la glutatió reductasa (GR), la qual necessita el NADPH per reduir el GSSG.

Prèviament a l'anàlisi, les mostres van ser diluïdes amb aigua destil·lada de manera que l'hemolitzat eritrocitari va ser diluït 1:20 i el plasma 1:5.

A 24 µL de mostra es van afegir 135 µL de tampó fosfat potàssic (KH₂PO₄ Panreac-ref. 131509-K₂HPO₄ Probus-ref. 1461) 100 mM pH: 7,0 EDTA 1 mM (Titriplex®III Merck-ref. 8418.0100) amb NADPH 2,25 mM (Sigma-ref. N7505), 0,3 mL glutatió reductasa 25U/0,25 mL (*glutathione reductase from bakers yeast* Sigma-ref. G3664-500UN) i 0,6 mL GSH 11,5 g/L (*glutathione reduced minimum 99%* Sigma-ref. G4251). Es va deixar incubar durant 5 minuts a 37 °C. Es van afegir 18 µl de t-BuOOH 15 mM (Sigma-ref. 458139). La lectura es va realitzar cada 60 segons durant 5 minuts a 340nm amb un autoanalitzador COBAS Mira.

L'activitat enzimàtica es va determinar a partir de la desaparició del NADPH del medi. Els resultats es van expressar en µmol/min/g Hb en el cas de l'hemolitzat eritrocitària, i en µmol/ min/mg proteïna en el cas del plasma.

2.1.1.4.- Sistema glutatió: glutatió reduït (GSH) i glutatió oxidat (GSSG)

La quantificació del glutatió reduït (GSH) i el glutatió oxidat (GSSG) es va realitzar per duplicat seguint el PNT-PG0709-FAR.OX-T008, basat en el mètode de Hissin-Hilf (Hissin, 1976).

Aquest mètode es basa en la reacció del sistema glutatió amb l'O-phtalaldehid (OPT Merck-ref. 11452). El GSH reacciona amb aquest a un pH de 8. La mostra es va diluir 1:10 amb un tampó fosfat sòdic 100 mM (Na_2HPO_4 Panreac-ref. 131679- NaH_2PO_4 Panreac-ref. 131677) pH: 8 i EDTA 5 mM (Titriplex[®]III Merck-ref. 8418.0100). Posteriorment es va fer una segona dilució 1:20 de la mostra en tampó fosfat sòdic a la cubeta de reacció, a la qual es van afegir 100 μl de OPT 1mg/mL, i es va deixar incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.

El glutatió oxidat també reacciona amb l'OPT, però en aquest cas a un pH de 12. Tenint en compte que el GSH s'oxida a pH superior a 8, la mostra es va incubar durant 25 minuts a temperatura ambient, amb N-etil-maleïmida 5mg/mL (NEM Merck-ref. 1308), per tal d'evitar aquesta oxidació. Passat aquest temps, la mostra es va diluir 1:10 amb un tampó NaOH 0,1N (Panreac-ref. 131687). A la cubeta de reacció el GSSG es va diluir de nou, a 1:20 amb el tampó NaOH 0,1N. Posteriorment es van afegir 100 μl de OPT 1mg/mL i es va deixar incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.

La fluorescència tant del GSH com del GSSG de la mostra es va mesurar amb un espectrofluorímetre Perkin Elmer LS50B, a longitud d'ona d'excitació de 350 nm i d'emissió 420 nm.

Per calcular la quantitat de glutatió oxidat i reduït es va utilitzar una recta patró (GSH Sigma-ref. G-4251 i GSSG Sigma-ref. G-4501), ambdues a concentració de 0,01 a 1,5 µg GSH o GSSG/100 µL).

Els resultats es van expressar en µmol/g Hb i nmol/ml plasma.

2.1.1.5.- Vitamina C

La vitamina C es va mesurar tot emprant un test comercial d'àcid ascòrbic (*FRASC Assay test* ref. K6701 Biovision Inc. San Francisco Bay Area, California).

Amb aquesta tècnica es quantifica la vitamina C a partir de la reducció del Fe³⁺ a Fe²⁺ a causa de la presència d'antioxidants de la mostra.

Aquesta tècnica es va realitzar seguint dos processos paral·lels. Un en què a 100 µL de mostra es van afegir 10 µL de tinció d'àcid ascòrbic, i l'altre, en què a 100 µL de mostra es van afegir 10 µL d'ascorbat oxidasa. Ambdós es van deixar incubar 15 minuts a temperatura ambient per tal que l'ascorbat oxidasa eliminés tot l'ascorbat de la mostra. Posteriorment es van afegir 100 µL de la solució de clorur fèrric i es realitza la lectura espectrofotomètrica de forma immediata a 550 nm amb un lector de plaques (Biowhittaker Kinetic-QCL).

Per tal de poder quantificar les mostres, les absorbàncies es van referenciar amb una recta patró d'àcid ascòrbic, de concentració coneguda (de 0,01 a 10 nmol àcid ascòrbic/pouet).

Els resultats es van expressar en nmol àcid ascòrbic / mL sèrum.

2.1.2.- Mesura de les conseqüències de l'estrès oxidatiu

2.1.2.1.- Dany oxidatiu a lípids

2.1.2.1.1.- Mesura de les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS)

La quantificació dels TBARS es va realitzar per duplicat seguint el PNT-PG0709-FAR.OX-T009 basat en el mètode de Buege i Aust SD (Buege, 1978), amb les posteriors modificacions per fluorescència de Richard (Richard, 1992).

Aquesta tècnica mesura els productes de degradació d'hidroperòxids lipídics.

A 1 mL de mostra, diluïda prèviament 1:50 amb sèrum fisiològic, se li va afegir 2 mL d'una solució TCA-TBA-HCl: àcid tricloracètic 15% (Panreac-ref. 131067), àcid tiobarbitúric al 0.375% (Merck-ref. 8180) i àcid clorhídric 0,25N (Probus-ref. 17750 35%). Aquesta barreja es va deixar 15 minuts en ebullició. Després la mostra es va refredar sobre gel, per parar la reacció. Posteriorment, es va centrifugar a 1900 $\times g$ durant 10 minuts a 4 °C i el sobrenedant es va recollir amb compte de no agafar el pellet format. La fluorescència van ser mesurada amb un espectrofluorímetre (Perkin Elmer LS50B) a una longitud d'ona d'excitació de 515 nm i d'emissió de 548 nm.

Es va utilitzar una recta patró de bis-dietilacetat malondehid (Sigma-ref. T9889) de concentració 0,041-0,205 μM , la qual va servir per determinar la concentració de la mostra.

Els resultats es van expressar en nmols/mL plasma.

2.1.2.1.2.- 8-isoprostà

El 8-isoprostà va ser quantificat per duplicat seguint el PNT-PG0709-FAR.OX-T011 basat en les instruccions d'un test comercial de la casa *Cayman* (Caymann Chemicals Company-ref. 516351, Ann Arbor, Michigan, USA).

Es tracta d'un immunoassaig enzimàtic competitiu, en què el 8-isoprostà present a la mostra competeix amb el 8-isoprostà-acetilcolinesterasa (AChE) conjugat (*8-isoprostane tracer*) per un nombre limitat de llocs d'unió d'antisèrum de conill de 8-isoprostà. La intensitat del color obtingut, mesurat espectrofotomètricament a una longitud d'ona de 405 nm, és proporcional a la quantitat de *8-isoprostane tracer* lligat al pou, que és inversament proporcional a la quantitat de 8-isoprostà lliure present en el pou durant la incubació (8-isoprostà de la mostra).

En primer lloc, 50 µL de mostra, calibradors i controls van ser incubats a la placa durant 18 hores. Posteriorment, es van realitzar 4 rentats a la placa de forma manual amb la solució de rentat. Posteriorment es van afegir, a les fosques, 200 µL d'*Ellman's reagent*. Finalment, la quantificació del 8-isoprostà es va realitzar a 405 nm a un espectrofotòmetre de plaques (BioWhittaker Kinetic- QCL).

Els resultats es van expressar en pg de 8-isoprostà / mL plasma.

2.1.2.1.3.- LDL oxidada

La quantificació de la LDL oxidada es va realitzar en placa, per duplicat, a partir d'un test ELISA comercial de la casa Mercodia (Mercodia-ref. 10-1158-01, Uppsala, Sweden).

Es tracta d'un immunoassaig tipus *sandwich* en què hi ha un anticòs específic per detectar la LDL oxidada.

Es van afegir 25 μL de mostra, control o calibrador a la placa. Un cop incorporats es va afegir l'anticòs per LDLox conjugat amb biotina. A continuació es va afegir 100 μL de la solució d'avidina-HRP, i després d'una incubació de dues hores, es van incorporar 200 μL de la solució de substrat de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). D'aquesta manera només les mostres que contenen LDL oxidada van mostrar un canvi de color mesurable espectrofotomètricament a una longitud d'ona de 450 nm mitjançant un lector de plaques Biowhittaker Kinetic-QCL.

La concentració de LDL oxidada es va determinar mitjançant una recta patró d'1.4-19 U/L de plasma.

Els resultats es van expressar en U/L de plasma.

2.1.2.2.- Dany oxidatiu a proteïnes

2.1.2.2.1.- Carbonilació de proteïnes (DP)

La presència de grups carbonil es va mesurar per triplicat seguint el PNT-PG0709-FAR.OX-T014 basat en el mètode descrit per Levine i col·laboradors (Levine, 1990), amb les variacions introduïdes per Coto-Montes i Hardeland (Coto-Montes, 1999).

Material i mètodes

La introducció de grups carbonil en els residus aminoacídics de les proteïnes és un indicador de modificació oxidativa. Aquesta tècnica es basa en la quantificació de l'oxidació de proteïnes catalitzades per metalls.

A la mostra, diluïda 1:50 amb un tampó fosfat 10 mM pH: 2,3 (NaH₂PO₄ Panreac-ref. 121677 - Na₂HPO₄ Panreac-ref. 131679) amb àcid trifluoroacètic (Aldrich-ref. 302031), es van afegir els inhibidors de proteases en les següents quantitats: 1,7 µL Leupeptina 0,234 mM (Sigma-ref. L2023), 0,9 µL Aprotinina 0,2 mg/mL (Sigma-ref. A6103) i, 1,5 µL Pepstatina A 0,2 mg/mL (Sigma-ref. P4265).

Aquesta tècnica es va realitzar en dos grups, "control" i "experimental".

Als "controls" es van afegir 50 µL de HCl 2M (Probus-ref. 17750) i als experimentals, 50 µL de 2,4-dinitrophenylhidrazina 0,2% (DNPH Aldrich-ref. 19930) preparat en HCl 2M. Es va deixar incubar durant 1 hora amb agitació. Un cop passat aquest temps, es van afegir 100 µL de TCA 20% (Panreac-ref. 131067) i es van centrifugar a 1700 *xg* durant 3 minuts. Un cop centrifugats, es va descartar el sobrenedant i es van afegir 200 µL d'etanol-etilacetat 1:1 (Panreac-ref. 121086, Panreac-ref. 161318). Aquest procés de rentat i centrifugació amb etanol-etilacetat es va repetir 3 vegades per tal d'eliminar el DNPH. Per dissoldre el pellet, finalment, es van afegir 250 µL de guanidina clorhidrat 6M (Merck-ref. 104220) i es van deixar incubar a 37 °C durant 15 minuts. La quantificació de grups carbonil es va realitzar espectrofotomètricament a 366 nm mitjançant la diferència del valor "control" al valor "experimental" tot emprant un coeficient d'absorció de 22.000 M⁻¹ cm⁻¹, en un espectrofotòmetre de plaques (Biowhittaker Kinetic-QCL).

Els resultats es van expressar en nmol /mg proteïna.

El mateix dia, i amb la finalitat de poder referenciar els resultats amb el contingut proteic de cada mostra, es va realitzar la quantificació proteica segons Bradford (Bradford, 1976). La quantificació de proteïnes es va realitzar per duplicat seguint el PNT-PG0709-FAR-OX-T015.

Aquest mètode es basa en la quantificació de proteïnes mitjançant la formació d'un complex colorimètric espectrofotomètricament quantificable. El colorant hidrofòbic (blau de Coomassie G-250) quan es troba en un entorn hidrofòbic com és el cas de l'interior de les proteïnes, canvia de color marró a una tonalitat blavosa fàcilment mesurable.

10 µL de plasma es van diluir 1:100 amb aigua destil·lada. D'aquests es van agafar 50 µL als quals se'ls va afegir 1,5 mL de reactiu de Bradford. Es va deixar incubar durant 5 minuts i es va realitzar la lectura a 595 nm en un lector de plaques (Biowhittaker Kinetic-QCL).

Per obtenir les concentracions de proteïnes de la mostra, s'utilitza una recta patró d'albumina (QCA-ref. 999523) de concentració entre 0.125-1 mg proteïna /mL solució.

Els resultats es van expressar en g proteïna/ 100mL sang.

2.1.2.3.- Dany oxidatiu a l'ADN

2.1.2.3.1.- 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)

La presència de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina es va mesurar per duplicat, seguint el mètode descrit per Yin (Yin, 1995), tot emprant un test

Material i mètodes

comercial per a orina (New 8-OHdG check ref. IM-KOGNW 050915E, *Japan Insitute for the Control of Aging, Shizouka, Japan*).

Es tracta d'un immunoassaig enzimàtic competitiu, en que es basa l'anticòs monoclonal (N45.1), el qual és altament específic pel dany a l'ADN ja que no presenta reactivitat creuada amb els productes de l'oxidació del RNA.

A cada pouet de la placa es van posar 50 μ L de mostra o estàndard. Posteriorment es van afegir 50 μ L d'anticòs primari i es van homogeneïtzar i tapar amb film adhesiu durant 1 hora a 37 °C (Incubador *Denley we warm 1*). Es van afegir 250 μ L de solució de rentat a cada pouet i de forma enèrgica i per inversió, es va eixugar la placa. Aquest rentat es va repetir 3 vegades. Es va afegir l'anticòs secundari i es va deixar incubar durant 1 hora a 37 °C (Incubador *Denley we warm 1*). Al final de la incubació, es van repetir els 3 rentats amb la solució de rentat. Es van afegir 100 μ L de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina i es va deixar incubar a les fosques a temperatura ambient durant 15 minuts. Finalment, es van afegir 100 μ L de la solució de parada. La mesura de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina es va realitzar a 450 nm amb un lector de plaques Biowhittaker Kinetic-QCL.

Per tal de poder quantificar les mostres, les absorbàncies es van referenciar amb una recta patró de 8-OHdG de concentració coneguda (0,5-200 ng 8-OHdG /mL).

Els resultats es van expressar en ng/mg creatinina.

2.1.1.4.- Mesura de la capacitat antioxidant del plasma

2.1.1.4.1.- ORAC i ORAC_{TCA}

El test ORAC (de l'anglès *oxygen radical absorption capacity*) i l'ORAC_{TCA} es va realitzar per duplicat, tot seguint el protocol de treball PNT-PG0709-FAR.OX-T012 basat en la metodologia descrita per Cao i col·laboradors (Cao, 1993), amb les posteriors modificacions fluorimètriques descrites per Ou i col·laboradors (Ou, 2001).

Aquest mètode quantifica la capacitat antioxidant de la mostra per atrapar radicals peròxids (ROO·) formats per a la inducció del 2,2'- azobis (2-amidinopropà) dihidroclorur (AAPH, Aldrich-ref. 44091), un potent generador de radicals lliures, a una temperatura de 37 °C. El test ORAC_{TCA} és la quantificació de la capacitat antioxidant del plasma no proteic.

Per poder realitzar aquesta tècnica, el plasma es va diluir 1:50 en tampó fosfat potàssic 75 mM pH:7.4 (PO₄H₂K Panreac-ref. 121509 - PO₄HK Panreac-ref. 141512).

A 20 µL de mostra o punt de recta patró de Trolox (àcid carboxílic 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromà Aldrich-ref. 23881), es van afegir a la placa i a les fosques, 270 µL de fluoresceïna 48 nM (Aldrich-ref. 16630) en tampó fosfat potàssic 75 mM pH:7,4. La fluorescència inicial es va mesurar espectrofluorimètricament a una longitud d'ona d'excitació de 485 nm i d'emissió de 538 nm amb un espectrofluorímetre de plaques (Fluoroskan Ascent, Labsystems).

Posteriorment, es van afegir 10 µL d'AAPH 0,384 M (2,2'-Azo-bis(2-amidinopropano) dihidroclorur, Aldrich-ref. 44091) en tampó fosfat

potàssic 75 mM pH: 7,4. Es va realitzar la segona lectura, durant 120 minuts, en les mateixes condicions de longitud d'ona descrites anteriorment. Al mateix temps es va mesurar una recta patró de trolox (àcid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílic, Sigma-ref.23,881-3) de 12,5-100 μ M, que va ser utilitzada per referenciar els resultats, els quals es van expressar en mmols de Trolox/ mL de plasma.

2.1.1.4.2.- Capacitat plasmàtica per reduir el ferro (FRAP)

La quantificació de *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)*, es va realitzar per duplicat, seguint el protocol de treball PNT-PG0709-FAR.OX-T13, basat en el mètode descrit per Benzie i Strain (Benzie, 1996).

Aquest assaig, mesura la capacitat antioxidant del plasma per reduir el ferro del 2,4,6-tripiridil-s-triazina(TPTZ) a pH baix, i produeix un compost blau, quantificable espectrofotomètricament.

Per tal de poder realitzar aquesta determinació, les mostres plasmàtiques es van diluir 1:2 amb aigua destil·lada.

A 50 μ L de mostra o recta patró, es va afegir 1 mL de reactiu FRAP (100 mL de tampó acetat 0,3 M (acetat sòdic trihidratat Fluka-ref. 71188 en àcid acètic glacial Fluka-ref. 45726), 10 mL de TPTZ 10 mM (2,4,6-tripiridil-s-triazina Fluka-ref. 93285 en HCl 40 mM (Panreac-ref. 131020)) i 10 mL de clorur fèrric hexahidratat 20 mM (Fluka-ref. 44944), incubat a 37 °C. Es va deixar incubar 5 minuts a temperatura ambient. L'absorbància es va mesurar a 593 nm amb un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2).

La concentració de les mostres es va referenciar amb una recta patró de Trolox de 0,05 a 1 mM .

Els valors de FRAP es van expressar en mmol de TE /mL plasma.

2.1.2.- Biomarcadors relacionats amb la inflamació

A la taula 4 podem trobar els biomarcadors relacionats amb la inflamació que van ser analitzats.

2.1.2.1.- Biomarcadors del perfil lipídic

L'estudi del perfil lipídic es va realitzar al Laboratori de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus amb un analitzador Beckman Coulter SYNCHRON LX20 CX®.

Dins del que anomenem perfil lipídic trobem inclosos la mesura del colesterol total, els triglicèrids i el colesterol HDL.

El sistema SYNCHRON LX20 CX® dispensa de forma automàtica els volums apropiats de mostra i reactius, i la longitud d'ona per a cada tècnica, i es realitzen totes a la vegada.

2.1.2.1.1.- Colesterol total

La quantificació del colesterol total es va realitzar per duplicat, mitjançant una reacció a punt final (CHOL Colesterol-ref. 467825 Beckman Coulter).

El sistema SYNCHRON LX20 CX® va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:100.

Material i mètodes

Aquesta metodologia es basa en la hidròlisi dels èsters de colesterol a colesterol lliure i àcids grassos per l'acció de la colesterol esterasa. El colesterol lliure es va oxidar a colestè-3-ona i peròxid d'hidrogen per colesterol oxidasa. La peroxidasa catalitza la reacció del peròxid d'hidrogen amb el 4-aminoantipirina i fenol i produeix un producte de quinoniemina de color, mesurable a 520 nm. La quantitat de colesterol present a la mostra és directament proporcional al compost acolorit format.

Els resultats es van expressar en mmols/L.

Taula 4. Característiques tecnicoanalítiques dels biomarcadors analitzats relacionats amb la inflamació

Biomarcador	Principi mètode	Equip	Ubicació
Biomarcadors del perfil lipídic			
Colesterol total	Determinació quantitativa en sèrum del contingut en colesterol total de la mostra a partir d'una tècnica espectrofotomètrica automatitzada de Beckman Coulter, en la qual la colesterol esterasa, colesterol oxidasa i peroxidasa hidrolitzen el colesterol a àcids grassos lliures, èsters de colesterol i àcids grassos, i es forma un compost acolorit mesurable espectrofotomètricament	Beckman Coulter LX20	Laboratori HUSJ
Triglicèrids	Determinació quantitativa en sèrum del contingut en triglicèrids de la mostra a partir d'una tècnica espectrofotomètrica automatitzada de Beckman Coulter, en la qual els triglicèrids de la mostra són hidrolitzats a glicerol i àcids grassos lliures per l'acció de la lipasa i es forma un compost acolorit mesurable espectrofotomètricament	Beckman Coulter LX20	Laboratori HUSJ
Colesterol HDL	Determinació quantitativa en sèrum del contingut en triglicèrids de la mostra a partir d'una tècnica espectrofotomètrica automatitzada de Beckman Coulter. El mètode depèn d'un detergent que solubilitza les partícules de lipoproteïnes HDL i allibera el colesterol HDL perquè reaccioni amb la colesterol esterasa i la colesterol oxidasa en presència de cromògens per produir un compost acolorit, mesurable espectrofotomètricament	Beckman Coulter LX20	Laboratori HUSJ
Apo A1	Determinació quantitativa en sèrum de l'apolipoproteïna A1 per immunoturbidimetria a partir de la unió amb un anticòs específic i la formació d'un complex insoluble antígen-anticòs mesurable espectrofotomètricament	Beckman Coulter Lxi 725	Laboratori HUSJ
Apo B	Determinació quantitativa en sèrum de l'apolipoproteïna B per immunoturbidimetria a partir de la unió amb un anticòs específic i la formació d'un complex insoluble antígen-anticòs mesurable espectrofotomètricament	Beckman Coulter Lxi 725	Laboratori HUSJ
Biomarcadors d'inflamació			
hsCRP	Determinació quantitativa en sèrum de la proteïna-C-reactiva mitjançant un assaig d'immunoturbidimetria amb partícules pròximes a l'infraroig, on un anticòs específic s'uneix a la proteïna-C-reactiva de la mostra, tot formant un complex tèrbol quantificable espectrofotomètricament	Beckman Coulter Lxi 725	Laboratori HUSJ
IL-6	Determinació quantitativa en sèrum de la IL-6 mitjançant un immunoassaig de quimioluminescència de partícules paramagnètiques, on per l'acció d'un anticòs específic anti-IL-6 s'uneix a la IL-6 de la mostra, tot causant un canvi de llum, detectable amb un luminòmetre	Beckman Coulter Lxi 725	Laboratori HUSJ
Biomarcadors de disfunció endotelial			
e-selectina	Determinació quantitativa en sèrum de la proteïna-C-reactiva mitjançant un assaig d'immunoturbidimetria amb partícules pròximes a l'infraroig, on un anticòs específic s'uneix a la proteïna-C-reactiva de la mostra, tot formant un complex tèrbol quantificable espectrofotomètricament	Biowhittaker Kinetic-QCL	Laboratori URLA de la FMCS
sICAM-1	Determinació quantitativa en sèrum de la sICAM-1 mitjançant un ELISA de tipus <i>Sandwich</i> on un anticòs específic anti-sICAM-1 s'uneix a la mostra tot formant un complex acolorit quantificable espectrofotomètricament	Biowhittaker Kinetic-QCL	Laboratori URLA de la FMCS
sVCAM-1	Determinació quantitativa en sèrum de la sVCAM-1 mitjançant un ELISA de tipus <i>Sandwich</i> on un anticòs específic anti-sICAM-1 s'uneix a la mostra tot formant un complex acolorit quantificable espectrofotomètricament	Biowhittaker Kinetic-QCL	Laboratori URLA de la FMCS
Biomarcadors de l'activitat trombòtica			
PAI-1	Determinació quantitativa en plasma (citrat) de la PAI-1 mitjançant un ELISA de tipus <i>Sandwich</i> on un anticòs específic anti-PAI-1 s'uneix a la mostra tot formant un complex acolorit quantificable espectrofotomètricament	Biowhittaker Kinetic-QCL	Laboratori URLA de la FMCS

HDL: *high density lipoprotein*; ApoA1: apolipoproteïna A1; ApoB: apolipoproteïna B; hsCRP: proteïna-C-Reactiva d'alta especificitat; IL: interleucina; sICAM-1: *soluble intercellular adhesion molecule*; sVCAM-1: *soluble vascular cell adhesion molecule*; PAI-1: *plasminogen activator inhibitor*; ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*; HUSJ: Hospital Universitari Sant Joan de Reus; URLA: Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi; FMCS: Facultat Medicina i Ciències de la Salut.

2.1.2.1.2.- Triglicèrids

La quantificació dels triglicèrids es va realitzar per duplicat, mitjançant una reacció a punt final (TG Triglicèrids GPO-ref. 445850 Beckman Coulter).

El sistema SYNCHRON LX20 CX® va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:100.

Els triglicèrids de la mostra van ser hidrolitzats a glicerol i àcids grassos lliures per l'acció de la lipasa. Es va realitzar una seqüència de tres hidròlisi enzimàtiques acoblades, tot emprant quinasa de glicerol, glicerol fosfat oxidasa i peroxidasa de rave picant. Aquests van causar l'acoblament de l'àcid 3,5-diclor-2-hidroxibenzensulfúric amb la 4-aminoantipirina i es va formar un color vermell de quinina imina, mesurable a 520 nm. La quantitat de triglicèrids presents a la mostra és directament proporcional al compost acolorit format.

Els resultats es van expressar en mg/dL.

2.1.2.1.3.- Colesterol HDL

La quantificació del colesterol HDL es va realitzar per duplicat, mitjançant un mètode directe a punt final (HDLD HDL colesterol ref. 650207 Beckman Coulter). El sistema SYNCHRON LX20 CX® va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:93.

El mètode depèn d'un detergent que solubilitza les partícules de lipoproteïnes HDL i allibera el colesterol HDL per a que reaccioni amb la

colesterol esterasa i la colesterol oxidasa en presència de cromògens per produir color, mesurable a 560 nm.

La quantitat de colesterol HDL present a la mostra és directament proporcional al compost acolorit format. A més, el mateix detergent inhibeix la reacció dels enzims de colesterol amb les lipoproteïnes de baix pes molecular (LDL), les de molt baix pes molecular (VLDL) i els quilomicrons, mitjançant l'adsorció a les seves superfícies, la qual cosa evita resultats erronis.

Els resultats es van expressar en mmols/L.

2.1.2.2.- Apolipoproteïna A-1 (ApoA1)

L'estudi de les apolipoproteïnes es va realitzar al Laboratori de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus amb un analitzador Beckman Coulter Lxl 725 Access®.

La quantificació de l'ApoA1 es va realitzar per duplicat, a partir d'un mètode immunoturbidimètric (ApoA Apolipoproteïna A-1-ref. 467900 Beckman Coulter).

El sistema Access® va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:38.

Aquesta metodologia es basa en la combinació de l'ApoA1 de la mostra amb un anticòs específic contra l'ApoA-1 humana, procés que causa un increment de la dispersió de la llum. Aquesta tècnica mesura l'increment de la dispersió de la llum, el qual és quantificable espectrofotomètricament a 340 nm.

Els resultats es van expressar en g/L.

2.1.2.3.- Apolipoproteïna B (ApoB)

La quantificació de l'ApoB es va realitzar per duplicat, a partir d'un mètode immunoturbidimètric (ApoB Apolipoproteïna B-ref. 467905 Beckman Coulter).

El sistema Access® va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:11,5.

Aquesta metodologia es basa en la combinació de l'ApoB de la mostra amb un anticòs específic contra l'ApoB humana. Es forma un complex antigen-anticòs insoluble, que causa un increment de l'absorbància (com a dispersió de la llum), directament proporcional a la quantitat de complex antigen-anticòs format. Aquest complex és quantificable espectrofotomètricament a 340 nm.

Els resultats es van expressar en g/L.

2.1.2.4.- Proteïna C-reactiva d'alta sensibilitat (hsPCR)

La quantificació de la hsPCR es va realitzar per duplicat a partir d'un immunoassaig cinètic amb partícules a l'infraroig pròxim (CRPH-ref. 378020 Beckman Coulter).

El sistema Access® va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:26.

En aquesta tècnica, les partícules recobertes amb l'anticòs anti-CRP es van lligar a la CRP de la mostra formant agregats insolubles que causen torbesa. El canvi d'absorbància causat per a la formació d'aquest complex és directament proporcional a la quantitat de PCR de la mostra,

quantificable espectrofotomètricament a 940 nm a partir d'una corba de calibratge predeterminada i corregida a un sol punt.

Els resultats es van expressar en pmol/L.

2.1.2.5.- Interleucina-6 (IL-6)

La quantificació de la interleucina 6 es va realitzar per duplicat a partir d'un immunoassaig de quimioluminescència de partícules paramagnètiques (IL-6-ref. A16369 Beckman Coulter).

El sistema Access[®] va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:26.

En aquest immunoassaig de tipus *Sandwich* es va afegir la mostra al recipient de reacció junt amb les partícules paramagnètiques recobertes amb anticòs monoclonal anti-IL-6 humana, i també un reactiu inhibidor i un conjugat de fosfatasa alcalina. Després es va incubar i rentar per eliminar les molècules no adherides. Es va afegir el substrat quimioluminescent Lumi-Phos 530 i es va mesurar la llum generada per a la reacció, tot emprant un luminòmetre. La producció de llum es directament proporcional a la concentració d'IL-6 de la mostra.

La quantitat d'analit es va determinar a partir d'una corba de calibratge de 0-1500 pg/mL de reactiu luminescent.

Els resultats van ser expressats en pmol/L.

2.1.2.6.- E-selectina

La quantificació de la E-selectina es va realitzar per duplicat al Laboratori de Recerca de la Unitat de Lípids i Aterosclerosi (URLA) de la Facultat

de Medicina i Ciències de la Salut de Reus, tot emprant un test comercial d'immunoanàlisi tipus *sandwich* (Quantikine® ELISA Humans E-selectin, R&D Systems-ref. DSLE00).

100 µL de mostra i estàndards es van incorporar i acoblar a l'anticòs. Es va deixar incubar durant 2 hores a temperatura ambient. Després d'una sèrie de rentats on es va eliminar qualsevol substància no acoblada, es van afegir 200 µL d'anticòs específic per a l'e-selectina, es van deixar incubar dues hores a temperatura ambient. Després es va realitzar una altra sèrie de rentats per eliminar molècules no acoblades. Finalment, es van afegir 200 µL de la solució de substrat, la qual confereix un canvi de color directament proporcional al contingut en E-selectina de la mostra, quantificable a 450 nm (Biowhittaker Kinetic-QCL).

Els valors de l'assaig es van obtenir de la comparació de l'absorbància de la mostra amb la corba patró de E-selectina humana a diferents concentracions 0-8 ng/mL.

Els resultats van ser expressats en ng/mL.

2.1.2.7.- sICAM-1

La quantificació de la sICAM-1 es va realitzar per duplicat al Laboratori de Recerca de la Unitat de Lípids i Aterosclerosis (URLA) de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus, tot emprant un test comercial d'immunoassaig tipus *Sandwich* (Quantikine® ELISA Human sICAM-1, R&D Systems-ref. DCD540).

100 µL de mostra i estàndards es van incorporar i acoblar a l'anticòs i es va deixar incubar durant 1,5 hores a temperatura ambient. Després d'una sèrie de rentats, on es va eliminar qualsevol substància no acoblada, es van addicionar 200 µL de la solució de substrat i es va tornar a deixar incubar durant 30 minuts a temperatura ambient, però a les fosques.

La quantitat de sICAM-1 present a la mostra és directament proporcional al complex colorimètric format en l'addició del substrat, quantificable a 450 nm amb un espectrofotòmetre de plaques (Biowhittaker Kinetic-QCL).

Els valors de l'assaig es van obtenir de la comparació de l'absorbància de la mostra amb la corba patró del sICAM humana a diferents concentracions (0-50 ng/mL).

Els resultats van ser expressats en ng/mL.

2.1.2.8.- sVCAM-1

La quantificació de la sVCAM-1 es va realitzar per duplicat al Laboratori de Recerca de la Unitat de Lípids i Aterosclerosis (URLA) de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus, tot emprant un test comercial d'immunoassaig tipus *Sandwich* (Quantikine® ELISA Human sVCAM-1, R&D Systems-ref. DVC00).

100 µL de mostra i estàndards es van incorporar i acoblar a l'anticòs i es va deixar incubar durant 1,5 hores a temperatura ambient. Després d'una sèrie de rentats on es va eliminar qualsevol substància no acoblada, es van addicionar 100 µL de la solució de substrat i es va tornar

a deixar incubar durant 20 minuts a temperatura ambient, però a les fosques.

La quantitat de sVCAM-1 present a la mostra és directament proporcional al complex colorimètric format en l'addició del substrat, quantificable a 450 nm amb un espectrofotòmetre de plaques (Biowhittaker Kinetic-QCL).

Els valors de l'assaig es van obtenir de la comparació de l'absorbància de la mostra amb la corba patró de sVCAM-1 humana a diferents concentracions (0-200 ng/mL).

Els resultats van ser expressats en ng/mL.

2.1.2.9.- PAI-1

La quantificació de la PAI-1 es va realitzar per duplicat al Laboratori de Recerca de la Unitat de Lípids i Aterosclerosis (URLA), de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus, tot emprant un test comercial d'immunoassaig tipus *Sandwich* (TECHNOZYM® PAI-1 Actibind® ELISA Test-ref. TC16075).

25 µL de mostra i estàndards es van incorporar i acoblar a l'anticòs antiPAI-1 humana, i es van deixar incubar durant 45 minuts a 37°C. Després d'una sèrie de rentats on es va eliminar qualsevol substància no acoblada, es van addicionar 100 µL de la solució de substrat i es va tornar a deixar incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.

La quantitat de PAI-1 present a la mostra és directament proporcional al complex colorimètric format en l'addició del substrat, quantificable a

450 nm amb un espectrofotòmetre de plaques (Biowhittaker Kinetic-QCL).

Els valors de l'assaig es van obtenir de la comparació de l'absorbància de la mostra amb la corba patró de PAI-1 humana activa a diferents concentracions (0-123,7 ng/mL).

Els resultats van ser expressats en ng/mL.

2.1.3.- Biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric

Els biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric són: el ferro, la transferrina i la ferritina. A la taula 5 podem observar de forma resumida les tècniques emprades per a mesurar-los.

Taula 5. Característiques técnicoanalítiques dels biomarcadors analitzats relacionats amb el perfil fèrric

Biomarcador	Principi mètode	Equip	Ubicació
Ferro	Determinació quantitativa en sèrum del contingut en ferro de la mostra a partir d'una tècnica espectrofotomètrica automatitzada de Beckman Coulter, en la qual el reactiu específic FE desprèn el ferro de la transferrina i és reduït al seu estat ferrós. Aquest s'uneix al reactiu específic Ferrocine [®] , tot formant un complex mesurable espectrofotomètricament	Beckman Coulter SYNCHRON LX20 CX	Laboratori HVC
Transferrina	Determinació quantitativa en sèrum del contingut en transferrina de la mostra a partir d'una tècnica turbidimètrica automatitzada de Beckman Coulter, on el reactiu específic TRFN es combina amb un anticòs específic i forma un complex antigen-anticòs insoluble, mesurable espectrofotomètricament	Beckman Coulter SYNCHRON LX20 CX	Laboratori HVC
Ferritina	Determinació quantitativa en sèrum del contingut en ferritina de la mostra a partir d'una tècnica turbidimètrica automatitzada de Beckman Coulter, on el reactiu específic FER s'acobla a les molècules de ferritina de la mostra, tot formant agregats insolubles que causen terbolesa, detectable mitjançant un detector	Beckman Coulter SYNCHRON LX20 CX	Laboratori HVC

HVC: Hospital Verge de la Cinta de Tortosa.

2.1.3.1.- Ferro en sang

La quantificació del contingut en ferro de la sang de les mostres es va realitzar per duplicat al Laboratori de l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, amb un analitzador Beckman Coulter SYNCHRON LX20 CX® (FE-ref.467910 Beckman Coulter).

El sistema SYNCHRON LX20 CX va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:8.

Amb aquest mètode, el reactiu FE s'utilitza per mesurar la concentració de ferro mitjançant un mètode de punt final a temps fix. En la reacció, el ferro es desprèn de la transferrina en virtut de l'àcid acètic, i és reduït al seu estat ferrós per a la hidroxilamina i el tioglicat. Immediatament, l'ió ferrós forma un complex amb el reactiu Ferro Ferrocine.

El canvi d'absorbància causat per a la formació d'aquest complex és directament proporcional a la quantitat de ferro de la mostra, quantificable espectrofotomètricament a 560 nm.

Els resultats van ser expressats en µg/dL.

2.1.3.2.- Transferrina

La quantificació del contingut de la transferrina de les mostres es va realitzar per duplicat al Laboratori de l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, amb un analitzador Beckman Coulter SYNCHRON LX20 CX® (TRFN-ref.467942 Beckman Coulter).

El sistema SYNCHRON LX20 CX va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:37,5.

Amb aquest mètode, el reactiu TRFN s'utilitza per mesurar la concentració de transferrina mitjançant un mètode turbidimètric. En la reacció, el TRFN es combina amb un anticòs específic i forma un complex antigen-anticòs insoluble.

El canvi d'absorbància causat per a la formació d'aquest complex és directament proporcional a la quantitat de transferrina de la mostra, quantificable espectrofotomètricament a 340 nm.

Els resultats van ser expressats en mg/dL.

2.1.3.3.- Ferritina

La quantificació del contingut en ferritina de les mostres, es va realitzar per duplicat al Laboratori de l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, amb un analitzador Beckman Coulter SYNCHRON LX20 CX® (FER ref.447160 Beckman Coulter).

El sistema SYNCHRON LX20 CX va utilitzar per aquesta tècnica una proporció de mostra/reactiu d'1:1.

Amb aquest mètode, el reactiu FER dels sistemes immunoquímics IMAGE® es va utilitzar per mesurar la concentració de ferritina mitjançant un immunoassaig turbidimètric amb partícules pròximes a l'infraroig. Es tracta d'una cinètica d'alta sensibilitat en què una partícula recoberta amb anti-ferritina s'acobla a les molècules de ferritina de la mostra, tot formant agregats insolubles que causen terbolesa, mesurable amb un detector.

La velocitat d'agregació de les partícules és directament proporcional a la concentració de ferritina a la mostra.

Els resultats van ser expressats en ng/mL.

2.1.4.- Estudi del perfil lipídic mitjançant ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-1H)

L'estudi del perfil lipídic per ressonància magnètica nuclear (RMN-1H) es va realitzar a la Plataforma de Metabolòmica del Centre Tecnològic en Nutrició i Salut (CTNS) de la Universitat Rovira i Virgili. De forma resumida, a la taula 6 podem trobar els biomarcadors analitzats, el principi del mètode, l'equip emprat i el laboratori on s'ha realitzat.

Taula 6. Característiques tecnicoanalítiques dels biomarcadors analitzats per ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-1H)

Biomarcador	Principi mètode	Equip	Ubicació
Perfil lipídic	Determinació quantitativa en sèrum del perfil lipídic de la mostra a partir d'un mètode espectral basat en les propietats magnètiques del nucli d'hidrogen de les molècules que componen la mostra	Bruke Avance III 600mHz	COS-CTNS

COS: Centre de Ciències Òmiques; CTNS: Centre Tecnològic de Nutrició i Salut de la Universitat Rovira i Virgili.

2.1.4.1.- Preparació de les mostres

La preparació de les mostres es va realitzar al nostre laboratori a la Facultat de Medicina.

2.1.4.1.1.- Obtenció de l'extracte lipídic per a la mesura del perfil lipídic

Per l'obtenció de l'extracte lipídic, van ser necessaris 200 µL de sèrum, als quals se'ls va afegir 3 mL d'una barreja de cloroform:metanol (2:1) (Panreac-ref. 131252:Panreac-ref. 131091), es van homogeneïtzar amb un vòrtex (Heidolph Reax 2000) durant 2 minuts, i es van centrifugar a 3060 *xg* 10 minuts a 4 °C.

El sobrenedant es va assecar amb N₂ sec (evaporador Liebisch) fins la total eliminació del metanol. Per acabar el procés d'extracció, les mostres es van congelar a -20 °C, i, posteriorment es van liofilitzar (Telstar Cryodos) durant 24 hores.

Les mostres van ser guardades a -80 °C fins del seu anàlisi.

2.1.4.2.- Ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-1H)

L'estudi metabòlic de les mostres es va realitzar seguint la metodologia que el grup del COS ha desenvolupat per a tal fi (Brugnara, 2012; Catalán, 2013).

La ressonància magnètica nuclear de protó és un mètode espectral basat en les propietats magnètiques del nucli d'hidrogen. Els electrons d'aquest nucli produeixen modificacions, molt dèbils, però mesurables,

que permeten l'estudi detallat de l'estructura electrònica de les molècules i la seva identificació.

Es van adquirir un conjunt d'espectres de RMN-1H per a cada mostra, i es va registrar a 310 K en un espectròmetre Bruker Avanç 600 III a una freqüència de protons de 600,20 MHz, usant un CPTCI de 5 mm amb gradient de criosonda de triple ressonància (1H, 13C, 31P).

Els espectres de RMN-1H es van realitzar utilitzant la *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY) per suprimir el pic d'aigua residual. El moment τ_1 es va establir en 4 μ s i el τ_m (temps de mescla) va ser de 100 ms. Es va calibrar la longitud de pols 90° per a cada mostra (Wu, 2005) i van variar de 9,54 ms a 11,72 ms. L'amplada espectral va ser de 30 ppm, i es van recollir un total de 64 transitoris en 64 k punts de dades per a cada espectre.

Els espectres de macromolècules es van mesurar utilitzant un editatge per difusió seqüència de polsos amb gradients bipolar i l'esquema de retard de corrents de Foucault longitudinal (LED).

Els espectres de RMN adquirits van ser fasejats, la línia de base va ser corregida i es va fer referència al desplaçament químic del protó anomèric doblat de l' α -glucosa. Addicionalment es va introduir un senyal de referència electrònica (ERETIC) amb finalitat de quantificació (Silvestre, 2001).

2.1.4.3.- Identificació i quantificació de metabòlits

La identificació i quantificació dels metabòlits es va realitzar sobre la literatura i les diferents bases de dades de recerca: base de dades Bioref AMIX 3.8 de Bruker®, Chenomx NMRSuite 7.5 de Chenomx Inc i la base de dades Metaboloma Humans (HMDB). L'àrea sota la corba de les

regions identificades dins dels espectres es va integrar usant un paquet de programari AMIX 3.8 (Bruker GmbH, Alemanya).

3. FASE POSTANALÍTICA

3.1.- CARACTERITZACIÓ ANALÍTICA DE LES VARIABLES

3.1.1.- Mesures de centralitat i de forma

3.1.1.1.- La distribució normal

La distribució normal dels biomarcadors es va valorar mitjançant el test de normalitat de Kolmogorov-Smirnov del paquet estadístic SPSS versió 21 (IMC, Chicago, IL), per una n major a 50.

3.1.1.2.- La asimetria

La asimetria mesura la distribució dels biomarcadors a dreta o esquerra del valor mitjà del biomarcador. Un biomarcador amb una distribució normal, presenta simetria, és a dir, que segueix una corba gaussiana.

Que un biomarcador tingui asimetria positiva vol dir que la majoria dels valors obtinguts es troben a l'esquerra de la mitjana, mentre que si un biomarcador presenta asimetria negativa, indica que la majoria de valors obtinguts es troben a la dreta de la mitjana.

La asimetria dels biomarcadors es va calcular mitjançant el test d'asimetria de Fisher del paquet amb el paquet estadístic SPSS versió 21 (IMC, Chicago, IL). Amb aquest càlcul es van obtenir els valors del coeficient d'asimetria i de l'error estàndard de la asimetria.

La classificació en simètric, asimètric positiu o asimètric negatiu dels biomarcadors es va realitzar tenint en compte el càlcul de l'error estàndard de la asimetria.

Un biomarcador es va classificar en simètric quan el coeficient d'asimetria era menor al doble del seu error estàndard (coeficient \leq (error estàndard x 2)). Quan el coeficient d'asimetria és dues vegades superior al seu error estàndard, aquest es classifica en asimetria positiva o negativa segons el signe del coeficient de la asimetria.

3.1.1.3.- La curtosi (k)

La curtosis mesura el grau d'aplanament d'una corba de distribució de valors. L'ideal és que aquest valor sigui baix. En una distribució "normal", el biomarcador adopta una forma mesocúrtica, el que vol dir que té una distribució gaussiana.

Que un biomarcador sigui leptocúrtic vol dir que presenta una corba de distribució apuntalada, mentre que si és platicúrtic, presenta una distribució plana.

La curtosi (k) de les variables es va calcular amb el test per a la curtosi del paquet estadístic SPSS versió 21 (IMC, Chicago, IL). Amb aquest càlcul es van obtenir els valors dels coeficients k i els valors dels errors estàndards de curtosis.

Quan el coeficient k de curtosis és menor al doble del seu error estàndard (coeficient \leq (2x error estàndard)), s'assumeix que la distribució és mesocúrtica (gaussiana). En cas contrari, quan el coeficient sigui superior al doble del seu error, caldrà observar el signe del

coeficient k de curtosis per saber si és platicúrtica ($k < 0$) o leptocúrtica ($k > 0$).

3.1.2.- Mesures de dispersió

Per resumir les dades obtingudes d'una variable no n'hi ha prou a dir quin és el valor més típic o representatiu, sinó que també cal indicar com de junts o separats es troben els valors obtinguts del seu valor central, a aquesta característica se l'anomena dispersió. Com més llunyanes es troben aquests del seu valor central es diu que estan més dispersos. La dispersió equival a la desviació o variabilitat del biomarcador.

La dispersió dels biomarcadors es va obtenir a partir de diferents mesures: la desviació estàndard, el rang interquartil o l'antilogaritme de la desviació estàndard.

3.1.2.1.- La desviació estàndard (DE)

La desviació estàndard és una mesura de dispersió respecte a un valor mitjà, la qual ens dona la precisió del biomarcador. Quan els biomarcadors segueixen una distribució normal, podem assumir que el 95% dels valors se situaran en un espai comprès per a la mitjana aritmètica ± 2 vegades la desviació estàndard.

La desviació estàndard d'un biomarcador s'obté d'aplicar l'arrel quadrada a la variància, on la variància és la dispersió que presenta un biomarcador respecte al seu valor mitjà.

La desviació estàndard dels biomarcadors es va obtenir mitjançant les eines descriptives per a una distribució del paquet estadístic SPSS versió 21 (IMC, Chicago, IL).

3.1.2.2.- El rang interquartil

En un conjunt de dades, dividit en quatre parts iguals, el rang interquartil és la diferència entre el tercer i primer quartil.

Quan els valors d'un biomarcador no es distribueixen de forma gaussiana, el valor central ha de calcular-se mitjançant la mediana, que representa el valor mitjà.

En aquest treball, el rang interquartil es va emprar com a mesura de dispersió d'aquells biomarcadors amb una distribució no normal.

El rang interquartil es va obtenir mitjançant les eines descriptives per a una distribució del paquet estadístic SPSS versió 21 (IMC, Chicago, IL).

3.1.2.3.- L'antilogaritme de la desviació estàndard

L'antilogaritme de la desviació estàndard es va utilitzar en aquells biomarcadors que tot i havent normalitzat les mesures a través de la funció logarítmica, al test de Kolomogorov-Smirnov van donar com a resultat una distribució no normal, tot emprant com a valor mitjà la mitjana geomètrica.

L'antilogaritme de la desviació estàndard dels biomarcadors es va calcular amb el paquet estadístic del Microsoft Office Excel 2010. Primerament es van transformar a logaritme les dades de les variables,

després es va calcular la mitjana aritmètica i finalment, es va aplicar la fórmula d'exponenciació (EXP) a la mitjana.

3.1.3.- El coeficient de variabilitat com a mesura de precisió

El coeficient de variabilitat és una altra mesura de dispersió d'un biomarcador que representa la precisió del mètode analític o de la tècnica, a partir de la desviació estàndard com a percentatge de la mitjana aritmètica. Aquesta mesura permet comparar la precisió de diferents biomarcadors, ja que al estar expressat en percentatge, no té en compte les unitats de mesura.

En aquest treball s'ha mesurat la precisió metodològica dels biomarcadors a partir de la precisió interindividual (entre mostres) i la precisió de les tècniques analítiques a partir de la precisió interindividual (entre duplicats).

La precisió del mètode analític es va obtenir mitjançant la repetibilitat interindividual. La repetibilitat interindividual és la capacitat d'un mètode a donar valors semblants en mostres diferents. És calcula a partir del coeficient de variabilitat interindividual de cada biomarcador.

El coeficient de variabilitat interindividual es va obtenir a partir del càlcul del quocient entre de la desviació estàndard i la mitjana aritmètica en percentatge dels valors de les mesures dels diferents participants.

La precisió de la tècnica analítica es va obtenir mitjançant la repetibilitat intraindividual. La repetibilitat intraindividual és la capacitat d'una tècnica analítica a donar valors semblants amb la mateixa mostra. És calcula a partir del coeficient de variabilitat intraindividual. El coeficient

de variabilitat intraindividual es calcula amb el quocient entre la desviació estàndard i la mitjana aritmètica en percentatge dels valors dels duplicats, triplicats, R^2 , o bé mitjançant els valors de precisió donats pels tests comercials, de cada biomarcador.

Els coeficients de variabilitat tant intraindividual com interindividual es van obtenir mitjançant el paquet estadístic del Microsoft Office Excel 2010.

Es van estudiar les correlacions dels biomarcadors relacionats amb el perfil lipídic, analitzats mitjançant les tècniques de rutina del laboratori hospitalari i mitjançant la RMN-1H. Aquest càlcul es va realitzar mitjançant el paquet estadístic del Microsoft Office Excel 2010 amb un nivell de significació $\alpha < 0,05$.

3.1.4.- Diferències entre grup d'edat i sexes

Es va analitzar si hi havia diferències significatives entre grups d'edat mitjançant el test ANOVA per a biomarcadors amb una distribució normal, o el test de Kruskal Wallis per biomarcadors amb una distribució no normal.

També es va analitzar si hi havia diferències significatives entre sexes mitjançant el test T-Student per a biomarcadors amb una distribució normal, mentre que per a aquells biomarcadors amb una distribució no normal les diferències entre sexes es van analitzar mitjançant la prova U de Mann-Whitney.

Tots aquests tests es van realitzar amb el paquet estadístic SPSS versió 21 (IMC, Chicago, IL) amb un nivell de significació $\alpha < 0,05$.

3.1.5.- Límits o intervals de confiança

Els límits o intervals de confiança son el rang de valors en què nosaltres confiem que esdevindran totes les mesures realitzades (Altman, 1991).

L'interval de confiança permet presentar un resultat acompanyant-lo d'un marge d'error amb un límit superior i un límit inferior. Es tracta d'estimar dos valors puntuals, els extrems superior i inferior, on es trobaran e 95% de les mesures.

Per calcular els intervals de confiança habitualment es fa servir l'error estàndard que correspon a la incertesa del biomarcador respecte a la seva mitjana poblacional (Carrasco, 1995).

Establir l'interval de confiança dels biomarcadors té com a objectiu el d'establir el rang de normalitat dels biomarcadors.

En aquest treball es van establir els límits o intervals de confiança, per una probabilitat del 95% mitjançant el paquet estadístic SPSS versió 21 (IMC, Chicago, IL).

3.2.- VALORACIÓ DEL GRAU DE QUALITAT ANALÍTICA

3.2.1.- El coeficient de variabilitat relatiu (CVR)

El CVR és el coeficient de variabilitat relatiu. Va ser descrit per Tonks al 1958. Aquest paràmetre mesura la correlació entre la variació biològica i la variació analítica (Terrés-Speziale 2006).

El CVR és una eina qualitativa menys estricta per avaluar el grau de qualitat de qualsevol biomarcador de laboratori.

El coeficient de variabilitat relatiu es va calcular mitjançant la fórmula (Esteve, 2010):

$$\text{CVR} = \text{CVi} / \text{CVa}$$

On:

- ◇ CVR= coeficient de variabilitat relatiu
- ◇ CVa= coeficient de variabilitat interindividual, el CV del mètode analític
- ◇ CVi= coeficient de variabilitat intraindividual, el CV de la tècnica analítica

En mètodes ben controlats aquest coeficient ha de ser sempre inferior a 1. Quan aquest valor és superior a 1 significa que la tècnica analítica emprada per a la mesura del biomarcador no es prou precisa, amb lo qual, caldria revisar si és la tècnica adequada o si hi ha hagut algun problema durant l'anàlisi.

A la taula 7 trobem els rangs emprats en la classificació dels biomarcador segons dos nivells d'exigència menys (CVR I) o més (CVR II) estrictes (Terrés-Speziale, 2006).

Els criteris de classificació es defineixen en funció de la diferència entre la variabilitat analítica i la biològica. Com més petit és el coeficient de variabilitat relatiu, millor és aquesta relació, i per tant, millor qualitat presenta. De manera que els biomarcadors que presenten millor qualitat analítica són aquells classificats dins del grup *six sigma* amb un CVR inferior a 0,17 o inferior a 0,04, segons si es menys o més estricte.

El següent nivell de qualitat equivalent al nivell desitjable, és l'obtingut amb el criteri Aspen, amb un CVR d'entre 0,17 a 0,49 per al nivell menys estricte i d'un 0,04 a 0,11 per al nivell més estricte.

Per últim, el nivell de classificació segons Tonks equivaldria als mínims de qualitat per aquest paràmetre. En aquest grup trobarem aquells biomarcadors amb un CVR inferior a 1 per a un nivell menys estricte, mentre que per al nivell més estricte el CVR és inferior a 0,25.

Taula 7. Criteris de classificació dels biomarcadors en funció del CVR

Criteri:	CVR I	CVR II
	MENYS ESTRICTE	MÉS ESTRICTE
<i>six sigma</i>	<0,17	<0,04
Aspen	0,17-0,49	0,04-0,11
Tonks	0,5-0,99	0,125-0,24
No compleix	≥1	≥0,25

CVR: coeficient de variabilitat relatiu en percentatge

3.2.2.- Els graus de qualitat (GQ)

El grau de qualitat analítica (GQ) dels biomarcadors analitzats als laboratoris de l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa i de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus es va establir seguint la classificació adoptada per a la Societat Espanyola de Bioquímica Clínica i Patologia Molecular (SEQC) (Garcia-Lario, 2001). Les anàlisi a nivell hospitalari segueixen un procediment de control en què s'estableixen tres

categories de qualitat segons els errors analítics comesos: mínim, desitjable i òptim (taula 8).

El grau de qualitat analítica es va establir a partir del càlcul de l'error aleatori, l'error sistemàtic i l'error total analític per a cada biomarcador.

Taula 8. Classificació dels diferents graus de qualitat analítica, en funció dels errors analítics

GQ Mínim	
Imprecisió	$<0.75CV_i$
Error sistemàtic	$<0.375 (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$
Error total analític	$< k \times 0.75CV_i + 0.375 (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$
GQ Desitjable	
Imprecisió	$<0.5CV_i$
Error sistemàtic	$<0.25 (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$
Error total analític	$< k \times 0.5CV_i + 0.25 (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$
GQ Òptim	
Imprecisió	$<0.25CV_i$
Error sistemàtic	$<0.125 (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$
Error total analític	$< k \times 0.25CV_i + 0.125 (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$

GQ: grau de qualitat; CV_i: coeficient variabilitat intraindividual; CV_a: coeficient variabilitat analític; *k*: factor de cobertura = 1,65. Extreta i adaptada de Garcia-Lario, 2001.

3.2.1.- L'error aleatori (EA)

Un error aleatori és un error que no es pot predir en cap mesura, ja que és causat per factors que no podem controlar.

En l'anàlisi repetitiu d'una mateixa magnitud, es proporciona una població de dades que segueix una distribució normal. Atès que la distribució normal és asimptòtica a ambdós costats de la mitjana, la dispersió de les dades i, per tant, l'error podria anar des de menys infinit a infinit, el que pot incrementar la inexactitud.

L'error aleatori no afecta el resultat final, ja que es un error constant que sempre es produeix.

La utilitat del càlcul d'aquest error rau en la necessitat de fer-ho per obtenir l'error total analític, per tant, l'error aleatori es va calcular mitjançant el producte del valor del coeficient de variabilitat analític en percentatge (CVa) de cada biomarcador, pel valor t . El valor t és un factor que delimita l'error aleatori a una probabilitat per considerar un nivell de confiança, en el nostre cas, del 95% de la població de dades. Aquest valor és d'1,65.

3.2.2.- L'error sistemàtic (ES)

L'error sistemàtic correspon a l'error permanent i present en tots els resultats d'una magnitud analítica. L'error sistemàtic prové de les diferències d'un mètode analític amb el seu mètode de referència, així com de les diferències produïdes en el sistema analític del laboratori (instrument, reactius, calibradors, etc.), respecte d'altres laboratoris que fan servir les mateixes metodologies.

L'error sistemàtic del nostre laboratori es va calcular a partir de la mitjana aritmètica de les diferències entre el valor obtingut a cada mesura i el valor mitjà de cada biomarcador, en terme absolut, i, expressat en percentatge.

$$ES= 100 \times (\text{valor obtingut} - \text{valor mitjà})/\text{mitjà}$$

3.2.3.- L'error total analític (ETa)

L'error total analític (ETa) correspon a l'error total màxim d'una mesura. És la combinació de l'error sistemàtic i l'error aleatori en una mesura quantitativa.

Conèixer l'error total analític serveix per poder classificar els resultats de variabilitat dels biomarcadors estudiats en els diferents graus de qualitat analítica.

L'error total analític dels biomarcadors analitzats es va calcular segons la fórmula:

$$E_{ta} = E_{a} + E_{s}$$

On:

- ◇ ES és l'error sistemàtic
- ◇ EA és l'error aleatori

3.2.4.- Estudi de la correlació entre el CVR i l'ETa

Per tal d'observar la correlació entre els diferents paràmetres indicadors de qualitat, es va establir la correlació de Pearson entre el CVR amb l'error total analític mitjançant el paquet estadístic del Microsoft Office Excel 2010 amb un nivell de significació de $\alpha < 0,05$.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

Material i Mètodes

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

RESULTATS I DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

1.FASE PREANALÍTICA

1.1.- Selecció de participants

Per a la selecció de participants es van establir criteris d'inclusió i d'exclusió. A la figura 14, mitjançant un *flow-chart* es representa el procés d'elecció dels candidats a participar en l'estudi seguit les especificacions de les guies CONSORT 2010.

Dels 117 aspirants inicials a participar a l'estudi, 35 van ser exclosos durant la preselecció, per diferents motius (hipertensió arterial, IMC superior a 30 kg/m², presència d'anèmia o presa d'algun fàrmac o complex vitamínic). Dels 82 voluntaris inclosos, es va descartar un altre participant, ja que no se li va poder extreure sang. Per tant, finalment van entrar a l'estudi 81 participants, 34 dels quals formen part del grup d'edat de 18 a 39 anys, 22 del grup d'edat de 40 a 55 anys i, finalment, 25 del grup d'entre 56 i 75 anys.

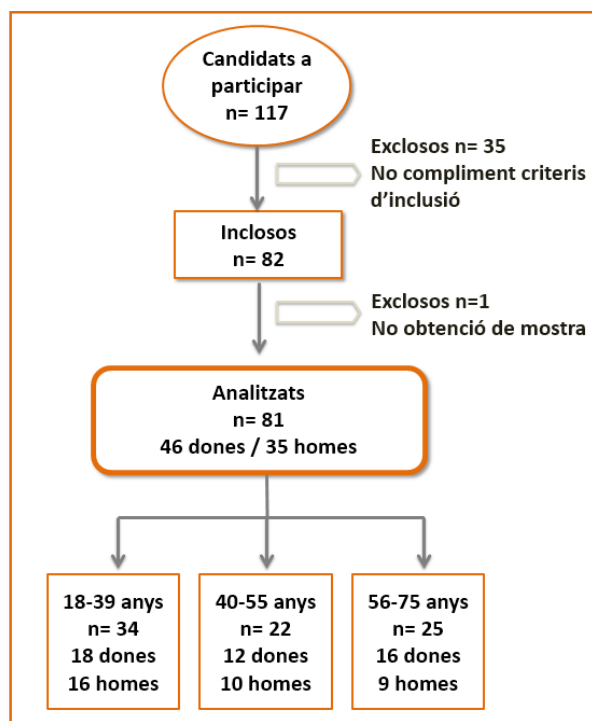


Figura 14. Diagrama d'elecció de participants.

1.2.- Característiques dels participants: voluntaris sans

Per poder dir que un biomarcador reflecteix de forma ràpida els canvis durant tractaments o intervencions terapèutiques hem de saber quin és el comportament que presenten en persones sanes; és per això que aquest estudi es basa en l'anàlisi de diferents biomarcadors sobre persones sanes.

Per saber si complien aquest requisit, es van avaluar les característiques antropomètriques de la població, es va realitzar una analítica bioquímica bàsica i es van avaluar els hàbits d'estil de vida saludable mitjançant un qüestionari d'activitat física.

Les característiques antropomètriques dels participants es poden observar a la taula 9.

A les files trobem les dades de l'alçada, el pes, l'índex de massa corporal i el perímetre de la cintura. Primer en el total de la població estudiada, i després classificat segons sexes. A les columnes trobem la població agrupada segons rangs d'edat, amb la distinció entre homes i dones, i a l'última columna, trobem el total. Les dades estan expressades amb la mitjana i la desviació estàndard. En aquesta taula també trobarem les diferències significatives per als biomarcadors antropomètrics entre sexes i grups d'edat.

L'alçada i el pes es van mesurar per obtenir l'índex de massa corporal (IMC), com a biomarcador de referència del sobrepès i l'obesitat. En aquest cas, l'OMS estableix la següent classificació (WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic, 2015).

- ◇ Infrapès per a IMC \leq 18,5 kg/m².
- ◇ Normopès per a IMC entre 18,5 i 24,9 kg/m².
- ◇ Sobrepès per a IMC entre 25 i 29,9 kg/m².
- ◇ Obesitat tipus I per a IMC entre 30 i 34,9 kg/m².
- ◇ Obesitat tipus II per a IMC entre 35 i 39,9 kg/m².
- ◇ Obesitat tipus III o severa, per a IMC \geq 40 kg/m².

Si ens fixem en el total dels participants, el valor mitjà de l'IMC és de 24,43 \pm 3,86 kg/m², fet que significa que en general els participants es troben dins del grup de normopès.

Si observem aquesta dada per grups d'edat, observem que el grup d'edat d'entre 40 a 55 anys, tant homes com dones, presenten sobrepès.

Resultats i discussió

En el cas del perímetre de la cintura, l'OMS estableix que un perímetre superior a 94 cm en homes i 80 cm en dones són indicadors de risc d'obesitat. Si observem aquesta dada en el total, $84,13 \pm 12,91$ cm, els participants no presenten obesitat, però, al separar-los per sexes, s'observa que els homes d'edat d'entre 40 i 55 i de 56 a 75 anys, excedeixen aquest límit, que seria un indicador de la presència d'obesitat. El mateix passa amb les dones en els mateixos grups d'edat, en què es sobrepassa el límit de 80 cm de perímetre de la cintura.

Taula 9. Característiques antropomètriques de la població estudiada

Característica	GRUP EDAT						TOTAL
	18 a 39 anys		40 a 55 anys		56 a 75 anys		18-75 anys
	Mitjana	± DE	Mitjana	± DE	Mitjana	± DE	Mitjana ± DE
	N=34		N=22		N=25		N=81
Alçada (m)	1,68	± 0,09	1,65	± 0,1	1,61	± 0,09	1,63 ± 0,21
Pes (kg)	67,13	± 12,04	71,95	± 11,9	64,6	± 11,05	66,83 ± 14
IMC (kg/m ²)	23,69	± 2,86	26,18	± 2,58	24,87	± 2,13	24,43 ± 3,86
P. cintura	82,38	± 8,92	88,34	± 8,75	86,17	± 8,17	84,13 ± 12,9
	DONES						
	N= 18 dones		N= 12 dones		N= 16 dones		N= 46 dones
Alçada (m)	1,62	± 0,05	1,6	± 0,08	1,55 ^b	± 0,04	1,59 ± 0,06
Pes (kg)	60,75	± 8,94	63,48	± 3,26	59,33 ^c	± 5,93	60,97 ± 6,87
IMC (kg/m ²)	23,23	± 2,89	25,04 ^b	± 2,03	24,64 ^b	± 2,06	24,19 ± 2,49
P. cintura	79,76	± 9,52	83,29	± 7,51	83,2	± 6,19	81,88 ± 7,98
	HOMES						
	N= 16 homes		N= 10 homes		N= 9 homes		N= 35 homes
Alçada (m)	1,75 ^a	± 0,05	1,73 ^a	± 0,07	1,71 ^a	± 0,08	1,73 ± 0,07
Pes (Kg)	74,31 ^a	± 11,16	82,12 ^a	± 10,2	73,96 ^a	± 12,11	76,45 ^a ± 11,4
IMC (Kg/m ²)	24,2	± 2,83	27,54 ^{a,b}	± 2,59	25,27	± 2,32	25,43 ± 2,94
P. cintura	85,33 ^a	± 7,41	94,4 ^{a,b}	± 5,9	91,44 ^a	± 8,91	89,49 ± 8,27

IMC: índex de massa corporal; P. cintura: perímetre de la cintura; DE: desviació estàndard; a: p<0,05 respecte les dones; b: p<0,05 respecte al grup de 18 a 39 anys; c: p<0,05 respecte al grup de 40 a 55 anys.

Es va avaluar si hi havia diferències antropomètriques entre els participants, segons sexes i grup d'edat, les quals es poden observar a la taula 9.

Així doncs trobem que, en dones, l'alçada és significativament major en el grup d'entre 18 a 39 anys i el de 56 a 75 anys, mentre que el grup que presenta menor pes és el grup d'entre 56 a 75 anys, seguit pel grup d'entre 18 a 39 anys, i per últim, el grup d'entre 40 a 55 anys, que és el que presenta un major pes. En el cas de l'IMC, trobem que el grup 18 a 39 anys presenta un IMC inferior al grup d'edat d'entre 40 a 55 anys i del 56 a 75 anys.

En el cas dels homes, hi ha diferències significatives amb l'IMC i el perímetre de la cintura entre els grups 18 a 39 i 40 a 55 anys, sent el grup d'edat d'entre 18 a 39 anys el que presenta uns valors menors tant per l'IMC com pel perímetre de la cintura.

En el grup d'edat de 18 a 39 anys, hi ha diferències entre homes i dones en l'alçada, el pes i el perímetre de la cintura. En el grup d'edat de 40 a 55 anys, hi ha diferències entre homes i dones en tots quatre biomarcadors antropomètrics, mentre que en el grup d'edat de 56 a 75 anys hi ha diferències entre homes i dones en alçada, pes, i perímetre de la cintura.

Pel que fa a la bioquímica bàsica dels participants, a la taula 10 es poden observar els resultats del perfil lipídic, la pressió arterial, glucosa, hematòcrit i paràmetres d'inflamació com la proteïna-C-reactiva (PCR) i la velocitat de sedimentació globular (VSG), expressats amb la mitjana i la desviació estàndard.

En el cas del perfil lipídic (colesterol total, colesterol HDL i triglicèrids), els participants del nostre estudi es troben dins dels marges de normalitat establerts segons el laboratori de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

En el cas dels biomarcadors de pressió arterial, seguit les recomanacions de l'OMS, el límit per a la pressió sistòlica és ≤ 140 mmHg i per a la diastòlica ≤ 90 mmHg, si observem la taula 10, tots els voluntaris complien aquest criteri de salut.

En el cas dels valors obtinguts en els biomarcadors hematològics: hemoglobina (12-16 g/dL), hematòcrit (36-45%) i ferro sèric (11-306 μ g/L), els resultats obtinguts es troben dins dels rangs de normalitat.

Els valors ideals dels biomarcadors de la PCR i la VSG han de ser inferiors a 10. Tots els voluntaris que participaren en aquest estudi es trobaven dins dels valors normals del laboratori.

L'OMS recomana per els adults d'entre 18 i 64 anys activitat física de 150 minuts a la setmana d'activitat física aeròbica d'intensitat moderada, o bé un mínim de 75 minuts a la setmana d'activitat física aeròbica vigorosa (World Health Organization, 2010).

Com podem observar a la taula 11, tots els participants realitzaven activitat física d'intensitat moderada (entre 3-6 MET). Es va analitzar si hi havia diferències significatives entre sexes segons el grup d'edat, i dins de cada sexe, entre grups d'edat. Es van observar diferències significatives entre homes i dones al grup d'edat d'entre 18 a 39 anys, essent majoritari en homes.

Resultats i discussió

Per grups d'edat, dins dones, no s'han observat diferències significatives, mentre que en els homes, existeixen diferències significatives en la intensitat de l'activitat física entre el grup d'edat de 18 a 39 anys amb els grups d'edat de 40 a 55 i de 56 a 75 anys, essent el grup d'homes joves els voluntaris que realitzaven activitat física d'intensitat més elevada, que correspon a aquelles activitats que requereixen un esforç intens, com per exemple jugar a futbol, bàsquet, hoquei, natació, alpinisme, *running*, balls de saló.

Taula 10. Bioquímica bàsica dels participants

		GRUPS D'EDAT						TOTAL	
		18 a 39 anys (N=34) 18 dones/16 homes		40 a 55 anys (N=22) 12 dones/10 homes		56 a 75 anys (N=25) 16 dones/ 9 homes		18-75 anys (N=81) 46 dones/ 35 homes	
UNITATS		Mitjana	DE	Mitjana	DE	Mitjana	DE	Mitjana	DE
TOTAL									
Colesterol total	mmol/L	4,27	0,59	5,31	0,83	5,75	0,78	4,8	1,7
Colesterol HDL	mmol/L	1,29	0,35	1,29	0,24	1,50	0,47	1,36	0,38
Triglicèrids	mg/dL	0,83	0,46	1,04	0,60	0,97	0,58	0,93	0,54
Pressió arterial sistòlica	mmHg	119,76	9,33	124,00	12,86	126,52	8,09	123,00	10,37
Pressió arterial diastòlica	mmHg	75,01	8,55	80,91	8,01	78,64	7,23	77,73	8,30
Glucosa	mmol/L	4,71	0,38	5,08	0,63	5,12	0,37	4,93	0,49
Insulina	pmol/L	45,03	14,50	41,08	18,09	37,34	16,34	41,58	16,23
Creatinina	mg/dL	69,29	13,82	74,05	14,13	67,92	11,80	70,16	13,38
Hemoglobina	mg/dL	14,24	1,22	14,14	1,42	14,02	0,93	14,14	1,19
Hematòcrit	%	41,95	3,29	41,47	4,40	40,84	2,89	41,48	3,50
Ferro sèric	µg/dL	82,41	40,88	85,72	26,95	83,13	26,07	83,53	33,03
VSG		1,13	1,60	1,80	1,05	1,17	0,72	1,32	1,28
Proteïna C reactiva	mg/L	4,28	0,59	5,31	0,83	5,76	0,78	5,02	0,97
DONES									
Colesterol Total	mmol/L	4,40	0,52	5,33	0,76	6,08	0,74	5,22	0,98
Colesterol HDL	mmol/L	1,45	0,38	1,41	0,22	1,65	0,39	1,51	0,36
Colesterol LDL	mmol/L	109,42	20,57	128,29	27,67	135,29	55,11	123,34	38,65
Triglicèrids	mg/dL	59,79	22,91	69,49	29,03	66,79	35,27	64,76	28,91
Pressió arterial sistòlica	mmHg	114,28	6,43	116,83	12,32	124,31	8,41	118,43	9,81
Pressió arterial diastòlica	mmHg	74,33	9,82	77,67	8,91	76,75	7,27	76,04	8,69
Glucosa	mmol/L	4,61	0,35	4,93	0,58	5,05	0,35	4,85	0,46
Insulina	pmol/L	45,16	17,59	36,80	20,17	35,96	11,72	39,78	16,77
Creatinina	mg/dL	60,11	6,01	63,77	9,48	60,63	6,67	61,24	7,27
Hemoglobina	mg/dL	13,44	0,75	13,13	0,68	13,49	0,65	13,38	0,70
Hematòcrit	%	39,76	2,09	38,43	2,12	39,30	1,99	39,25	2,09
Ferro sèric	µg/dL	70,22	39,39	85,25	22,58	74,73	17,09	75,73	29,28
VSG		11,22	9,13	7,75	5,01	9,00	8,40	9,54	7,95
Proteïna C Reactiva	mg/L	6,60	0,14	4,37	0,75	4,16	0,65	4,41	0,91

Continua a la pàgina següent

Resultats i discussió

Taula 10. Continuació

		GRUPS D'EDAT						TOTAL		
		18 a 39 anys (N=34) 18 dones/16 homes		40 a 55 anys (N=22) 12 dones/10 homes		56 a 75 anys (N=25) 16 dones/ 9 homes		18-75 anys (N=81) 46 dones/ 35 homes		
UNITATS		Mitjana	DE	Mitjana	DE	Mitjana	DE	Mitjana	DE	
HOMES										
Colesterol Total	mmol/L	4,15	0,66	5,29	0,95	5,2	0,49	4,74	0,89	
Colesterol HDL	mmol/L	1,11	0,18	1,17	0,19	1,24	0,52	1,16	0,29	
Colesterol LDL	mmol/L	100,90	20,95	136,89	36,33	130,53	12,39	118,81	29,37	
Triglicèrids	mg/dL	86,95	50,67	93,63	60,21	114,72	64,37	96,00	56,57	
Pressió arterial sistòlica	mmHg	125,94	8,23	132,60	7,06	130,44	6,04	129,00	7,77	
Pressió arterial diastòlica	mmHg	75,78	7,10	84,80	4,66	82,00	6,14	79,96	7,28	
Glucosa	mmol/L	4,83	0,39	5,27	0,65	5,23	0,39	5,05	0,51	
Insulina	pmol/L	44,88	10,59	46,22	14,59	39,79	23,08	43,95	15,42	
Creatinina		79,63	12,81	86,40	6,74	80,89	6,19	81,89	10,10	
Hemoglobina	mg/dL	15,15	1,00	15,35	1,09	14,96	0,53	15,16	0,92	
Hematòcrit	%	45,14	3,52	45,14	3,52	43,58	2,12	44,40	2,75	
Ferro sèric	µg/dL	96,16	39,23	86,30	32,72	97,11	33,02	93,57	35,23	
VSG		3,88	3,42	5,80	7,71	5,00	2,87	4,71	4,85	
Proteïna C Reactiva	mg/L	5,30	1,18	4,14	0,38	4,48	1,04	4,48	0,92	

Arterial: arterial; VSG: velocitat de sedimentació globular; DE: desviació estàndard

Taula 11. Grau d'activitat física de la població estudiada

Característica	GRUP EDAT			TOTAL
	18 a 39 anys	40 a 55 anys	56 a 75 anys	18-75 anys
	Mitjana ± DE	Mitjana ± DE	Mitjana ± DE	Mitjana ± DE
	N=34	N=22	N=25	N=81
IT (MET)	5,65 ± 1,10	5,34 ± 0,9	5,34 ± 0,80	5,47 ± 0,96
	DONES			
	N= 18 dones	N= 12 dones	N= 16 dones	N= 46 dones
IT (MET)	5,1 ± 0,8	5,49 ± 0,9	4,43 ± 1	5,34 ± 0,88
	HOMES			
	N= 16 homes	N= 10 homes	N= 9 homes	N= 35 homes
IT (MET)	6,21 ^a ± 1,1	5,17 ^b ± 0,9	5,18 ^b ± 0,4	5,64 ± 1,04

IT: intensitat total; MET: equivalent de taxa metabòlica. Equival a 3,5 mL d'O₂ per kg de pes corporal i per minut; a: p<0,05 respecte a les dones; b: p<0,05 respecte al grup de 18 a 39 anys; c: p<0,05 respecte al grup de 40 a 55 anys.

2.- FASE POSTANALÍTICA: TRACTAMENT DE DADES

2.1.- Caracterització dels biomarcadors

2.1.1.- La distribució dels biomarcadors

La distribució dels biomarcadors es va obtenir mitjançant el test de normalitat de Kolmogorov-Smirnov (K-S), el test d'asimetria i el test de la curtosi, amb els seus corresponents errors, amb una probabilitat del 95%.

Els resultats obtinguts els trobarem a les Taules de la 12 a la 15.

En taronja s'observen aquells biomarcadors que presenten una distribució normal; en blau aquells que presenten simetria; i en verd aquells que presenten mesocurtosi.

Que un biomarcador presenti una distribució normal, simetria i mesocurtosi significa que requerirà un nombre menor de mesures per trobar diferències significatives entre grups, que un biomarcador amb una distribució no normal, asimetria i no mesocurtosi.

2.1.1.1- Test de normalitat, asimetria i curtosi dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu

Com es pot observar a la taula 12, el glutatió reduït, el glutatió oxidat eritrocitari, la vitamina C, l'ORAC i l'ORAC_{TCA}, presenten una distribució normal. En paral·lel, la catalasa, la SOD, la glutatió peroxidasa eritrocitària i plasmàtica, el glutatió reduït plasmàtic, el glutatió oxidat plasmàtic, els TBARS, el 8-isoprostà, el LDLox, els grups carbonils, la 8-

OHdG i el FRAP, són els biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu que presenten una distribució no normal.

Pel que fa al test de la asimetria, trobem que el glutatió reduït eritrocitari, el glutatió oxidat plasmàtic, la vitamina C i el FRAP són simètrics, mentre que la resta presenten asimetria positiva, que significa que hi ha més valors a la dreta de la mitjana.

En el cas de la curtosi, observem que el glutatió oxidat eritrocitari, la vitamina C, el LDLox, la 8-OHdG, l'ORAC_{TCA} i el FRAP presenten mesocurtosi. De la resta de biomarcadors cal dir que gairebé tots presenten una distribució leptocúrtica, que significa que la majoria dels valors d'aquests biomarcadors estan molt a prop de la mitjana. Cal destacar el resultat del valor de la curtosi del glutatió reduït plasmàtic, amb un valor de 41, que indica que la forma que pren la corba de distribució és molt apuntada. Per últim, el glutatió oxidat plasmàtic presenta una distribució platicúrtica, la qual cosa indica que els valors del biomarcador són molt dispersos i formen una corba molt aplanada.

De forma global, podem dir que, des del punt de vista de distribució de resultats, la vitamina C és el millor biomarcador, ja que és l'únic que presenta una distribució normal, forma simètrica i mesocurtosi.

Taula 12. Distribució dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu

DISTRIBUCIÓ DE DADES								
Biomarcador	Fluid	Test K-S	Simetria	±	E. ST	Curtosis	±	E. ST
Mesura dels sistemes de defensa antioxidant enzimàtics o no								
CAT (mmol/min/g Hb)	ER	0,022	1,285	±	0,267	5,194	±	0,529
SOD (U/g Hb)	ER	0,002	1,154	±	0,267	1,680	±	0,529
Gpxe (U/g Hb)	ER	<0,001	1,256	±	0,267	1,338	±	0,529
GPxp (U/L)	PL	<0,001	1,867	±	0,272	4,614	±	0,538
GSHe (µmol/g Hb)	ER	0,200	0,266	±	0,269	1,269	±	0,532
GSSGe (µmol/g Hb)	ER	0,200	0,593	±	0,269	-0,133	±	0,532
GSHp (nmol/mL)	PL	<0,001	5,641	±	0,272	41,90	±	0,538
GSSGp (nmol/mL)	PL	<0,001	0,022	±	0,271	-1,151	±	0,535
Vitamina C (nmol/ml)	SE	0,200	0,220	±	0,279	-0,325	±	0,552
Mesura de les conseqüències de l'estrès oxidatiu								
TBARS (nmol/mL)	PL	0,002	1,519	±	0,267	3,699	±	0,529
8-Isoprostà (pg/mL)	PL	<0,001	4,227	±	0,267	18,916	±	0,529
LDLox (U/L)	PL	0,030	0,952	±	0,269	0,999	±	0,532
Grups carbonils (nmol/mg prot)	PL	<0,001	1,428	±	0,269	2,124	±	0,532
8-OHdG (ng/mg creatinina)	O	<0,001	0,615	±	0,267	-1,032	±	0,529
Mesura de la capacitat antioxidant del plasma								
ORAC (µmolTE/ml)	PL	0,050	1,011	±	0,269	5,516	±	0,532
ORAC _{TCA} (µmolTE/ml)	PL	0,200	-0,834	±	0,269	1,771	±	0,532
FRAP (µmol TE/mL)	PL	0,037	0,351	±	0,267	-0,558	±	0,529

CAT: catalasa; SOD: enzim superòxid dismutasa; GPxe: enzim glutatió peroxidasa eritrocitària; GPxp: enzim glutatió peroxidasa plasmàtic; GSHe: glutatió reduït eritrocitari; GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari; GSHp: glutatió reduït plasmàtic; GSSGp: glutatió oxidat plasmàtic; TBARS: substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric; LDLox: lipoproteïna baixa densitat oxidada; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina; ORAC: capacitat antioxidant del plasma; ORACTCA: capacitat antioxidant del plasma desproteïnit; FRAP: capacitat reductora del ferro en plasma; ER: eritròcit PL: plasma; SE: sèrum; O: orina; Test K-S: Test normalitat de Kolmogorov-Smirnov significació asimptòtica (2 cues); E.ST: error estàndard. P valor < 0,05. Biomarcador amb una distribució normal. Biomarcador simètric. Biomarcador mesocúrtic.

2.1.1.2.- Test de normalitat, asimetria i curtosi dels biomarcadors relacionats amb la inflamació

Dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, com podem veure a la taula 13, l'Apo B, l'e-selectina i la sICAM-1 presenten una distribució normal, mentre que el colesterol total, els triglicèrids, el c-HDL, l'Apo A1, la hsPCR, la IL-6, la sVCAM-1 i la PAI-1, presenten una distribució no normal.

En el test de la asimetria, trobem que el colesterol total, l'Apo B i l'e-selectina presenten simetria, mentre que la resta de biomarcadors menys la sICAM-1, presenten asimetria positiva.

Pel que fa al test de la curtosi, trobem que el colesterol total, l'Apo A1, l'Apo B, l'e-selectina i la sVCAM-1, presenten mesocurtosi. Com podem observar a la taula 18, destaquem que, en el cas de la hsPCR i la IL-6, amb uns valors de curtosi elevats (de 20,56 i 16,51, respectivament), la corba de distribució és molt apuntada.

D'aquesta sèrie de biomarcadors, en referència als resultats de distribució, podem dir que les millors opcions per determinar la inflamació serien l'Apo B i l'e-selectina, ja que són els dos biomarcadors que presenten la millor distribució de resultats en tots tres tests de distribució.

Resultats i discussió

Taula 13. Distribució dels biomarcadors a relacionats amb la inflamació

DISTRIBUCIÓ DE DADES								
Biomarcador	Fluid	Test K-S	Simetria	±	E. ST	Curtosis	±	E. ST
Biomarcadors del perfil lipídic								
Colesterol total (mmol/L)	SE	0,030	0,210	±	0,267	-0,983	±	0,529
Triglicèrids (mmol/L)	SE	<0,001	1,838	±	0,267	3,550	±	0,529
Colesterol HDL (mmol/L)	SE	0,046	0,836	±	0,267	1,085	±	0,529
Apo A1 (g/L)	SE	0,012	0,623	±	0,267	0,429	±	0,529
Apo B (g/L)	SE	0,050	0,140	±	0,267	-0,881	±	0,529
Biomarcadors d'inflamació								
hsPCR (mg/L)	SE	<0,001	3,731	±	0,285	20,56	±	0,56
IL-6 (pg/mL)	SE	<0,001	3,750	±	0,267	16,51	±	0,53
Biomarcadors de disfunció endotelial								
e-selectina (ng/mL)	PL	0,200	0,414	±	0,269	0,182	±	0,532
sICAM-1 (ng/mL)	PL	0,200	-0,546	±	0,267	1,553	±	0,529
sVCAM-1 (ng/mL)	PL	0,010	0,872	±	0,267	0,884	±	0,529
Biomarcadors de l'activitat trombòtica								
PAI-1 (ng/mL)	PL	<0,001	1,293	±	0,267	1,410	±	0,529

Colesterol HDL: colesterol d'alta densitat; Apo A1: apolipoproteïna A1; Apo B: apolipoproteïna B; hsPCR: proteïna-C reactiva d'alta sensibilitat; IL-6: interleucina 6; sICAM-1: molècula soluble d'adhesió intracel·lular-1; sVCAM-1: molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars-1; PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen-1; SE: sèrum; PL: plasma; Test K-S: Test normalitat de Kolmogorv-Smirnov significació asimptòtica (2 cues); E.ST: error estàndard. P valor < 0,05. Biomarcador amb una distribució normal. Biomarcador simètric. Biomarcador mesocúrtic.

2.1.1.3.- Test de normalitat, asimetria i curtosi dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric

A la taula 14 trobem els resultats dels tests de distribució de dades dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric, dels quals veiem que només la transferrina presenta una distribució normal.

En el cas del test de la asimetria, val a dir que cap dels tres biomarcadors no presenta simetria, essent per a tots tres asimetria positiva.

Pel que fa a la curtosi, la transferrina és l'únic que presenta mesocurtosi, mentre que el ferro i la ferritina presenten una distribució leptocúrtica.

De forma global, des del punt de vista de distribució de resultats, trobem que cap dels biomarcadors no serien la millor opció, ja que, com que no presenten una distribució normal, forma simètrica i mesocurtosi, es requerirà una n elevada per poder realitzar estudis d'intervenció.

Taula 14. Distribució dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric

DISTRIBUCIÓ DE DADES							
Biomarcador	Fluid	Test K-S	Simetria	±	E. ST	Curtosis	± E. ST
Ferro ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	SE	0,020	0,757	±	0,269	1,242	± 0,532
Transferrina (mg/dL)	SE	0,081	0,670	±	0,269	0,263	± 0,532
Ferritina (ng/nL)	SE	<0,001	1,691	±	0,269	2,453	± 0,532

SE: sèrum; Test K-S: Test normalitat de Kolmogorov-Smirnov significació asimptòtica (2 cues); E.ST: error estàndard. P valor < 0,05. Biomarcador amb una distribució normal. Biomarcador simètric. Biomarcador mesocúrtic.

2.1.1.4.- Test de normalitat, asimetria i curtosi dels biomarcadors analitzats per RMN-1H

A la taula 15, dins dels biomarcadors identificats per ressonància magnètica nuclear de protó, trobem que el colesterol total, el colesterol esterificat, el LDL3-8, el HDL3-9, 3-10 i 3-11 presenten una distribució normal, mentre que el colesterol lliure, el VLDL3-5, el VLDL3-6, el VLDL-IDL3-7 i el HDL3-12 presenten una distribució no normal.

En el cas del test de la asimetria, el colesterol total, el colesterol lliure, el colesterol esterificat, el VLDL3-5, el LDL3-8, el HDL3-9, 3-10 i 3-11 presenten simetria, mentre que el VLDL3-6, el VLDL-IDL3-7 i el HDL3-12 presenten asimetria positiva.

Pel que fa al test de la curtosi, tots els biomarcadors menys el VLDL3-5 i el HDL3-12 presenten mesocurtosi. D'aquests dos, el VLDL3-5 presenta una distribució platicúrtica, mentre que el HDL3-12 ofereix una distribució leptocúrtica.

De forma global, des del punt de vista de distribució de resultats trobem que tant el colesterol total, el colesterol esterificat, el LDL3-8, el HDL3-9, 3-10 i 3-11 serien els millors biomarcadors, ja que presenten una distribució normal, forma simètrica i mesocurtosi.

Taula 15. Distribució dels biomarcadors analitzats amb RMN-1H

DISTRIBUCIÓ DE DADES							
Biomarcador	Fluid	Test K-S	Simetria	±	E. ST	Curtosis	± E. ST
Perfil lipídic							
Colesterol total	SE	0,070	0,540	±	0,271	-0,159	± 0,535
Colesterol lliure	SE	0,014	-0,125	±	0,271	-0,490	± 0,535
Colesterol esterificat	SE	0,103	0,531	±	0,271	-0,099	± 0,535
VLDLC3-5	SE	0,005	0,259	±	0,271	-1,080	± 0,535
VLDLC3-6	SE	0,008	0,775	±	0,271	1,049	± 0,535
VLDL-IDLC3-7	SE	<0,001	0,929	±	0,271	0,625	± 0,535
LDLC3-8	SE	0,936	-0,159	±	0,271	-0,166	± 0,535
HDLC3-9	SE	0,598	0,014	±	0,271	-0,271	± 0,535
HDLC3-10	SE	0,361	0,462	±	0,271	0,237	± 0,535
HDLC3-11	SE	0,395	-0,246	±	0,271	-0,370	± 0,535
HDLC3-12	SE	<0,001	1,062	±	0,271	1,375	± 0,535

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat; IDL: lipoproteïna de densitat intermèdia; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; SE: sèrum; Test K-S: Test normalitat de Kolmogorov-Smirnov significació asimptòtica (2 cues); E.ST: error estàndard. P valor < 0,05. **Biomarcador amb una distribució normal.** **Biomarcador amb simetria.** **Biomarcador mesocúrtic.**

2.1.2.- La precisió dels biomarcadors

La precisió dels biomarcadors és va obtenir a partir de les mesures de dispersió i de la repetibilitat interindividual i intraindividual.

Com a mesures de dispersió trobarem la mitjana \pm DE en aquells biomarcadors amb una distribució normal.

En aquells biomarcadors on la distribució de mesures va ser normalitzada a partir de la funció logarítmica, les mesures de dispersió són la mediana \pm rang interquartil.

Per últim, aquells biomarcadors que tot i haver normalitzat la distribució de mesures, mitjançant la funció logarítmica, la seva distribució seguia sent no normal, la dispersió de les dades està representada mitjançant la mitjana geomètrica \pm l'antilogaritme de la desviació estàndard.

Per jutjar si una variable és més dispersa que una altra, seria erroni comparar directament la desviació típica d'ambdues, ja que aquestes contemplen les unitats de mesura i no són les mateixes en tots els biomarcadors; per això, per comparar la precisió de diverses variables es fa servir el coeficient de variació analític, expressat en percentatge (CVa).

Amb el coeficient de variabilitat analític (CVa) representem la precisió del mètode analític.

El coeficient de variabilitat intraindividual (CVi) representa la precisió de la tècnica analítica.

S'han obtingut els intervals de confiança amb una probabilitat del 95%, fet que indica que entre els límits inferior i superior trobarem el 95% de

les mesures de cada biomarcador. Aquest paràmetre ens serveix per poder establir els rangs de normalitat dels biomarcadors estudiats, per tenir grups control per a futurs estudis.

La precisió dels biomarcadors estudiats es pot observar a les Taules de la 16 a la 19.

2.1.2.1.- La dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu

Dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, observem a la taula 16 que el biomarcador que presenta una millor repetibilitat intraindividual és la vitamina C, amb una variabilitat de 0,970%, mentre que els TBARS presenten la major variabilitat de la tècnica, amb un 12,87% de CVi.

Històricament el nostre grup ha acceptat un 10% de repetibilitat intraindividual a les nostres mesures (CVi). Considerem per a una repetibilitat major és necessària la repetició de l'analítica, però en el cas dels TBARS aquest rang de tolerància es veu incrementat per a la metodologia que es fa servir, ja que els TBARS mesuren de forma global els productes de degradació d'hidroperòxids.

De la resta de biomarcadors podem veure que la CAT, la SOD, la GPxe, GSHe, GSSGp, els grups carbonils, i el FRAP, presenten una variabilitat inferior al 5%, mentre que la GPxp, el GSSGe, el GSHp, el 8-isoprostà, la LDLox, la 8-OHdG, l'ORAC i l'ORAC_{TCA}, presenten una variabilitat d'entre el 5 i el 10%.

Resultats i discussió

En el cas de la repetibilitat interindividual (CVa), trobem que la CAT és el biomarcador que presenta una millor precisió metodològica, amb un 19,71% de CVa, seguida del FRAP amb un 20,72%. En aquest cas, el 8-isoprostà és el biomarcador que presenta una major variabilitat analítica, amb un 155,4% de CVa.

De la resta de biomarcadors podem veure que la CAT, la SOD, la GPxe, la GPxp, el GSHe, el GSSGe, el GSSGp, els TBARS, l'ORAc i l'ORAC_{TCA}, presenten una variabilitat inferior al 50%, mentre que el GSHp, la vitamina C, la LDLox, els grups carbonils i la 8-oHdG presenten una variabilitat de més del 50% en el CVa.

Per tal de poder identificar si aquesta elevada variabilitat metodològica prové del sexe o de l'edat, es van analitzar les diferències entre sexes i grups d'edat.

Es van observar diferències significatives entre sexes en el FRAP, la SOD, el GSHe i l'ORAC_{TCA} (figura 15). També es van observar diferències significatives entre grups d'edat en el FRAP i el GSHp, on el grup d'edat de 56 a 75 anys presenta diferències significatives amb el grup d'edat d'entre 18 i 39 anys, i en aquest últim és més quantitatiu (figura 16). Cal destacar que el GSHp del grup 18-39 anys és gairebé el doble que en el grup d'edat major, de 56 a 75 anys. Pel que fa a la GPxe, l'ORAc i el GSHe, els grups d'edat d'entre 40 i 55 anys i 56 i 75 anys són diferents respecte del grup d'edat d'entre 18 i 39 anys; la GPxe presenta gairebé el doble de quantitat que els altres grups d'edat. El GSSGp, el LDLox i la 8-OHdG, en els grups d'edat 40-55 anys i 56-75 anys són significativament diferents del grup d'edat d'entre 18 i 39 anys. Per al GSSGp i el LDLox, és quantitativament major en el grup de 56 a 75 anys. En el grup de 56 a 75

anys la 8-OHdG és quantitativament molt menor que en el grup 18-39 anys. En el cas del 8-isoprostà, en el grup d'edat de 40 a 55 anys aquest biomarcador és sis vegades més present que en el grup jove de 18 a 39 anys.

Resultats i discussió

Taula 16. Valors de la dispersió, repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu

Biomarcador	Fluid	Precisió				Interval de confiança 95%	
		Mesures dispersió		Repetibilitat interindividual	Repetibilitat intraindividual	L.I	L.S
		Mitjana	± DE	CVa	CVi		
Mesura dels sistemes de defensa antioxidant enzimàtics o no							
CAT (mmol/min/g Hb) ^b	ER	237,6	± 45,50	19,71	1,830	228,4	253,1
SOD (U/g Hb) ^{b**}	ER	1750	± 567,2	31,43	1,460	1679	2002
Gpxe (U/g Hb) ^c	ER	79,32	± 1,483	45,16	3,680	79,10	100,8
GPxp (U/L) ^b	PL	151,7	± 52,89	32,21	5,140	146,2	169,1
GSHe (μmol/g Hb)	ER	4,083	± 1,325	25,89	3,270	3,871	4,345
GSSGe (μmol/g Hb)	ER	0,630	± 0,243	40,60	6,780	0,564	0,676
GSHp (nmol/mL) ^c	PL	6,498	± 2,207	93,14	8,200	6,690	10,25
GSSGp (nmol/mL) ^c	PL	29,07	± 1,335	27,45	4,370	28,40	32,12
Vitamina C (nmol/ml) ^{**}	SE	309,2	± 166,5	57,62	0,970	265,4	353,0
Mesura de les conseqüències de l'estrès oxidatiu							
TBARS (nmol/mL) ^b	PL	1,016	± 0,245	22,94	12,87	0,966	1,069
8-Isoprostà (pg/mL) ^b	PL	2,550	± 5,930	155,4	5,680	3,490	8,420
LDLox (U/L) ^b	PL	62,97	± 70,03	50,00	6,670	72,33	95,89
Grups carbonils (nmol/mg prot) ^b	PL	0,639	± 0,547	62,65	3,940	0,647	0,897
8-OHdG (ng/mg creatinina) ^b	O	45,04	± 91,70	84,11	5,750	45,28	69,98
Mesura de la capacitat antioxidant del plasma							
ORAC (μmolTE/ml)	PL	23,56	± 1,572	39,06	6,710	23,47	27,94
ORAC _{TCA} (μmolTE/ml)	PL	1,090	± 0,291	33,14	6,070	0,988	1,145
FRAP (μmol TE/mL) ^b	PL	0,485	± 0,176	20,72	4,200	0,485	0,541

CAT: catalasa; SOD: enzim superòxid dismutasa; GPxe: enzim glutatió peroxidasa eritrocitària; GPxp: enzim glutatió peroxidasa plasmàtic; GSHe: glutatió reduït eritrocitari; GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari; GSHp: glutatió reduït plasmàtic; GSSGp: glutatió oxidat plasmàtic; TBARS: substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric; LDLox: lipoproteïna baixa densitat oxidada; 8-OHdG: 8-hidroxí-2'-deoxyguanosina; ORAC: capacitat antioxidant del plasma; ORACTCA: capacitat antioxidant del plasma desproteïnit; FRAP: capacitat reductora del ferro en plasma; ER: eritròcit PL: plasma; SE: sèrum; O: orina; ^b: mediana ± rang interquartil; ^c: mitjana geomètrica ± antilogaritme desviació estàndard; ^{**}: Biomarcadors dels quals es disposen els valors del R² de la recta; CVa: coeficient de variació analític en percentatge; CVi: coeficient variabilitat intraindividual L.I: límit inferior; L.S: límit superior;

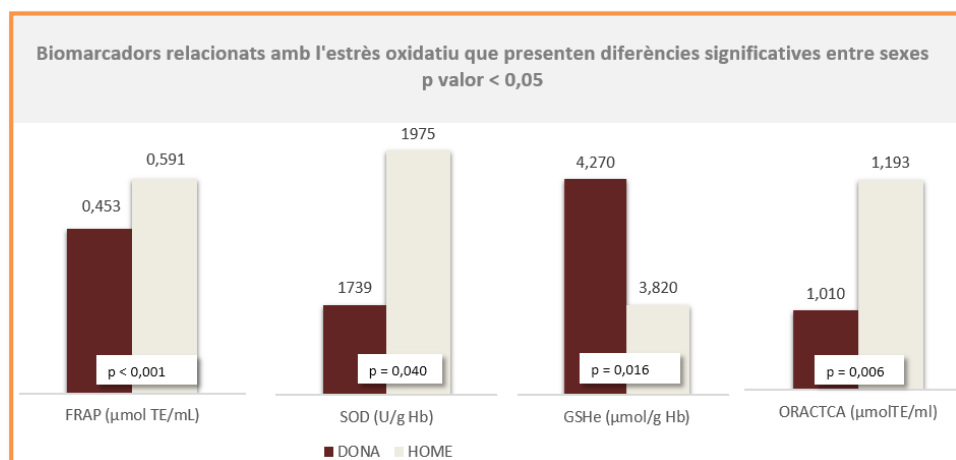


Figura 15. Gràfics dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu que presenten diferències significatives entre sexes. P valor < 0,05. FRAP: capacitat reductora del ferro en plasma; SOD: enzim superòxid dismutasa; GSHe: glutatió reduït eritrocitari; ORACTCA: capacitat antioxidant del plasma desproteïnit.

Resultats i discussió



Figura 16. Gràfics dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu que presenten diferències significatives entre grups d'edat. P valor < 0,05. FRAP: capacitat reductora del ferro en plasma; GPxe: glutatió peroxidasa eritrocitària; ORAC: capacitat antioxidant del plasma; GSHe: glutatió reduït eritrocitari; GSHp: glutatió reduït plasmàtic; GSSGp: glutatió oxidat plasmàtic; LDLox: lipoproteïna de baixa densitat oxidada; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina; G1: grup edat 18 a 39; G2: grup d'edat 40 a 55 anys; G3: grup

d'edat de 56 a 75 anys; $p < 0,05$ respecte al grup d'edat de 18 a 39 anys; b: $p < 0,05$ respecte al grup d'edat de 40 a 56 anys.

2.1.2.2.- La dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb la inflamació

Dels biomarcadors relacionats amb la inflamació observem a la taula 17, que els que presenten una millor repetibilitat intraindividual són el colesterol total, els triglicèrids i el colesterol HDL, amb un 3% de CVi cadascun. En aquest cas, la sICAM-1 és el biomarcador que presenta una menor repetibilitat, del 8,82% de CVi.

La PAI-1 presenta una variabilitat tècnica del 4% de CVi, mentre que la resta de biomarcadors (Apo A1, Apo B, hsPCR, IL-6, e-selectina, sVCAM-1) presenten una variabilitat d'entre el 5 i el 10% de CVi.

En el cas de la repetibilitat interindividual, trobem que l'Apo A1 és el biomarcador que presenta una millor precisió metodològica, amb un 13,64% de CVa, seguida del colesterol total amb un 19,25% de CVa. En aquest cas, la IL-6 és el biomarcador que presenta una major variabilitat analítica, amb un 109,0% de CVa.

De la resta de biomarcadors podem observar que els triglicèrids, l'Apo B, l'e-selectina, la sICAM-1 i la sVCAM-1 presenten una variabilitat inferior al 50%, mentre que el colesterol HDL, la hsPCR i la PAI-1 presenten una variabilitat de més del 50% en el CVa.

Com en els anteriors biomarcadors, es va analitzar si aquesta elevada variabilitat metodològica podia ser deguda a diferències entre sexes i grups d'edat.

Resultats i discussió

S'ha trobat que per a l'Apo A1, el colesterol total, els triglicèrids i el colesterol HDL, si que hi ha diferències significatives entre sexes (figura 17).

Taula 17. Valors de la dispersió i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb la inflamació

Biomarcador	Fluid	Precisió			Interval de confiança 95%		
		Mesures de dispersió		Repetibilitat interindividual			Repetibilitat intraindividual
		Mitjana	± DE	CVa	CVi	L.I	L.S
Biomarcadors del perfil lipídic							
Colesterol total (mmol/L) ^{b*}	SE	4,870	± 0,940	19,25	3,00	4,630	5,630
Triglicèrids (mmol/L) ^{a*}	SE	1,325	± 0,298	28,00	3,00	1,240	1,404
Colesterol HDL (mmol/L) ^{b*}	SE	0,740	± 0,455	58,20	3,00	0,760	1,000
Apo A1 (g/L) ^{b *}	SE	1,580	± 0,190	13,64	5,00	1,530	1,630
Apo B (g/L) *	SE	0,890	± 0,200	23,71	5,00	0,830	0,940
Biomarcadors d'inflamació							
hsPCR (mg/L) ^{b *}	SE	1,100	± 1,210	96,82	5,00	1,030	1,750
IL-6 (pg/mL) ^{b *}	SE	2,030	± 1,510	109,0	5,10	2,070	3,780
Biomarcadors de disfunció endotelial							
e-selectina (ng/mL)	PL	25,15	± 7,500	31,80	6,21	23,18	27,12
sICAM-1 (ng/mL)	PL	188,9	± 41,10	23,34	8,82	178,0	199,7
sVCAM-1 (ng/mL) ^b	PL	557,0	± 205,4	24,65	6,64	545,3	621,8
Biomarcador de l'activitat trombòtica							
PAI-1 (ng/mL) ^b	PL	13,14	± 11,22	68,20	4,04	13,60	18,43

colesterol HDL: colesterol d'alta densitat; Apo A1: apolipoproteïna A1; Apo B: apolipoproteïna B; hsCRP: proteïna-C-reactiva d'alta sensibilitat; IL-6: interleucina 6; sICAM-1: molècula soluble d'adhesió intracel·lular-1; sVCAM-1: molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars-1; PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen-1; SE: sèrum; PL: plasma; ^b: mediana ± rang interquartil; ^c: mitjana geomètrica ± antilogaritme desviació estàndard; *: Biomarcadors hospitalaris dels quals es disposa del valor dels CVi dels kits comercials; SE: sèrum; PL: plasma; %CV: coeficient de variació en percentatge; L.I: límit inferior; L.S: límit superior; CVi: coeficient de variació intraindividual en percentatge

Pel que fa a les diferències entre grups d'edat, trobem que, quant al colesterol total i a l'Apo B els grups d'edat d'entre 40 a 55 i 56 a 75 anys presenten diferències significatives amb el grup d'edat d'entre 18 a 39 anys (figura 18).

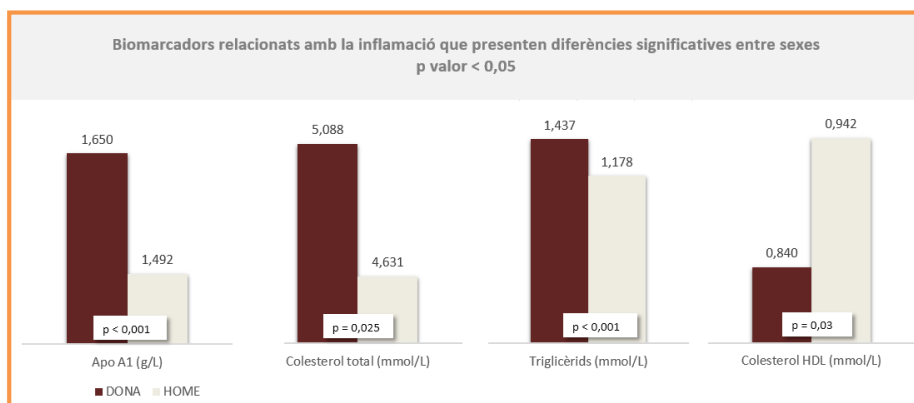


Figura 17. Biomarcadors relacionats amb la inflamació que presenten diferències entre sexes.

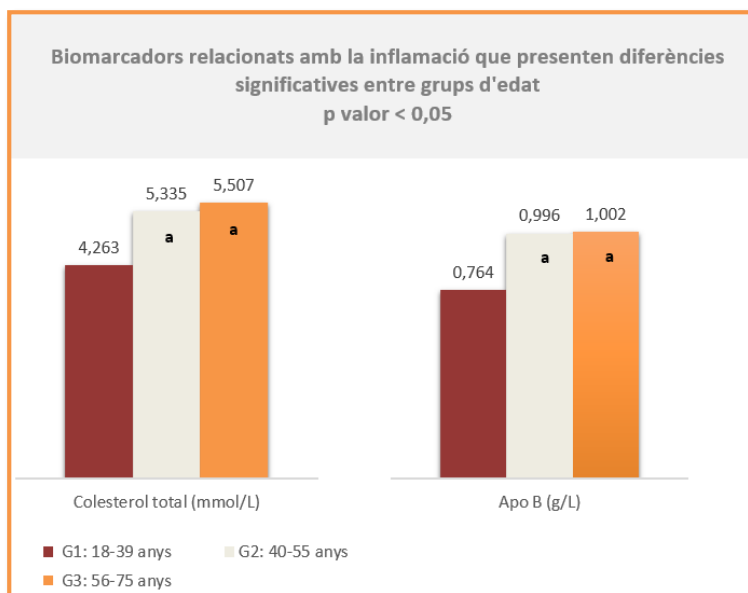


Figura 18. Biomarcadors relacionats amb la inflamació que presenten diferències entre grups d'edat. G1: grup d'edat de 18 a 39; G2: grup d'edat de 40 a 55 anys; G3: grup d'edat de 56 a 75 anys; p<0,05 respecte al grup d'edat de 18 a 39 anys; a: p<0,05 respecte al grup d'edat de 40-56 anys.

2.1.2.3.- La dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric

Dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric trobem que, com indica la taula 18, el ferro és el biomarcador que presenta una millor repetibilitat intraindividual (repetibilitat tècnica), amb un 2,5% de CVi. La transferrina i la ferritina, presenten un CVi del 5%.

En el cas de la repetibilitat metodològica, trobem que el biomarcador que presenta una menor variabilitat és la transferrina, amb un 17,11% de CVa, mentre que la ferritina té un CVa de 99,57%, el més elevat.

A la figura 19 podem observar les diferències significatives entre sexes del ferro i la ferritina. Val la pena remarcar la gran diferència entre homes i dones, les quals presenten gairebé tres vegades menys quantitat de ferritina en sang que els homes.

De la mateixa manera, si observem les diferències entre grups d'edat a la figura 20 podem veure que la transferrina és més present en el grup d'edat de 40 a 55 anys, i constaten diferències significatives amb el grup d'edat d'entre 56 a 75 anys.

Taula 18. Valors de la dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric

Biomarcador	Fluid	Precisió			Interval confiança 95%		
		Mesures de dispersió		Repetibilitat interindividual	Repetibilitat intraindividual	L.I	L.S
		Mitjana	± DE	CVa	CVi		
Biomarcadors del perfil fèrric							
Ferro ($\mu\text{g/dL}$)*	SE	82,45	± 35,50	39,34	2,50	74,17	90,72
Transferrina (mg/dL) ^a *	SE	297,4	± 52,52	17,11	5,00	283,6	311,2
Ferritina (ng/nL) ^b *	SE	34,35	± 77,90	99,57	5,00	49,43	81,11

^b: mediana \pm rang interquartil; ^c: mitjana geomètrica \pm antilogaritme desviació estàndard; *: Biomarcadors dels quals no es disposen de duplicats. S'han emprat els CVi dels kits comercials; SE: sèrum; DE: desviació estàndard; CVa: coeficient de variació analític en percentatge; CVi: coeficient de variabilitat intraindividual; L.I: límit inferior; L.S: límit superior.

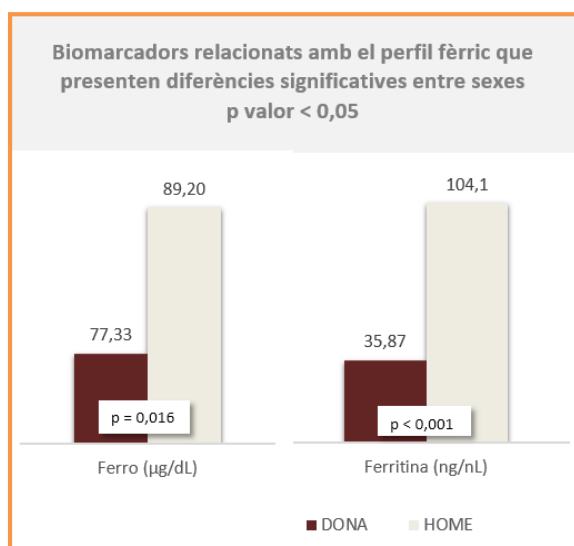


Figura 19. Biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric que presenten diferències entre sexes.

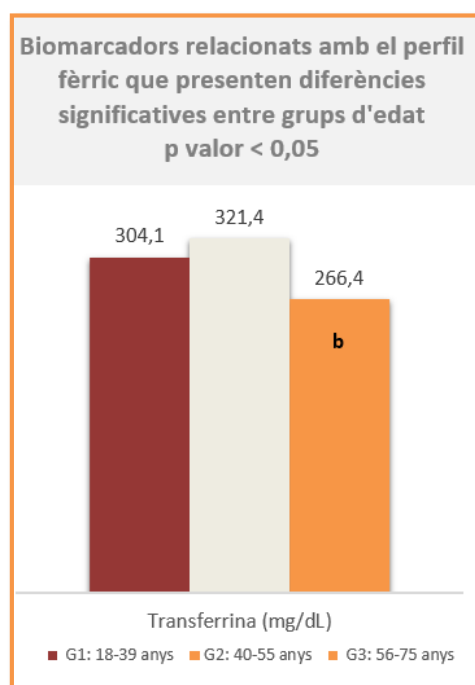


Figura 20. Biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric que presenten diferències entre grups d'edat. G1: grup d'edat de 18 a 39; G2: grup d'edat de 40 a 55 anys; G3: grup d'edat de 56 a 75 anys; $p < 0,05$ respecte al grup d'edat de 18 a 39 anys; b: $p < 0,05$ respecte al grup d'edat de 40 a 56 anys.

2.1.2.4.- La dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors analitzats per RMN-1H

A la taula 19 trobem els valors de repetibilitat intraindividual i interindividual dels biomarcadors analitzats mitjançant aquesta tècnica.

En tots els casos, la repetibilitat intraindividual és del 2,5%. Aquest valor de repetibilitat ens el dona el laboratori del CTNS.

En el cas de la repetibilitat interindividual, observem que els biomarcadors que presenten una menor variabilitat són el HDLC3-10, el LDLC3-8, el HDLC-39 i el HDLC3-11, tots amb un CVa al voltant del 15%. El colesterol lliure i els triglicèrids són els que presenten una major variabilitat, amb un 45,74% i 42,23% de CVa, respectivament.

Si observem les diferències entre sexes, a la figura 21 apareix que el VLDLC3-5, el VLDLC3-6, el VLDL-IDLC3-7, el LDLC3-8 i el HDLC3-9 presenten diferències estadísticament significatives.

Per grups d'edat, observem, a la figura 22, que el colesterol total i el colesterol esterificat presenten diferències estadísticament significatives entre els grups d'edat de 18 a 39 anys, i els grups d'edat 40 a 55 i 56 a 75 anys.

*Resultats i discussió***Taula 19.** Valors de la dispersió, la repetibilitat i l'interval de confiança dels biomarcadors analitzats amb RMN-1H

Biomarcador	Flu id	Precisió				Interval confiança 95%		
		Mesures de dispersió			Repetibilitat interindividual	Repetibilitat intraindividual	L.I	L.S
		Mitjana	±	DE	CVa	CVi		
Perfil lipídic								
Colesterol total ^{b*}	SE	5,320	±	1,870	27,45	2,50	5,115	5,879
Colesterol lliure ^{c*}	SE	0,584	±	1,873	45,74	2,50	0,623	0,783
Colesterol esterificat ^{b*}	SE	3,910	±	1,339	26,83	2,50	3,716	4,268
VLDLC3-5 ^{a*}	SE	0,092	±	0,032	36,65	2,50	0,083	0,100
VLDLC3-6 ^{a*}	SE	0,126	±	0,029	24,31	2,50	0,118	0,134
VLDL-IDLC3-7 ^{b*}	SE	0,146	±	0,028	16,58	2,50	0,144	0,159
LDLC3-8 ^{a*}	SE	0,165	±	0,024	15,47	2,50	0,159	0,172
HDLC3-9 ^{a*}	SE	0,159	±	0,024	15,96	2,50	0,152	0,165
HDLC3-10 ^{a*}	SE	0,117	±	0,017	14,44	2,50	0,112	0,121
HDLC3-11 ^{a*}	SE	0,126	±	0,020	15,37	2,50	0,121	0,132
HDLC3-12 ^{b*}	SE	0,055	±	0,032	32,88	2,50	0,054	0,066
Triglicèrids ^{a*}	SE	1,647	±	0,722	42,23	2,50	1,457	1,837

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat; IDL: lipoproteïna de densitat intermèdia; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; ^b: mediana ± rang interquartil; ^c: mitjana geomètrica ± antilogaritme desviació estàndard; *: Biomarcadors dels quals no es disposen de valors dels duplicats. s'ha emprat el valor del coeficient de variabilitat intraindividual aportat pel CTNS; SE: sèrum; DE: desviació estàndard; CVa: coeficient de variabilitat interindividual en percentatge; CVi: coeficient variabilitat intraindividual en percentatge; L.I: límit inferior; L.S: límit superior

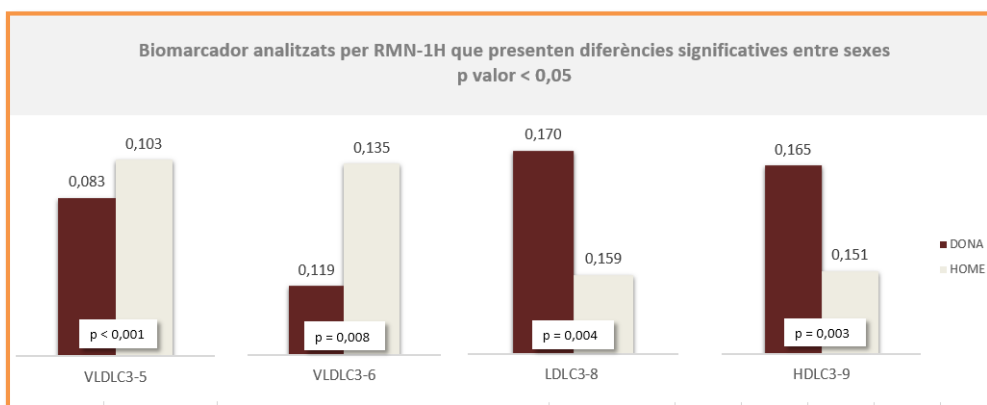


Figura 21. Biomarcadors analitzats per RMN-1H que presenten diferències significatives entre sexes.

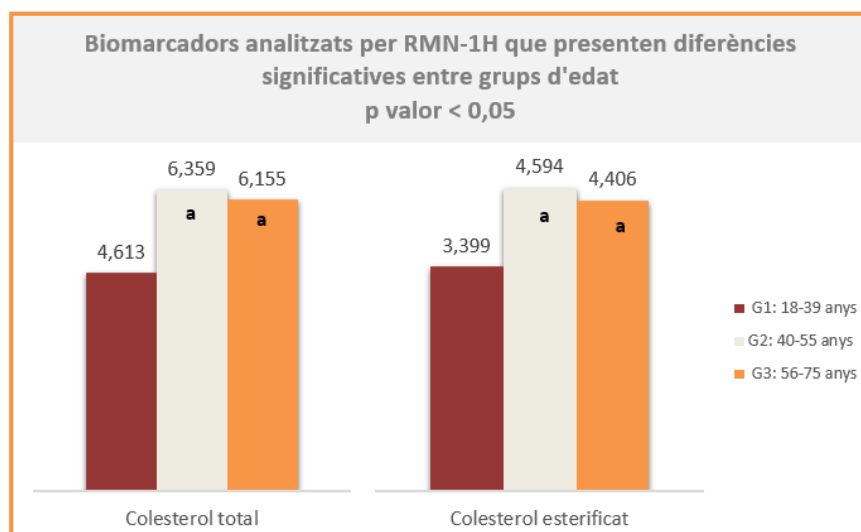


Figura 22. Biomarcadors analitzats per RMN-1H que presenten diferències significatives entre grups d'edat; G1: grups d'edat 18 a 39; G2: grup d'edat 40 a 55 anys; G3: grup d'edat 56 a 75 anys; p<0,05 respecte al grup d'edat de 18 a 39 anys; b: p<0,05 respecte al grup d'edat de 40 a 56 anys.

*Resultats i discussió***Taula 20.** Correlacions del perfil lipídic analitzat mitjançant tècniques de rutina i mitjançant RMN-1H

		Tècniques de rutina					
		Colesterol Total		Colesterol HDL		Triglicèrids	
		R ²	p	R ²	p	R ²	p
RMN-1H	Colesterol total	0,692	<0,001				
	HDLC3-9			0,672	<0,001		
	HDLC3-10			0,328	0,003		
	HDLC3-11			0,407	<0,001		
	HDLC3-12			0,127	0,266		
	Triglicèrids					0,556	<0,001

HDLC: colesterol HDL (lipoproteïna d'alta densitat); p valor <0,05

Es van estudiar si hi havia correlacions entre els biomarcadors del perfil lipídic analitzats mitjançant les tècniques de rutina del laboratori i mitjançant la RMN-1H. Com es pot observar a la taula 20 existeixen correlacions estadísticament significatives tant en la determinació del colesterol, com en la dels triglicèrids. En el cas del colesterol HDL, correlacionen totes les partícules menys el HDLC3-12. Aquestes correlacions demostren que no es necessari l'ús de tècniques analítiques més sensibles com la RMN-1H, per analitzar el perfil lipídic.

2.2.- El control de la qualitat

2.2.1.- El control de la qualitat mitjançant el càlcul del coeficient de variabilitat relatiu (CVR)

Des del punt de vista analític sempre existeix un cert nivell de variabilitat. El control de la qualitat esdevé a partir del grau de qualitat que el propi laboratori vulgui aplicar.

En aquest treball es va decidir aplicar el control de la qualitat a partir del coeficient de variació relatiu (CVR).

El CVR, com hem dit amb anterioritat, expressa la relació que hi ha entre la tècnica analítica i el mètode analític. La precisió del mètode analític es va obtenir a partir de la variabilitat biològica, entre diferents persones. D'altra banda, la precisió de la tècnica analítica es va obtenir a partir de la variabilitat dels duplicats. El CVR sempre haurà de ser inferior a 1, circumstància que que el procés analític està sota control.

El CVR dels biomarcadors es pot classificar en quatre grups segons el nivell de qualitat. Que un biomarcador compleixi el nivell *six sigma*, equival al nivell màxim de qualitat (en verd), el nivell d'Aspen (en groc) correspon al nivell desitjable, mentre que els biomarcadors que es troben dins del grup Tonks (en taronja), compleixen amb el nivell mínim de qualitat per aquest paràmetre. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen amb el mínim de qualitat per al CVR.

2.2.1.1.- El CVR dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu

A la taula 21 trobem la classificació del CVR dels biomarcadors en un nivell menys estricta d'excel·lència qualitativa. De manera que dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, els que compleixen els criteris màxims de qualitat *six sigma* són: la CAT, la SOD, la GPxe, la GPxp, el GSHe, la Vitamina C, el 8-Isoprostà, el Grups Carbonils i el 8-OHdG. Dins del grup anomenat com Aspen, trobem el GSSGe, el LDLox, l'ORAC, l'ORAC_{TCA}, el FRAP. Finalment trobem que el GSHp, el GSSGp i els TBARS, són els tres biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu classificats dins del grup Tonks, els quals presenten una pitjor relació entre la variabilitat del mètode i la variabilitat analítica, arribant al grau mínim d'exigència.

En aquest cas no hi ha cap biomarcador que no compleixi amb els criteris mínim de qualitat per al CVR.

Taula 21. Classificació dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, segons el % CVR I, amb un nivell menys estricte d'excel·lència qualitativa

Criteri de classificació	CVR I	Biomarcador
<i>Six sigma</i>	<0,17	CAT, SOD, GPxe, GPxp, GSHe, vitamina C, 8-Isoprostà, grups carbonils, 8-OHdG
Aspen	0,17-0,49	GSSGe, LDLox, ORAC, ORAC _{TCA} , FRAP
Tonks	0,5-0,99	GSHp, GSSGp, TBARS
No compleix cap criteri	>1	-

CAT: catalasa; SOD: enzim superòxid dismutasa; GPxe: enzim glutatió peroxidasa eritrocitària; GPxp: enzim glutatió peroxidasa plasmàtic; GSHe: glutatió reduït eritrocitari; GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari; GSHp: glutatió reduït plasmàtic; GSSGp: glutatió oxidat plasmàtic; TBARS: substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric; LDLox: lipoproteïna baixa densitat oxidada; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina; ORAC: capacitat antioxidant del plasma; ORACTCA: capacitat antioxidant del plasma desproteïnit; FRAP: capacitat reductora del ferro en plasma; En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

La classificació del CVR dels biomarcadors, relacionats amb l'estrès oxidatiu, amb un criteri més estricte d'excel·lència qualitativa la trobem a la taula 22. De manera que dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, els que compleixen els criteris màxims de qualitat *six sigma* són: la Vitamina C, el 8-Isoprostà. Dins del grup anomenat com Aspen, trobem: la CAT, la SOD, la GPxe, els Grups Carbonils i la 8-OHdG. Dins del grup Tonks trobem: la GPxp, el GSHe, la LDLox, l'ORAC, l'ORAC_{TCA}, el FRAP, el GSSGe, el GSHp i el GSSGp. Finalment trobem els TBARS que no compleixen amb el mínim de qualitat per aquest nivell de d'excel·lència qualitativa. En aquest cas no hi ha cap biomarcador que no compleixi amb els criteris mínim de qualitat per al CVR.

*Resultats i discussió***Taula 22.** Classificació dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, segons el % CVR II, amb un nivell més estricte d'excel·lència qualitativa

Criteri de classificació	CVR II	Biomarcador
<i>Six sigma</i>	<0,04	Vitamina C, 8-Isoprostà
Aspen	0,04-0,11	CAT, SOD, Gpxe, Grups Carbonils, 8-OHdG
Tonks	0,12-0,24	GPxp, GSHe, LDLox, ORAC, ORACTCA, FRAP, GSSGe, GSHp, GSSGp
No compleix cap criteri	>0,25	TBARS

CAT: catalasa; SOD: enzim superòxid dismutasa; GPxe: enzim glutatió peroxidasa eritrocitària; GPxp: enzim glutatió peroxidasa plasmàtic; GSHe: glutatió reduït eritrocitari; GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari; GSHp: glutatió reduït plasmàtic; GSSGp: glutatió oxidat plasmàtic; TBARS: substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric; LDLox: lipoproteïna baixa densitat oxidada; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina; ORAC: capacitat antioxidant del plasma; ORACTCA: capacitat antioxidant del plasma desproteïnit; FRAP: capacitat reductora del ferro en plasma; En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

A la figura 23 es pot observar la freqüència en percentatge del CVR dels biomarcadors en funció del nivell d'excel·lència qualitativa.

Tenint en compte el nivell d'exigència, en la classificació menys estricta, CVR I, observem que dels 17 biomarcadors analitzats, 9 (52,9%) es trobarien dins del màxim de qualitat *six sigma*, 5 biomarcadors (29,4%) dins del grup anomenat Aspen, que equivaldria a un grau de qualitat acceptable, mentre que 3 biomarcadors (17,6%), estarien dins del grup de Tonks, que engloba el mínim de qualitat.

En el cas de la classificació més estricta, CVR II, trobem que dels 17 biomarcadors analitzats, 2 (11,8%) es trobarien dins del màxim de qualitat *six sigma*, 5 biomarcadors (29,4%) dins del grup anomenat

Aspen, que equivaldria a un grau de qualitat acceptable, mentre que la majoria de biomarcadors, 9 (35,3%), estarien dins del grup Tonks, que engloba el mínim de qualitat.

En aquest cas, segons aquest criteri més exigent, trobaríem 1 biomarcador (23,5%), que no compliria amb els criteris mínims de qualitat.

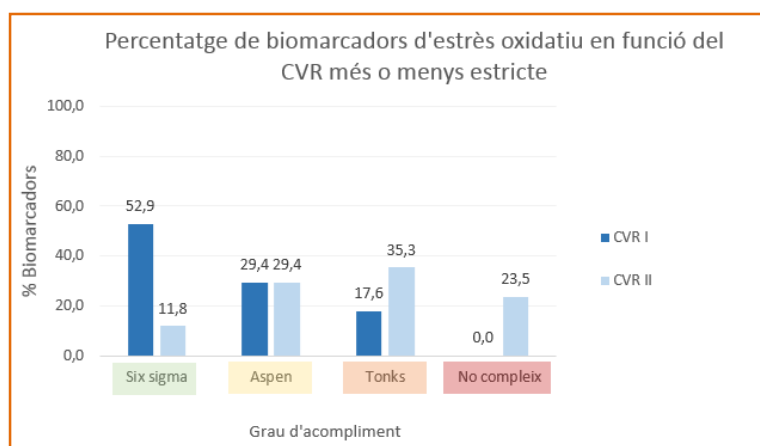


Figura 23. Representació gràfica de la freqüència en percentatge dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, classificats amb un nivell d'exigència més o menys estricte. CVR I: coeficient de variació relatiu menys estricte; CVR II: coeficient de variació relatiu més estricte.

2.2.1.2.- El CVR dels biomarcadors relacionats amb la inflamació

A la taula 23 trobem la classificació del CVR dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, en un nivell menys estricte d'excel·lència qualitativa.

Dins del grup *six sigma* trobem: el Colesterol total, els Triglicèrids, el Colesterol HDL, la hsPCR, la IL-6 i el PAI-1. Dins del grup Aspen trobem: l'Apo A1, l'Apo B, l'e-selectina, la sICAM-1 i la sVCAM-1. No hi ha cap biomarcador relacionat amb la inflamació dins del grup Tonks, ni que no compleixi amb els mínims de qualitat per aquest nivell d'excel·lència.

Taula 23. Classificació dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, segons el % CVR I, amb un nivell menys estricte d'excel·lència qualitativa

Criteri de classificació	CVR I	Biomarcador
<i>Six sigma</i>	<0,17	Colesterol total, triglicèrids, colesterol HDL, hsPCR, IL-6, PAI-1
Aspen	0,17-0,49	Apo A1, Apo B, e-selectina, sICAM-1, sVCAM-1
Tonks	0,5-0,99	-
No compleix cap criteri	>1	-

colesterol HDL: colesterol d'alta densitat; Apo A1: apolipoproteïna A1; Apo B: apolipoproteïna B; hsPCR: proteïna-C-reactiva d'alta sensibilitat; IL-6: interleucina 6; sICAM-1: molècula soluble d'adhesió intracel·lular-1; sVCAM-1: molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars-1; PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen-1; En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

La classificació del CVR dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, amb un criteri més estricte d'excel·lència qualitativa la trobem a la taula 24. Dels biomarcadors relacionats amb la inflamació no hi ha cap que compleixi amb el nivell màxim de qualitat six sigma. Els Triglicèrids, el colesterol HDL, la hsPCR, la IL-6 i la PAI-1 es trobarien classificats dins del grup Aspen, és a dir, obtindrien un nivell de qualitat òptima. El colesterol total, l'Apo B i l'e-selectina formarien part del grup Tonks, que complirien amb el nivell mínim, mentre que l'Apo aI, la SICAM-1 i la sVCAM-1 no complirien amb els mínims de qualitat per aquest nivell d'excel·lència qualitativa.

Taula 24. Classificació dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, segons el % CVR II, amb un nivell més estricte d'excel·lència qualitativa

Criteri de classificació	CVR II	Biomarcador
<i>Six sigma</i>	<0,04	-
Aspen	0,04-0,11	Triglicèrids, colesterol HDL, hsPCR, IL-6, PAI-1
Tonks	0,12-0,24	Colesterol total, Apo B, e-selectina
No compleix cap criteri	>0,25	Apo A1, SICAM-1, sVCAM-1

colesterol HDL: colesterol d'alta densitat; Apo A1: apolipoproteïna A1; Apo B: apolipoproteïna B; hsPCR: proteïna-C-reactiva d'alta sensibilitat; IL-6: interleucina 6; SICAM-1: molècula soluble d'adhesió intracel·lular-1; sVCAM-1: molècula d'adhesió de cèl·lules vasculares-1; PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen-1; VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat; IDL: lipoproteïna de densitat intermèdia; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

Resultats i discussió

A la figura 24 podem observar de forma gràfica el percentatge de biomarcadors relacionats amb la inflamació, classificats segons el CVR menys (CVR I) o més (CVR II) estricte.

En aquest grup de biomarcadors observem que en la classificació menys estricta, CVR I, els biomarcadors es distribueixen entre el grup *six sigma*, equivalent al grau de qualitat òptim, i el nivell Aspen de grau de qualitat desitjable de manera que trobem que dels 11 biomarcadors analitzats, 6 (55%) formen part del grup *six sigma*, mentre que 5, un 45% formen part del grup Aspen.

En el cas de la classificació més estricte per a aquests biomarcadors, trobem que es distribueixen en tres grups, sense trobar cap biomarcador classificat dins del grup *six sigma*. En aquest sentit trobem que els 11 biomarcadors analitzats relacionats amb la inflamació, 5, un 45% es troben dins del grup Aspen, 3 (27%) dins del grup Tonks i 3 més (27%) no compleixen amb el mínim per aquest criteri de qualitat.

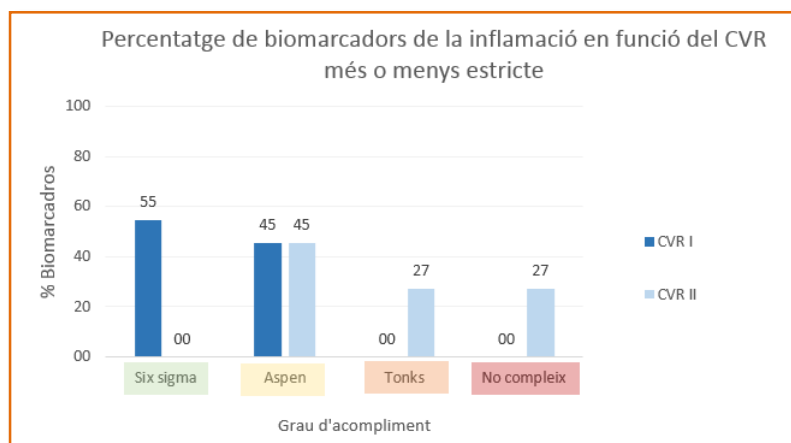


Figura 24. Representació gràfica de la freqüència en percentatge dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, classificats amb un nivell d'exigència més o menys estricte. CVR I: coeficient de variació relatiu menys estricte; CVR II: coeficient de variació relatiu més estricte.

2.2.1.3.- El CVR dels biomarcadors relacionats al el perfil fèrric

A la taula 25 trobem la classificació del CVR dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric, amb un nivell menys estricte de qualitat.

Dins del grup *six sigma* trobem el ferro i la ferritina, mentre que la transferrina la trobem dins del grup Aspen.

No trobem cap biomarcador dins del grup Tonks o que no compleixi el mínim de qualitat per aquest nivell d'excel·lència.

*Resultats i discussió***Taula 25.** Classificació dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric, segons el CVR I, amb un nivell menys estricte d'excel·lència qualitativa

Criteri de classificació	CVR I	Biomarcador
<i>Six sigma</i>	<0,17	Ferro, ferritina
Aspen	0,17-0,49	Transferrina
Tonks	0,5-0,99	-
No compleix cap criteri	>1	-

En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

A la taula 26 trobem la classificació del CVR dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric, amb un nivell més estricte de qualitat.

En aquest cas, els CVR dels biomarcadors del perfil fèrric estarien classificats dins del grup Aspen, el que equival a un nivell de qualitat desitjable, mentre que la transferrina no compliria amb el nivell mínim de qualitat per aquest nivell d'excel·lència.

Taula 26. Classificació dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric, segons el % CVR II, amb un nivell més estricte d'excel·lència qualitativa

Criteri de classificació	CVR II	Biomarcador
<i>Six sigma</i>	<0,04	-
Aspen	0,04-0,11	Ferro, ferritina
Tonks	0,12-0,24	-
No compleix cap criteri	>0,25	Transferrina

En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

A la següent figura (figura 25) de representació gràfica de la classificació dels CVR dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric trobem que segons la classificació menys estricta, CVR I, 2 dels biomarcadors (67%) estan classificats dins del grup de màxima qualitat, mentre que un biomarcador (33%) estaria classificat dins del grup de qualitat desitjable. En el cas de la classificació més estricta, trobem que no hi ha cap biomarcador dins del grup *six sigma*, de qualitat òptima. Dins del grup Aspen de qualitat desitjable trobem dos biomarcadors (67%), i el biomarcador restant el trobem classificat dins del grup que no compleix amb el mínim de qualitat per aquest nivell d'exigència.

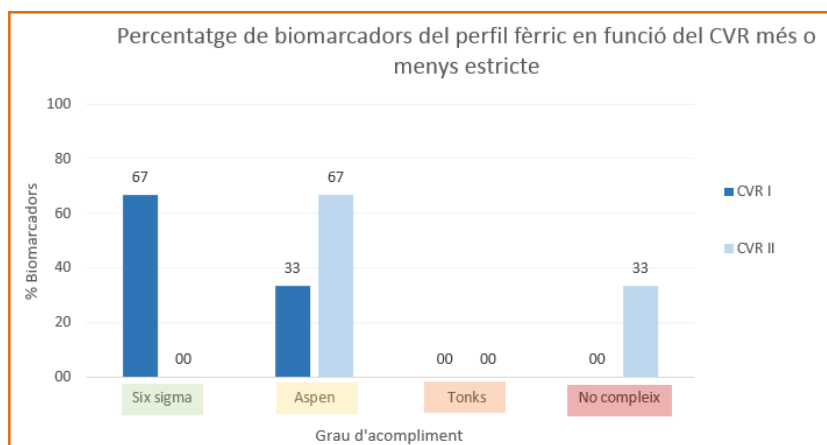
Resultats i discussió

Figura 25. Representació gràfica de la freqüència en percentatge dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric, classificats amb un nivell d'exigència més o menys estricte. CVR I: coeficient de variació relatiu menys estricte; CVR II: coeficient de variació relatiu més estricte.

2.2.1.4.- El CVR dels biomarcadors analitzats per RMN-1H

A la taula 27 trobem la classificació del CVR dels biomarcadors analitzats per RMN-1H.

En aquest cas trobem que el Colesterol lliure, els Triglicèrids, el VLDLC3-5 i el HDLC3-12 estarien classificats en grup amb un nivell de qualitat òptim, el *six sigma*. Mentre que la resta: el VLDLC3-6, el VLDL-IDLC3-7, el LDL3-8, el HDLC3-9, el HDLC3-10 i el HDLC3-11 estarien dins del grup Aspen, de qualitat desitjable.

No trobem cap biomarcador en el nivell mínim de qualitat ni que no compleixi amb els mínims de qualitat per aquest nivell d'excel·lència qualitativa.

Taula 27. Classificació dels biomarcadors analitzats per RMN-1H, segons el % CVR I, amb un nivell menys estricte d'excel·lència qualitativa

Criteri de classificació	CVR I	Biomarcador
<i>Six sigma</i>	<0,17	Colesterol lliure, triglicèrids, VLDLC3-5, HDLC3-12
Aspen	0,17-0,49	VLDLC3-6, VLDL-IDLC3-7, LDLC3-8, HDLC3-9, HDLC3-10, HDLC3-11
Tonks	0,5-0,99	-
No compleix cap criteri	>1	-

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat; IDL: lipoproteïna de densitat intermèdia; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

Finalment, a la taula 28 trobem la classificació del CVR dels biomarcadors analitzats per RMN-1H, en un nivell més estricte d'exigència. En aquest cas trobem que el Colesterol lliure, el Colesterol esterificat, els Triglicèrids, el VLDLC3-5, el VLDLC3-6 i el HDLC3-12 presentarien un nivell de qualitat desitjable, mentre que el Colesterol total, el VLDL-IDLC3-7, el LDLC3-8, el HDLC3-9, el HDLC3-10 i el HDLC3-11 presentarien un nivell de qualitat mínim, per aquest nivell d'excel·lència. En aquest sentit podem dir que les tècniques més avançades tot i que ens donen més informació del perfil lipídic amb la identificació de diferents molècules, no presenten una millor classificació qualitativa que les tècniques convencionals emprades als laboratoris clínics amb autoanalitzadors.

*Resultats i discussió***Taula 28.** Classificació dels biomarcadors analitzats per RMN-1H segons el % CVR II, amb un nivell més estricte d'excel·lència qualitativa

Criteri de classificació	CVR II	Biomarcador
<i>Six sigma</i>	<0,04	-
Aspen	0,04-0,11	Colesterol lliure, colesterol esterificat, Triglicèrids, VLDLC3-5, VLDLC3-6, HDLC3-12
Tonks	0,12-0,24	Colesterol total, VLDL-IDLC3-7, LDLC3-8, HDLC3-9, HDLC3-10, HDLC3-11
No compleix cap criteri	>0,25	

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat; IDL: lipoproteïna de densitat intermèdia; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

A la següent figura (figura 26), es pot observar de forma gràfica la freqüència dels biomarcadors analitzats per RMN-1H classificats segons el nivell d'exigència del CVR. Com podem veure, segons el CVR I, del total dels 12 biomarcadors analitzats, 4 (33%) formen part del grup *six sigma*, de màxima qualitat, mentre que els 8 restants (67%) formen part del grup Aspen. Tots ells dins un nivell de qualitat òptims. En el cas del nivell CVR II, més estricte, trobem que 6 biomarcadors (50%) es troben dins del grup Aspen, de qualitat desitjable, i uns altres 6 (50%) dins del grup Tonks, de qualitat mínima. Amb aquest fet es pot corroborar que les tècniques analítiques més sensibles també són les més precises, ja que no hi ha cap biomarcador analitzat per RMN-1H que en el seu nivell més estricte de qualitat, estigui fora dels mínims de qualitat.

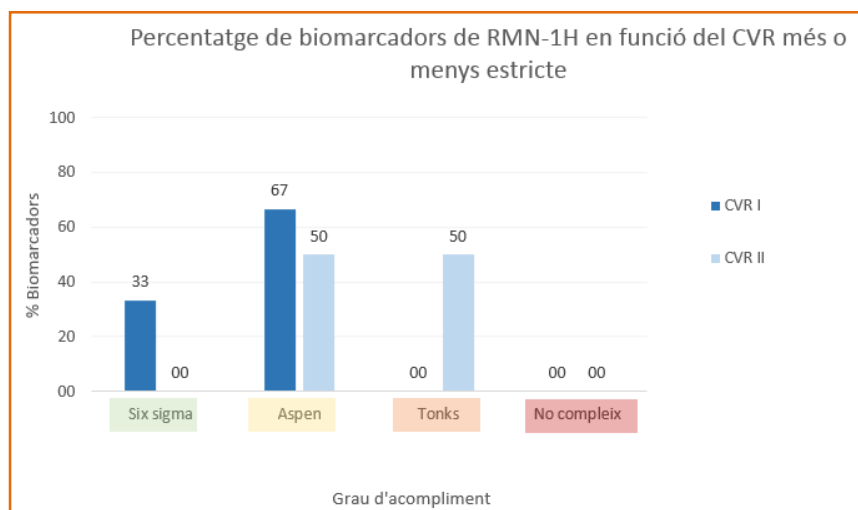


Figura 26. Representació gràfica de la freqüència en percentatge dels biomarcadors analitzats per RMN-1H, classificats amb un nivell d'exigència més o menys estricte. CVR I: coeficient de variació relatiu menys estricte; CVR II: coeficient de variació relatiu més estricte.

2.2.2.- El control de la qualitat mitjançant els graus de qualitat (GQ)

El programa de garantia de la qualitat promogut per a la Societat Espanyola de Bioquímica Clínica i Patologia Molecular, i basat en el consens sobre les especificacions de la qualitat analítica dels laboratoris clínics de la Conferència d'Estocolm, estableix una classificació dels biomarcadors en funció del grau d'acompliment en mínim, desitjable o òptim per als valors de la imprecisió, error sistemàtic i error total analític (Esteve, 2010).

Com podem observar a la taula 29, cap dels biomarcadors analitzats compleix amb aquest graus de qualitat.

Taula 29. Classificació segons el grau de qualitat dels biomarcadors a partir dels valors de la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític

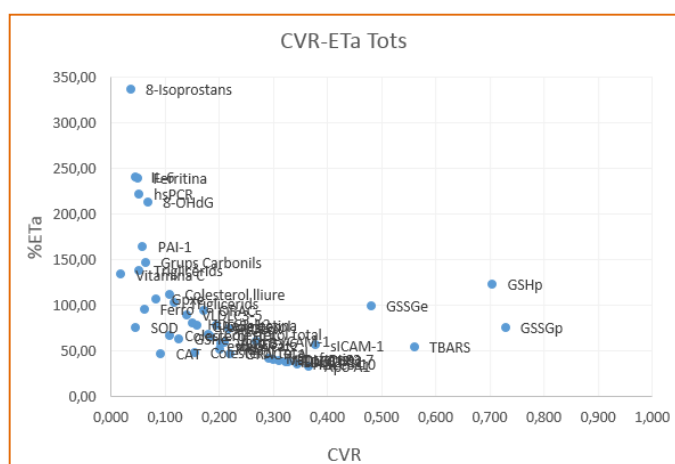
criteri de classificació	Biomarcador
GQ òptim	-
GQ desitjable	-
GQ mínim	-
No compleix cap grau de qualitat	CAT, SOD, GPxe, GPxp, GSHe, GSSGe, GSHp, GSSGp, vitamina C, TBARS, 8-Isoprostà, LDLox, grups carbonils, 8-OHdG, ORAC, ORAC _{TCA} , FRAP, colesterol total, triglicèrids, colesterol HDL, Apo A1, Apo B, hsPCR, IL-6, e-selectina, sICAM-1, sVCAM-1, PAI-1, ferro, transferrina, ferritina, colesterol total, colesterol lliure, colesterol esterificat, triglicèrids, VLDLC3-5, VLDLC3-6, VLDL-IDLC3-7, LDLC3-8, HDLC3-9, HDLC3-10, HDLC3-11, HDLC3-12

GQ: grau de qualitat; CAT: catalasa; SOD: enzim superòxid dismutasa; GPxe: enzim glutatió peroxidasa eritrocitària; GPxp: enzim glutatió peroxidasa plasmàtic; GSHe: glutatió reduït eritrocitari; GSSGe: glutatió oxidat eritrocitari; GSHp: glutatió reduït plasmàtic; GSSGp: glutatió oxidat plasmàtic; TBARS: substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric; LDLox: lipoproteïna baixa densitat oxidada; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina; ORAC: capacitat antioxidant del plasma; ORAC_{TCA}: capacitat antioxidant del plasma desproteïnit; FRAP: capacitat reductora del ferro en plasma; colesterol HDL: colesterol d'alta densitat; Apo A1: apolipoproteïna A1; Apo B: apolipoproteïna B; hsPCR: proteïna-C-reactiva d'alta sensibilitat; IL-6: interleucina 6; sICAM-1: molècula soluble d'adhesió intracel·lular-1; sVCAM-1: molècula d'adhesió de cèl·lules vasculares-1; PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen-1; VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat; IDL: lipoproteïna de densitat intermèdia; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; En color verd trobem classificats els biomarcadors que compleixen amb el nivell òptim de qualitat, mentre que en groc trobem el desitjable i en taronja el mínim. En vermell aquells biomarcadors que no compleixen aquests criteri de qualitat.

Resultats i discussió

Es van analitzar les correlacions entre el % CVR i l'error total analític.

A la figura 27 podem observar la correlació entre el CVR i l'error total analític de tots els biomarcadors. Com podem veure, els biomarcadors més allunyats com el GSHp, el GSSGp i els 8-isoprostans són els que presenten una pitjor correlació. En el cas del 8-isoprostà, tot i que el CVR és baix, el %Eta que presenta és elevat, mentre que en el cas contrari, el sistema glutatínic plasmàtic, presenta una variabilitat menor, però un CVR més elevat. Aquests resultats ens corroboren que caldria trobar alternatives a aquestes tècniques analítiques per estudiar el sistema de defensa antioxidant i el 8-isoprostà.



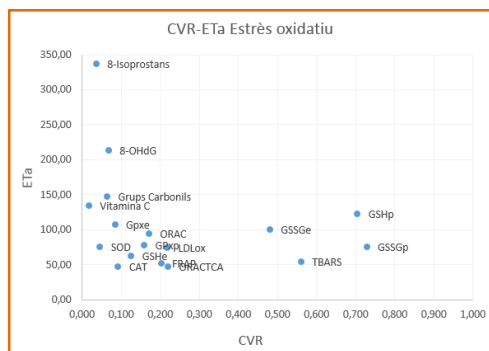


Figura 28. Correlació del CVR i l'ETa dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu.

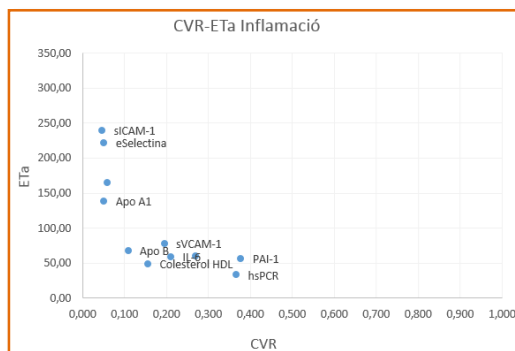


Figura 28. Correlació del CVR i l'ETa dels biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu

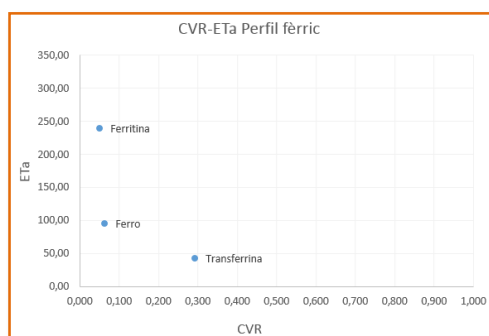


Figura 30. Correlació del CVR i l'ETa dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric

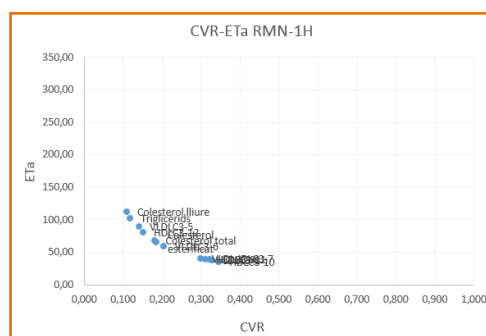


Figura 31. Correlació del CVR i l'ETa dels biomarcadors analitzats per RMN-1H.

Com podem observar a la figura 28, els biomarcadors més llunyans, el 8-isoprostà, el sistema glutatió plasmàtic, els TBARS, el GSSGe i la 8-OHdG són els biomarcadors que presenten pitjor correlació, ja que o bé tenen un CVR baix o un ETa elevat.

En el cas dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, figura 29, veiem que l'e-selectina i la sICAM-1 presenten un ETa més elevat tot i

Resultats i discussió

que el seu CVR es baix. Per a la resta de biomarcadors els valors són acceptables.

A la figura 30, observem la correlació entre el CVR i l'ETa dels biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric. En aquest cas, la ferritina tot i presentar un CVR més baix, el seu ETa és el més elevat. Això pot ser degut a les diferències entre sexes. De igual manera, trobem que la transferrina presenta un menor ETa i un major CVR, que podria ser degut a les diferències entre grups d'edat. Aquest fet remarca la necessitat d'establir grups per edat i sexes per certs biomarcadors.

Per últim, a la figura 31 trobem aquells biomarcadors analitzats per RMN-1H. La correlació d'aquests biomarcadors és bona, trobem que tots els biomarcadors estan agrupats. Aquest fet confirma que les tecnologies més novedoses presenten una menor variabilitat.

3. DISCUSSIÓ

El càlcul del coeficient de variabilitat relatiu, la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític, són els criteris utilitzats en aquesta tesi per valorar el grau de qualitat analítica que presenten diferents biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, la inflamació i el perfil fèrric.

Tal com van reflectir els resultats de les analítiques dels participants en el procés de selecció, mitjançant l'anàlisi de biomarcadors de rutina a la clínica, com són el perfil hematològic, la glicèmia, la pressió arterial, el perfil lipídic o la inflamació, la població diana obtinguda va ser catalogada com població sana i que a més a més portava uns estils de vida saludable. D'aquesta manera es va eliminar el possible biaix en els resultats que puguin comportar malalties o altres situacions fisiològiques. No obstant això, hi ha alguns paràmetres, com el sexe i l'edat que són font de variabilitat i no és possible controlar-los si no és fent subgrups.

Distribució dels biomarcadors: normalitat, simetria i curtosis.

Al laboratori de recerca, es fa necessari conèixer profundament la distribució de les dades al valorar un biomarcador. En nombroses ocasions, l'objectiu de la recerca és establir una relació matemàtica entre un factor d'exposició i un biomarcador. En estudis en humans, la probable variabilitat existent en l'exposició se suma a la variabilitat entre individus i si hi afegim una distribució no normal de les dades, serà poc probable poder trobar l'associació que es busca. Per tant, s'hauria de

procurar minimitzar totes les fonts de variabilitat, entre els que es troba la distribució de les dades. Així, sempre que sigui possible, cal normalitzar les dades per eliminar aquesta font de variabilitat (Flynn, 2007). Tot i que la majoria d'investigadors ja tenen en compte aquest primer pas de normalització de dades, els nostres resultats ens porten a una proposta més sistematitzada de correcció. Pel que fa a l'estrès oxidatiu, tots els biomarcadors mesurats en espectrofotòmetre o fluorímetre (activitat enzimàtica, lipoperoxidació i capacitat reductora del Ferro), exceptuant el glutatió eritrocitari i l'ORAC, haurien de patir una transformació logarítmica abans d'utilitzar-se per l'anàlisi estadística de les dades. De la mateixa manera, els biomarcadors de perfil lipídic, inflamació, disfunció endotelial, activitat trombòtica i perfil fèrric, a excepció de l'e-selectina, l'sICAM-1 i la transferrina, haurien de transformar-se també en logaritme. De fet, a la literatura trobem alguns exemples, com és el cas de la Proteïna C-Reactiva, en els que sistemàticament el biomarcador és transformat en logaritme ja que se'n coneix àmpliament el biaix en la distribució de les dades (Ong, 2013). A més, hi ha estudis que demostren que aquest biaix pot tenir implicacions en els resultats de la recerca, com per exemple en el cas de càlculs d'odds ràtio en estudis epidemiològics. En aquest sentit, Grund i col·laboradors demostren que les estimacions són incorrectes quan s'utilitza hsPCR en l'escala de mesura original (Grund, 2010).

Rang de referència dels biomarcadors: intervals de confiança.

Per poder establir els rangs de normalitat dels biomarcadors estudiats, en aquest treball es van determinar els seus límits de referència. Els

límits de referència són una eina indispensable al laboratori ja que sense ells no podem dir si un biomarcador es veu modificat per un tractament, intervenció terapèutica o nutricional. Tot i que molts estudis clínics, bàsics o d'intervenció en humans utilitzen un grup control, saber quins és el rang de valors dins del qual s'hauria de moure el biomarcador en persones sanes té una gran utilitat com a control de qualitat i també per gestionar els resultats de recerca, sobretot a l'hora d'intentar relacionar els resultats amb altres autors.

L'establiment dels límits de referència no es una tasca senzilla ja que depenen de factors fisiològics i d'estil de vida com la raça, l'edat, el gènere, la dieta, el pes corporal, l'activitat física, el tabaquisme o la medicació. A més, resulta evident que, per establir els límits de referència, es necessita analitzar el biomarcador en qüestió en persones sanes (Blankenstein, 2014). En aquest treball s'han obtingut els límits de referència de diversos biomarcadors d'estrès oxidatiu, perfil lipídic, inflamació, disfunció endotelial, activitat trombòtica i perfil fèrric sobre una població d'homes i dones de l'àmbit geogràfic mediterrani, caucàsics, d'edat adulta, que segueixen una dieta mediterrània amb normopès, moderadament actius, no fumadors i sense cap paràmetre bioquímic de risc cardiovascular alterat ni presa de fàrmacs (Grund, 2010).

Com ja hem dit, un dels factors que influeixen en la variabilitat dels resultats de qualsevol biomarcador és el sexe i l'edat. Dins de les característiques antropomètriques veiem que la nostra població, tot i tenir una mitjana d'IMC dins del normopès, pateix alguns canvis quan valorem aquest paràmetre segons el sexe i l'edat. Els nostres resultats,

Resultats i discussió

doncs, corroboren la necessitat de presentar l'IMC en grups segons el sexes i l'edat per evitar conclusions esbiaixades. No obstant això, tot i ser molt utilitzat, hem trobat a la literatura nombrosos estudis que discuteixen sobre la utilitat de l'IMC com a indicador antropomètric de salut, essent la mesura del greix corporal la millor alternativa. En un estudi recent del nostre grup, en el qual es tracten les limitacions de la fórmula de l'IMC, ens plantejem l'inconvenient de que la fórmula no té en compte la quantitat de greix corporal així com la quantitat de múscul i os (González, 2015). La mesura del greix corporal és pel moment tècnicament complexa, per tant, per ara, l'IMC és la millor opció. Encara que l'IMC no defineix la distribució de greix, és simple, fiable, amb un baix cost i té una bona correlació amb la malaltia metabòlica en adults, encara que amb algunes limitacions en la població pediàtrica (Parente, 2016). Alguns autors sostenen que potser els clínics han de confiar en, no només l'avaluació de la composició corporal, sinó també en la mesura d'hormones i biomarcadors en la sang o en l'orina, per exemple, o en la història i hàbits d'estil de vida, per obtenir un millor maneig dels processos anormals que poden contribuir a l'obesitat i les malalties cròniques (Ahima, 2013; Shah, 2012).

Segons el nostre treball, els biomarcadors d'estrès oxidatiu que proposem que, sistemàticament, es presentin en grups de sexes i edat són el glutatió, l'ORAC i el FRAP; i el colesterol total en relació al perfil lipídic.

Caldria tenir en compte el sexes pels biomarcadors d'estrès oxidatiu: SOD i TBARS; de perfil lipídic: APOA1, HDL i triglicèrids; i els biomarcadors de perfil fèrric: ferro total i ferritina.

Els grups d'edat poden esbiaixar els resultats en els biomarcadors d'estrès oxidatiu: LDL oxidada, GPx, 8-isoprostà i 8OHdG; de perfil lipídic: APOB; i el biomarcador de perfil fèrric: transferrina.

A la literatura recent, existeixen alguns treballs en els que es valora la relació entre sexes, edat i molts dels biomarcadors que s'avaluen a la nostra tesi doctoral (Khadir, 2015). Alguns autors defensen el fet que els principals antioxidants responsables de l'eliminació dels radicals lliures en els homes de 20-25 anys i dones de 32-39 anys són la SOD i CAT, mentre que l'activitat de la GPx disminueix. La desintoxicació també es controla a través de glutatió, que es debilita en dones de 32-39 anys (Kowalska, 2016). Tot i que, igual que en el nostre treball, es remarca la importància de fer grups per eliminar el biaix, les diferències amb els nostres resultats es deuen probablement al tipus de població en el qual s'ha estudiat (aràbiga; nord-europea). Per tant, les propostes realitzades en el nostre treball no es poden generalitzar globalment però sí utilitzar en la població d'homes i dones de l'àmbit geogràfic mediterrani, caucàsics i d'edat adulta. Després de veure els nostres resultats, en publicacions del grup de recerca hem optat per ajustar per edat i sexes els models estadístics que generem, i així poder donar resultats molt més fiables (Aranda, 2017).

Imprecisió dels biomarcadors: dispersió i CV interindividual i intraindividual.

El nombre d'estudis publicats que relacionen l'estrès oxidatiu, i els seus biomarcadors, amb un rang elevat de malalties ha anat incrementant en els últims anys de manera que diferents biomarcadors d'estrès oxidatiu estan emergint com a biomarcadors d'utilitat en la clínica. En aquest

Resultats i discussió

treball s'ha analitzat la caracterització i la precisió de diferents biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, per tal d'aportar-los validesa i utilitat clínica.

Els biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu es van classificar segons si formaven part dels sistemes de defensa antioxidant o no, segons el dany que causaven i per últim, aquells que mesuren la capacitat antioxidant del plasma.

Els biomarcadors dels enzims antioxidants (CAT, SOD i GPx) presenten uns resultats de precisió acceptables (19-45% CVa i 1-6% CVi), raó per a la qual nosaltres recomanem emprar aquest tipus de tècniques espectrofotomètriques per determinar aquests biomarcadors.

En termes de precisió, podem observar que tots els biomarcadors de l'estrès oxidatiu no enzimàtics presenten una bona repetibilitat intraindividual, circumstància que una bona precisió de la tècnica analítica emprada. En el cas de la repetibilitat interindividual, que reflecteix la precisió del mètode analític, trobem que la mesura del GSH en eritròcit (25,89% CVa) és millor biomarcador que la mesura del GSH en plasma (93,14% CVa) ja que presenta menys variabilitat metodològica. En concordança amb això, trobem que la simetria i la curtosis per al GSH eritrocitari (sim: 0,266; k: 1,269) és millor que per el GSH plasmàtic (sim:5,64; k: 41,90). El glutatió (GSH) protegeix davant el dany oxidatiu reaccionant davant els components tòxics i la seva oxidació produeix GSSG. En voluntaris sans, nosaltres esperàvem trobar una menor variabilitat per a aquests biomarcadors. Segons els nostres resultats sembla que la mesura del sistema glutatió és més precisa en eritròcits que en plasma. Aquesta variabilitat pot ser deguda a que el

GSH i el GSSG s'originen als òrgans i teixits i acaben a la circulació, d'on són mesurats (Wu et al. 2004). Existeixen diferents tècniques analítiques per identificar i quantificar el glutatió: espectrometria, fluorimetria, luminometria, aplicada a HPLC i més recentment, amb la tècnica d'espectrometria de masses acoblada a HPLC per ionització electrosprai (Dalle-Donne, 2006). A més, també es poden determinar altres modificacions proteiques, com és el cas de la metionina sulfòxid (Mashima, 2003).

La sensibilitat dels lípids a la peroxidació i els seus efectes sobre la funció de les membranes cel·lulars han fet que els peròxids lipídics siguin bons biomarcadors del dany oxidatiu, i que la LDL oxidada pugui ser considerada com el biomarcador *Gold Standard* per al dany oxidatiu a lípids. A més, l'EFSA recomana la determinació de la LDL oxidada com a mesura del dany oxidatiu a lípids *in vivo* (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA)s 2011). No obstant això, existeixen altres metodologies com la determinació dels diens conjugats, els TBARS per a la determinació del malondialdehid, o altres aldehids i els isoprostans relacionats amb la mesura del dany oxidatiu a lípids.

En relació als biomarcadors del dany oxidatiu a lípids, en aquest treball s'ha analitzat la variabilitat de tres tècniques diferents, els TBARS per a la quantificació del malondialdehid, el 8-isoprostà i la LDL oxidada. Tal com hem trobat en el nostre treball, la LDLoxidada (sim: 0,952; k: 0,999) presenta una millor distribució de les mesures del biomarcador que els TBARS (sim: 1,519; k: 3,699) i el 8-isoprostà (sim: 4,227; K:18,91), mentre que el TBARS presenta una millor distribució que el 8-isoprostà. La

Resultats i discussió

variabilitat interindividual és menor als TBARS (22,94% CVa), seguit per a la LDLox (50% CVa), i per últim el 8-isoprostà (155CVa).

Diferents estudis demostren que la determinació de MDA a partir dels TBARS es poc específic, i la seva validesa com a biomarcador d'estrès oxidatiu ha estat àmpliament discutida (Neri, 2015; Karimi Galougahi, 2015), ara bé, segueix sent un dels tests més utilitzats a causa de la seva simplicitat, sensibilitat, rapidesa i cost econòmic, tot i que la seva quantificació per espectrometria de masses aporti més homogeneïtat que la fluorimetria (Mateos, 2005).

Dels biomarcadors relacionats amb el dany oxidatiu a lípids no recomanariem l'ús de la determinació del 8-isoprostà mitjançant ELISA ja que creiem que el mètode escollit es la font de l'elevada variabilitat, i hi ha altres tècniques, com les HPLC, que aporten una menor variabilitat (Il'yasova, 2012).

Les espècies reactives de l'oxigen són mediadores del dany oxidatiu a tots els components moleculars de l'ADN, les bases purines i pirimidines. El producte més abundant del dany a l'ADN es la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), que es pot detectar per HPLC, ELISA. En aquest treball es va optar per a la tècnica d'ELISA amb la qual es va obtenir una variabilitat intraindividual del 5,75% de CVi i una variabilitat interindividual de 84,11% de CVa. Altres autors (Kroese, 2014) han mesurat el dany al DNA a partir de tècniques convencionals i amb l'espectrometria de masses, amb una correlació significativa entre aquestes. Tot i que reconeixem els avantatges de l'espectrometria de masses, tenint en compte els nostres resultats, nosaltres no descartem l'ús de l'ELISA per quantificar la 8-OHdG.

Finalment, els biomarcadors de la capacitat antioxidant: ORAC, ORAC_{TCA} i FRAP presenten uns valors acceptables de simetria i curtosis, per tant una bona distribució de les mesures, així com uns resultats acceptables en precisió intraindividual com interindividual. D'aquests tres biomarcadors de la capacitat antioxidant, el FRAP presenta millor precisió que l'ORAC i l'ORAC_{TCA}, 4,2 CVi, respecte a 6,710 CVi i 6,070 CVi, respectivament. Com podem observar la repetibilitat de la tècnica del test ORAC i ORAC_{TCA} és molt semblant. En el cas de la repetibilitat del mètode, el FRAP presenta una menor variabilitat, amb un CVa del 20,72%, mentre que la precisió del mètode per l'ORAC és de 39,06% de CVa i 33,14% CVa per l'ORAC_{TCA}. Els nostres resultats concorden amb l'estudi realitzat per Thaipong i col·ls (Thaipong, 2006), on va comparar la variabilitat del FRAP i l'ORAC, essent la precisió del FRAP millor que la de l'ORAC, igual que els nostres resultats. Per tant, nosaltres recomanaríem la quantificació del FRAP com a mesura de la capacitat antioxidant per presentar millor precisió, ser més simple i ràpida.

Tot i que els biomarcadors de la capacitat antioxidant no ens donen informació dels mecanismes d'acció, la seva mesura és simple i econòmica i la seva mesura presenta utilitat en estudis d'intervenció, per comparar l'efecte antioxidant d'algun producte abans i després de la intervenció, a més, ens poden donar una idea de forma indirecta, de l'activitat o eficàcia del producte/ intervenció en qüestió.

En investigació, l'elecció d'un biomarcador o un altre a l'hora de realitzar una intervenció depèn de molts factors, però malauradament, moltes vegades el factor econòmic és decisiu. L'ús de cadascun dels biomarcadors analitzats en aquest treball té els seus avantatges i els

Resultats i discussió

seus inconvenients. Actualment, els isoprostans són considerats el *Gold Standard* de l'estrès oxidatiu, però aquesta mesura requereix un processament acurat per prevenir l'oxidació *in vitro* (Wu, 2004). A més a més, en l'estrès oxidatiu intervenen molts processos, per a la qual cosa no ens podem quedar només amb un biomarcador, sinó que es necessita observar un context global, antioxidant i pro-oxidant. Altrament, ens trobem en una era on el desenvolupament tecnològic genera cada any noves tècniques analítiques per l'anàlisi de biomarcadors, a vegades amb la utilització de tecnologia puntera, no fàcilment accessible a tots els grups de recerca. Per tant, podem concloure que en l'estudi de l'estrès oxidatiu, no hi ha un sol biomarcador clau o òptim per mesurar-lo, ni tampoc no es poden descartar les tècniques analítiques convencionals, com la espectrofotometria per determinar-los, ja que aquest no presenta una variabilitat analítica elevada.

Igual que passa amb l'estrès oxidatiu, la inflamació és un procés complex en el qual intervenen multitud de molècules i processos, per la qual cosa no existeix un sol biomarcador capaç d'estimar el risc d'inflamació, ja que mentre uns són bons per detectar o predir la patogènesis, altres són més bons indicadors del pronòstic (Lee, 2012).

La inflamació incorpora biomarcadors com les molècules d'adhesió vascular, citocines, proteases, citocines missatgeres com la IL-6, l'adiponectina, i els reactants de fase aguda com la hsPCR, la PAI-1 i el fibrinogen.

Dels biomarcadors relacionats amb la inflamació, els incorporats dins del perfil lipídic presenten uns valors acceptables de simetria i curtosis, igual que els biomarcadors de disfunció endotelial i de l'activitat trombòtica.

En canvi, els biomarcadors d'inflamació presenten uns valors de simetria i curtosis més elevats que la resta, essent la hsPCR el que presenta els valors més elevats, per tant, la forma que adopta la seva corba de de distribució és més apuntada.

En termes de precisió, dels biomarcadors relacionats amb la inflamació trobem que tots elles presenten una repetibilitat intraindividual bona, entre el 3 i el 9% de CVi, ja que no sobrepassen en cap cas el 10% d'acceptabilitat interna. D'aquests, els biomarcadors més precisos són el colesterol total, els triglicèrids i el colesterol HDL amb un 3% de CVi cadascun, seguit de la PAI-1 (4,04% CVi). En aquest cas, la tècnica analítica menys precisa és l'emprada en la mesura de la sICAM-1 amb un 8,8% de CVi.

En el cas de la repetibilitat interindividual, corresponent a la precisió del mètode analític trobem que l'Apo A1 és el mètode més precís, amb un 13,64% de CVa, mentre que la IL-6 és el biomarcador amb una menor precisió, amb un 109,0% de CVa, seguit de la hsPCR amb un 96,82% de CVa, fet que es correlaciona amb els valors elevats de simetria i curtosis. Aquests resultats contradiuen el qual diu la bibliografia, en la qual la hsPCR es el millor biomarcador de la inflamació (Libby, 2009).

La hsPCR i la IL-6 són reactants de fase aguda, per a la qual cosa es poden trobar incrementats en sang com a resposta a la inflamació. En moments on no hi ha fase aguda inflamatòria, els processos biològics de cada persona poden emascarar els resultats de variabilitat obtinguts. La variabilitat obtinguda en ambdós biomarcadors d'inflamació es superior a la esperada, atés que es tracta de persones sanes on en principi no hi ha inflamació i el seu estat de salut es bo. Per tant, dels dos

Resultats i discussió

biomarcadors d'inflamació, no recomanaríem la determinació de la IL-6, ja que es la que presenta una major variabilitat analítica.

Per a la disfunció endotelial s'han mesurat tres biomarcadors, l'e-selectina, la sICAM-1 i la sVCAM-1. Tos tres presenten una distribució de les dades acceptable, essent per a la sICAM-1 la corba més apuntada. En termes de precisió, la sICAM-1 és la que presenta una menor precisió intraindividual, amb un 8,82 CVi. Pel que fa a la repetibilitat del mètode, l'e-selectina és el biomarcador que presenta una menor precisió, mentre que la precisió dels altres dos biomarcadors es semblant, al voltant del 24% de CVa.

Tant la sICAM-1 com la sVCAM-1 són biomarcadors regulats en resposta a la inflamació, mentre que l'e-selectina estaria més indicada en la predicció del risc de patir accidents cardiovasculars una vegada ja hi ha una malaltia coronària. Llavors, tenint en compte els resultats de precisió, no recomanaríem l'anàlisi de l'e-selectina en persones sanes, com a biomarcador de la disfunció endotelial.

L'ús de les noves tecnologies en el descobriment i quantificació de nous biomarcadors i rutes metabòliques presenten diferents avantatges, com la rapidesa o la sensibilitat, però el cost econòmic és elevat, ja sigui en infraestructures o equipaments per tenir-les al laboratori, o bé contractant aquests serveis a un centre tecnològic.

Amb la RMN-1H, la tècnica que hem utilitzat per identificar el perfil lipídic, és poden arribar a detectar components en l'ordre de nanomolar/L o picomolar/L (Lewis, 2008), magnituds que amb les tècniques emprades a l'actualitat no es detecten. Però el cost no és eficient per a establir de rutina aquesta mesura a un laboratori de

recerca, ni a un laboratori clínic, ja que si miren els resultats de precisió entre les dues tècniques diferents, només hi ha 0,5 punts de diferència en el % de CVi, essent el menor valor per a la RMN-1H. Aquesta diferència de 0,5% no és tanta com per rebutjar les tècniques convencionals per analitzar el perfil lipídic, pel que en aquest cas, no recomanaríem l'ús de les noves tecnologies en aquesta determinació. A més, hem comprovat la bona correlació entre els biomarcadors analitzats entre les dues tècniques.

Pel que fa als biomarcadors del perfil fèrric, trobem a la bibliografia que el biomarcador *Gold Standard* per a la mesura dels dipòsits de ferro és a partir de l'aspiració de medul·la òssia, biomarcador invasiu i de cost elevat. A la pràctica, el biomarcador més àmpliament emprat es la mesura del contingut del ferro i la ferritina en plasma o sèrum, aquesta última, considerada la millor opció per a la mesura dels dipòsits de ferro ja que la seva concentració es proporcional als dipòsits totals de ferro de l'organisme. No obstant això, tot i que aquest biomarcador es específic per indicar dèficit de ferro, no està clar que sigui bon indicador de l'excés, ja que en persones d'edat avançada, aquest es troba incrementat de forma natural, fet que podria emascarar alguna malaltia crònica. En aquest cas es recomana mesurar la saturació de la transferrina (Lapice, 2013).

Tenint en compte això, si ens fixem en la distribució de les dades i la precisió dels biomarcadors del perfil fèrric estudiats, observem que la distribució de les dades per tots tres biomarcadors és acceptable, així com la repetibilitat intraindividual, amb un 2,5% de CVi pel ferro, mentre que la transferrina i la ferritina presenten un 5% de CVi.

Resultats i discussió

Per últim, dels biomarcadors del perfil fèrric, el de la transferrina es el biomarcador més precís amb un 17,11% de CVa, mentre que el ferro presenta una variabilitat del 39,34% de CVa i la ferritina un 99,57% de CVa. Aquestes diferències en la variabilitat tindrien a veure amb les diferències entre sexes i grups d'edat. En els humans es ben coneguda les diferències entre sexes per a aquests biomarcadors com a conseqüència de les pèrdues menstruals de les dones i els menors dipòsits de ferro i ferritina (Das, 2017).

Tenint en compte els resultats de precisió, dels tres biomarcadors del perfil fèrric, recomanaríem la mesura de la transferrina com a indicador de l'estat del ferro.

La nostra proposta general en aquest sentit és acceptar un CVi inferior al 10% i un CVa inferior al 50% en els biomarcadors.

Aquesta proposta posa en dubte la validesa del biomarcador d'estrès oxidatiu TBARS (CVi 15%), tot i que, com hem comentat, és encara molt utilitzat com un biomarcador l'estrès oxidatiu en investigacions clíniques i en el nostre laboratori. Els problemes tècnics i els resultats controvertits presents en la literatura fan necessària una re-avaluació de la seva utilitat (Maryam, 2015).

A més, de la proposta exposada en relació al CVa se'n deriven una sèrie de decisions. En primer lloc, cal buscar una alternativa fiable a la determinació del glutatió en plasma, que té una variabilitat excessiva (CVa 93%) amb la tècnica actual. Com hem comentat, el glutatió en plasma és un reflex del que passa a teixits i òrgans, fet que hem

comprovat en estudis anteriors del grup, on es destacava l'alta correlació entre ambdues determinacions (Romeu, 2010). Aquest grau de correlació amb l'eritròcit i el fet que sigui tan variable ens porta a pensar que no és un biomarcador indispensable i fins-i tot, en alguns estudis, ja no es presenti com a biomarcador en els resultats. De la mateixa manera, la determinació del dany a proteïnes, 8-isoprostà i 8-OHdG presenten biaixos excessius. En aquest sentit, el nostre laboratori realitza en l'actualitat aquestes determinacions amb tècniques d'espectrofotometria de masses (Romeu, 2016).

Grau de qualitat analític: CVR vs ETa

En referència als criteris de qualitat aplicats en aquest estudi, s'ha de tenir en compte que les dades obtingudes en un laboratori d'anàlisi han de reflectir el veritable valor de l'ús de biomarcadors, per poder orientar la societat en mesures de prevenció, control, tractament o intervenció terapèutica. Per tant, un biomarcador ha de reflectir de forma ràpida canvis d'aquest en aquelles situacions fisiopatològiques que ho requereixin, a més, els procediments analítics emprats en l'anàlisi dels biomarcadors han de presentar unes qualitats analítiques que facin dels resultats obtinguts uns resultats confiables.

No obstant això, garantir que els resultats siguin confiables no és una tasca fàcil, ja que els procediments analítics poden presentar certa variabilitat i desviacions sistemàtiques. Per tant, no només es suficient treballar amb molta cura, sinó que ha d'existir un sistema que exerceixi de control i garanteixi l'òptim funcionament del laboratori com són els controls de qualitat.

Resultats i discussió

Com hem comentat, els coeficients de variabilitat ens permeten prendre algunes decisions, tot i això, cal una visió més profunda del biomarcador per poder assegurar la seva fiabilitat. La implantació d'un sistema de gestió de la qualitat és una eina útil per controlar els processos que tenen lloc al laboratori, però no pot garantir que els resultats satisfacin el seu propòsit, ja que el que es controla mitjançant la gestió per processos són els processos, no els resultats. Per aquest motiu es busca implementar un sistema de control intern de la qualitat per tal de donar confiabilitat als resultats emesos.

Per establir aquest control de qualitat, existeixen diferents criteris, nosaltres vam escollir el CVR i el sistema de classificació de graus de qualitat en funció de la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític seguit els criteris de la conferència d'Estocolm per a laboratoris clínics. El control del CVR ha demostrat en alguns estudis que és necessari per tal de minimitzar els errors i no donar conclusions esbiaixades en els resultats (Tuovinen, 2016).

Com hem vist als resultats, vam classificar el CVR dels biomarcadors seguit dos criteris diferents, un més estricte que l'altre. A la següent figura es comparen ambdós criteris en la totalitat dels biomarcadors estudiats.

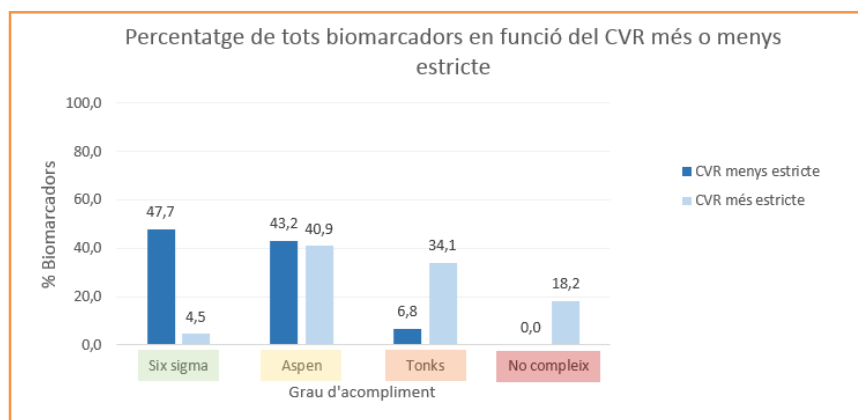


Figura 32. Gràfics representatius del percentatge del total dels biomarcadors analitzats, segons el CVR més o menys estricte.

Tenint en compte el nivell d'exigència, en la classificació menys estricta (CVR I), observem que dels 43 biomarcadors analitzats, 22 (47,7%) es trobarien dins del màxim de qualitat *six sigma*, 19 biomarcadors (43,2%) dins del grup anomenat Aspen, que equivaldria a un grau de qualitat acceptable, mentre que 3 biomarcadors (6,9%), estarien dins del grup de Tonks, que engloba el mínim de qualitat.

Pel que fa a la classificació més estricta (CVR II) trobem que 2 biomarcadors, un 4,5% estarien dins del grup *six sigma*, 18, un 40,9% dels biomarcadors estarien dins del grup Aspen, de qualitat acceptable, i uns 17, 34,1% dins del grup Tonks. A més, amb aquests criteris de classificació, trobem que 5 biomarcadors, un 18,2% estarien classificats com que no compleixen cap criteri de qualitat per a la CVR, ja que el seu valor es superior a 0,25.

L'ideal per aquest tipus de control es que el valor del CVR sigui inferior a 1. Si comparem els nostres resultats amb altres autors que també

Resultats i discussió

calculen el CVR per les seves magnituds, trobem que Terrés-Speziale aconsegueix per tots els biomarcadors que analitza, un CVR inferior a 1 (Esteve, 2010) per a la qual cosa, tot i que no mesurem els mateixos biomarcadors, si apliquem la classificació menys estricta (CVR I) per al CVR. Tots els nostres biomarcadors també presenten un CVR inferior a 1 i a més, la majoria estarien dins un grau de compliment acceptable. Per tant, el grau del control de la qualitat que recomanaríem seria el menys estricte.

En el cas del control de la qualitat dels biomarcadors segons els graus de qualitat tenint en compte la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític, cap dels nostres biomarcadors no compleix el criteri mínim d'acceptabilitat.

Esteve i col·laboradors, en el seu estudi, troben també que per a la transferrina tampoc no s'arriba a complir cap grau de qualitat a través de la imprecisió, error sistemàtic i error total analític (Esteve, 2010). En aquest cas, el que s'ha de fer es revisar els procediments emprats tant en la preparació de la mostra (fase preanalítica), com en el seu anàlisi al laboratori (fase analítica).

L'establiment dels graus de qualitat a partir dels GQ és un model molt estricte per a un laboratori de recerca, pel que no recomanarien la seva instauració. Aquest model s'aproxima al nivell màxim de qualitat per un laboratori, i en recerca, el nostre camp d'actuació aquest model queda molt lluny de ser aplicable per a la falta d'automatització, ja que en totes les mesures hi ha la intervenció manual d'una persona, que tot i que està formada, entrenada i preparada per realitzar les tasques que pertocquen, no deixa d'incloure una variabilitat a les mesures. A més, cal tenir en

compte la finalitat diagnòstica o no de l'avaluació del biomarcador. Quan es tracta d'una finalitat no diagnòstica, com és el cas de les determinacions de biomarcadors en recerca, pensem que el GR és una avaluació massa estricta i que amb la CVR I podem donar afirmacions fiables sense por a l'error i que ens assegurin uns resultats amb qualitat.

Per tant, el càlcul de la imprecisió a partir de la desviació estàndard i sobretot del coeficient de variabilitat intraindividual i interindividual ens aporten una informació molt valuosa a l'hora de prendre decisions sobre la qualitat dels biomarcadors analitzats i la seva utilitat en laboratori de recerca. No obstant això, el coneixement del coeficient de variabilitat relatiu, l'error sistemàtic i l'error total analític de diferents biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu, la inflamació, i el perfil fèrric ens permet classificar els biomarcadors segons la seva qualitat, detectar riscos, i ens reafirma la presa de decisions a partir del coeficient de variabilitat, sempre tenint en compte la diferenciació entre la qualitat analítica exigible en diagnòstic o per finalitats de recerca.

4. LIMITACIONS DE L'ESTUDI

La limitació més important en aquest estudi és el nombre de participants aconseguits. Una població baixa fa que la variabilitat sigui major, pel que en futurs estudis s'hauria d'ampliar la N de participants, amb el mateix nombre d'homes i de dones per a cada grup d'edat.

L'inconvenient més gran que hem trobat en aquesta part de l'estudi és la dificultat per trobar persones "sanes", que no prenen cap tipus de complement alimentici, fàrmacs o cap altre tipus de tractament, tant en el grup de joves, com en el grup d'edat més gran.

També trobem que no podem posar-nos com a fita arribar al nivell màxim d'excel·lència qualitativa ja que els instruments que tenim disponibles no són suficientment automatitzats; per tant, es requereix la intervenció d'un analista.

Una altra limitació important és la de no poder mesurar la reproductibilitat dels biomarcadors estudiats. Poder observar si hi ha diferències entre laboratoris que analitzessin els mateixos biomarcadors que nosaltres, amb les mateixes mostres, seria el màxim de qualitat possible. Aquesta circumstància s'hauria de tenir en compte per a futurs estudis.

CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

CONCLUSIONS

- La normalitat, la simetria i la curtosi dels biomarcadors afecten la seva variabilitat, però no són paràmetres estadístics determinants per establir la qualitat dels biomarcadors.
- Els intervals de referència obtinguts pels biomarcadors estudiats es poden fer servir com a rangs de normalitat per a una població d'homes i dones de l'àmbit geogràfic mediterrani, caucàsics, d'edat adulta, que segueixen una dieta saludable.
- Tots els biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu presenten una bona precisió de la tècnica analítica. Els biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu que presenten millor precisió metodològica són la CAT, el GSHe, els TBARS, i el FRAP. Pel que fa a la resta, caldria avaluar el cost i la precisió d'altres tècniques analítiques més sensibles.
- Els biomarcadors relacionats amb la inflamació que presenten millor precisió són el colesterol total, l'Apo A1, l'Apo B, la sICAM-1 i la sVCAM-1. L'ús de tecnologia més sensible en la determinació del perfil lipídic, com la RMN-1H, no aporta una precisió significativament millor que la precisió de les tècniques de laboratori convencionals.
- L'ús de tecnologia més sensible, en la determinació del perfil lipídic, com la RMN-1H, no aporta una precisió significativament millor que la precisió de les tècniques de laboratori convencionals.

Conclusions

- El biomarcador del perfil fèrric que presenta una millor precisió del mètode analític és la transferrina, mentre que el ferro és el biomarcador que presenta millor precisió de la tècnica.
- Els biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu que presenten una millor relació entre la variabilitat metodològica i tècnica són la CAT, la SOD, la GPx, el GSHe, la vitamina C, el 8-isoprostà, els grups carbonils i la 8-OHdG.
- Els biomarcadors relacionats amb la inflamació que presenten una millor relació entre la variabilitat metodològica i tècnica són el colesterol total, els triglicèrids, el colesterol HDL, la hsPCR, la IL-6 i la PAI-1, mentre que dels analitzats per RMN-1H són el colesterol lliure, els triglicèrids, la VLDLC3-5 i la HDLC3-12.
- Els biomarcadors relacionats amb el perfil fèrric que presenten una millor relació entre la variabilitat metodològica i tècnica són el ferro i la ferritina.
- Tots els biomarcadors analitzats en aquest treball assoleixen un grau de qualitat segons el coeficient de variabilitat relatiu. Per tant, el càlcul del coeficient de variabilitat de la tècnica analítica (CVi) i del mètode analític (CVa) és útil per determinar el grau de qualitat analítica dels biomarcadors utilitzats en un laboratori de recerca.
- La classificació dels biomarcadors en funció del grau de qualitat analítica, és a dir, a partir de la imprecisió, l'error sistemàtic i l'error total analític, és un sistema de control de la qualitat excessiu per a un laboratori de recerca.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos

- Abuja, Peter M. and Riccardo Albertini. 2001. "Methods for Monitoring Oxidative Stress, Lipid Peroxidation and Oxidation Resistance of Lipoproteins." *Clinica Chimica Acta* 306(1–2):1–17.
- Ahima, Rexford S. and Mitchell A. Lazar. 2013. "The Health Risk of Obesity— Better Metrics Imperative." *Science (New York, N.Y.)* 339(March):1095–99.
- Albano, Emanuele. 2006. "Alcohol, Oxidative Stress and Free Radical Damage." *The Proceedings of the Nutrition Society* 65(3):278–90.
- Aman P. Mann and Takemi Tanaka. 2011. "E-Selectin: Its Role in Cancer and Potential as a Biomarker." *Translational Medicine*.
- Anon. 2015. "WHO | Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic." *WHO*. Retrieved May 5, 2017
- Aranda N, Valls RM, Romeu M, Sánchez-Martos V, Albaladejo R, Fernández-Castillejo S, Nogués R, Catalán Ú, Pedret A, Espinel A, Delgado MA, Arija V, Sola R, Giralt M. 2017. "Consumption of Seafood and Its Estimated Heavy Metals Are Associated with Lipid Profile and Oxidative Lipid Damage on Healthy Adults from a Spanish Mediterranean Area: A Cross-Sectional Study." *Environ Res* 156:644–51.
- Arturo M Terrés-Speziale. 2007. "SIX SIGMA: Determinación de Metas Analíticas." *Rev Mex Patol Clin* 54(1):28–39.
- Ashakiran, S., M. E. Sumati, and N.Krishna Murthy. 2011. "A Study of Pre-Analytical Variables in Clinical Biochemistry Laboratory." *Clinical Biochemistry* 44(10–11):944–45.

- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2000. *UNE-EN ISO/IEC 17025 : Requisitos Generales Relativos a La Competencia de Los Laboratorios de Ensayo Y Calibración : ISO/IEC 17025:1999*. Madrid : AENOR. Retrieved May 12, 2017
- Beilfuss, Julia, Vivian Berg, Monica Sneve, Rolf Jorde, and Elena Kamycheva. 2012. "Effects of a 1-Year Supplementation with Cholecalciferol on Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Insulin Resistance in Overweight and Obese Subjects." *Cytokine* 60:870–74.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316
- Benzie, I. F. and J. J. Strain. 1996. "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure Of 'antioxidant Power': The FRAP Assay." *Analytical biochemistry* 239:70–76.
- Biomarkers definitions working group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:89-95.
- Blankenstein, Marinus A. 2014. "Reference Intervals – Ever Met a Normal Person?" *Annals of Clinical Biochemistry* 52(1):5–6.
- Brugnara, Laura et al. 2012. "Metabolomics Approach for Analyzing the Effects of Exercise in Subjects with Type 1 Diabetes Mellitus." *PLoS ONE* 7.
- Buege JA, Aust SD. 1978. "Microsomal Lipid Peroxidation." *Methods Enzymol* 52:302–10.

- Cai, Z., & Yan, L.-J. (2013). Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 1(1), 15–26.
- Cao, G., H. M. Alessio, and R. G. Cutler. 1993. "Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants." *Free radical biology & medicine* 14:303–11.
- Catalán, Úrsula et al. 2013. "Biomarkers of Food Intake and Metabolite Differences between Plasma and Red Blood Cell Matrices; a Human Metabolomic Profile Approach." *Molecular bioSystems* 9:1411–22.
- Chabot, F., J. A. Mitchell, J. M. C. Gutteridge, and T. W. Evans. 1998. "Reactive Oxygen Species in Acute Lung Injury." *European Respiratory Journal* 11:745–57.
- Cherubini, Antonio, Carmelinda Ruggiero, M.Cristina Polidori, and Patrizia Mecocci. 2005. "Potential Markers of Oxidative Stress in Stroke." *Free Radical Biology and Medicine* 39(7):841–52.
- Christenson, Robert H. and Show Hong Duh. 2012. "Methodological and Analytic Considerations for Blood Biomarkers." *Progress in Cardiovascular Diseases* 55(1):25–33.
- Chung, Hae Young et al. 2009. "Molecular Inflammation: Underpinnings of Aging and Age-Related Diseases." *Ageing Research Reviews* 8(1):18–30.
- Claassen, J. A. H. R. 2005. "The Gold Standard: Not a Golden Standard." *BMJ (Clinical research ed.)* 330(7500):1121.

- Cohen G, Dembiec D, Marcus J. 1970. "Measurement of Catalase Activity in Tissue Extracts." *Anal Biochem* 34:30–38.
- Coppens, A., M. Speeckaert, and Joris Delanghe. 2010. "The Pre-Analytical Challenges of Routine Urinalysis." *Acta Clinica Belgica* 65(3):182–89.
- Coto-Montes, A. and R. Hardeland. 1999. "Antioxidative Effects of Melatonin in *Drosophila Melanogaster*: Antagonization of Damage Induced by the Inhibition of Catalase." *J Pineal Res* 27(3):154–58.
- Czerska, Marta, Karolina Mikołajewska, Marek Zieliński, Jolanta Gromadzińska, and Wojciech Wąsowicz. 2015. "Today's Oxidative Stress Markers." *Medycyna pracy* 66(3):393–405.
- Dąbrowska N, Wiczkowski A. 2017. "Analytics of Oxidative Stress Markers in the Early Diagnosis of Oxygen DNA Damage." *Adv Clin Exp Med* 26(1):155–66.
- Dalle-Donne, Isabella, Ranieri Rossi, Roberto Colombo, Daniela Giustarini, and Aldo Milzani. 2006. "Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease." *Clinical Chemistry* 52(4):601–23.
- Dalle-Donne, Isabella, Ranieri Rossi, Daniela Giustarini, Aldo Milzani, and Roberto Colombo. 2003. "Protein Carbonyl Groups as Biomarkers of Oxidative Stress." *Clinica Chimica Acta* 329(1–2):23–38.

- Das, Subhash K. et al. 2017. "Females Are Protected From Iron - Overload Cardiomyopathy Independent of Iron Metabolism: Key Role of Oxidative Stress." *Journal of the American Heart Association* 6(1):e003456.
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 473(7), 805–825.
- Dominici, Roberto, Paola Luraschi, and Carlo Franzini. 2004. "Measurement of C-Reactive Protein: Two High Sensitivity Methods Compared." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 18(5):280–84.
- Ďuračková, Z. 2010. "Some Current Insights into Oxidative Stress." *Physiological Research* 59(4):459–69.
- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA)s. 2011. "Guidance on the Scientific Requirements for Health Claims Related to Antioxidants , Oxidative Damage and Cardiovascular Health." *EFSA Journal* 9:1–13.
- Elosua, R., J. Marrugat, L. Molina, S. Pons, and E. Pujol. 1994. "Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish Men. The MARATHOM Investigators." *American journal of epidemiology* 139:1197–1209.
- Esteve Poblador, Sara, Eunice Bosch Pardo, and Mario Ortuño Alonso. 2010. "Implementación de La Variabilidad Biologica Como Objetivo de La Calidad En Un Laboratorio Clinico." *Revista del Laboratorio Clinico* 3(4):153–60.

- Esteve Poblador, Sara, Eunice Bosch Pardo, and Mario Ortuño Alonso. 2010. "Implementación de La Variabilidad Biológica Como Objetivo de La Calidad En Un Laboratorio Clínico." *Revista del Laboratorio Clínico* 3(4):153–60.
- Eurachem. 2011. *Terminology in Analytical Measurement - Introduction to VIM 3*. Retrieved (www.eurachem.org.).
- Eurachem. 2014. "Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics,." *Eurachem Guide* 1–70.
- Finazzi, Dario and Paolo Arosio. 2014. "Biology of Ferritin in Mammals: An Update on Iron Storage, Oxidative Damage and Neurodegeneration." *Archives of toxicology* 88(10):1787–1802.
- Flynn MR. 2007. "Analysis of Exposure Biomarker Relationships with the Johnson SBB Distribution." *Ann Occup Hyg.* 51(6):533–41.
- Garcia-Lario, Jv ;., V; Alvarez, F. Cava, a Hernandez, and M. Minchinela, Jimenez J;Perich, C; Ricos, C; Simon. 2001. "Aplicabilidad de Los Datos de Variabilidad biológica.1.Especificaciones de La Calidad Analítica." *Quimica Analitica* 20(6):450–56.
- Ghesquière, B., & Gevaert, K. (2014). Proteomics methods to study methionine oxidation. *Mass Spectrometry Reviews*.
- Ghiadoni, Lorenzo, Daniele Versari, Chiara Giannarelli, Francesco Faita, and Stefano Taddei. 2008. "Non-Invasive Diagnostic Tools for Investigating Endothelial Dysfunction." *Current pharmaceutical design* 14(35):3715–22.

- Giustarini, Daniela, Isabella Dalle-Donne, Dimitrios Tsikas, and Ranieri Rossi. 2009. "Oxidative Stress and Human Diseases: Origin, Link, Measurement, Mechanisms, and Biomarkers." *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 46(5–6):241–81.
- González, Manel Peris and Xavier Terés Peirau. 2007. "Guia de Prescripció de l'Exercici Físic per a La Salut (Guia PEFS)." *Barcelona: Direcció General de Salut Pública i Secretaria General de l'Esport* 182.
- González Peris, Manel. 2015. "El Plec Abdominal Com a Predictor Del Percentatge de Greix En Nens Esportistes." Universitat Rovira i Virgili. Retrieved May 5, 2017.
- Grund B, Sabin C. 2010. "Analysis of Biomarker Data: Logs, Odds Ratios, and Receiver Operating Characteristic Curves." *Curr Opin HIV AIDS* 5(6):473–79.
- Hadi, Hadi A. R., Cornelia S. Carr, and Jassim Al Suwaidi. 2005. "Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome." *Vascular health and risk management* 1(3):183–98.
- Halliwell, B. 2007. "Biochemistry of Oxidative Stress." *Biochemical Society transactions* 35(5):1147–50.
- Halliwell, Barry and John M. C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*.
- Halliwell, Barry and Matthew Whiteman. 2004. "Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do the Results Mean?" *British journal*

of pharmacology 142:231–55.

Hissin, P. J. and R. Hilf. 1976. "A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues." *Analytical biochemistry* 74:214–26.

Ho, Edwin, Keyvan Karimi Galouhahi, Chia-Chi Liu, Ravi Bhindi, and Gemma A. Figtree. 2013. "Biological Markers of Oxidative Stress: Applications to Cardiovascular Research and Practice." *Redox biology* 1(1):483–91.

Il'yasova, Dora, Peter Scarbrough, and Ivan Spasojevic. 2012. "Urinary Biomarkers of Oxidative Status." *Clinica Chimica Acta* 413(19–20):1446–53.

International Standard Organization. 2000. "ISO/IEC 9000 Sistemas de Gestión de La Calidad - Fundamentos Y Vocabulario." *International Standard* 2000:42. Retrieved May 12, 2017.

International Standard Organization. 2005. "ISO/IEC 17025 General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories." *International Standard* 2005:1–36.

Karimi Galouhahi, Keyvan, Charalambos Antoniades, Stephen J. Nicholls, Keith M. Channon, and Gemma a Figtree. 2015. "Redox Biomarkers in Cardiovascular Medicine." *European heart journal* 36(25):1576–82.

Karlsson, Torbjörn. 2015. "Mass Spectrometry Evaluation of the Hcpidin-25 Assay in the Differential Diagnosis of Iron Deficiency Anaemia with Concurrent Inflammation and Anaemia of Inflammation in Elderly Patients." *European Journal of*

Haematology 95(5):467–71.

- Khadir, A. et al. 2015. "Gender-Specific Association of Oxidative Stress and Inflammation with Cardiovascular Risk Factors in Arab Population." *Mediators Inflamm* 2015:512603.
- Kowalska K, Milnerowicz H. 2016. "The Influence of Age and Gender on the Pro/Antioxidant Status in Young Healthy People." *Ann Clin Lab Sci.* 46(5):480–88.
- Krintus, M., M. Kozinski, J. Kubica, and G. Sypniewska. 2014. "Critical Appraisal of Inflammatory Markers in Cardiovascular Risk Stratification." *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 51(5):263–79.
- Krishnan, Kim J. et al. 2008. "What Causes Mitochondrial DNA Deletions in Human Cells?" *Nature Genetics* 40(3):275–79.
- Kroese, Lona J. and Peter G. Scheffer. 2014. "8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and Cardiovascular Disease: A Systematic Review." *Current Atherosclerosis Reports* 16(11):1–8.
- Kvietys, Peter R. and D.Neil Granger. 2012. "Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Vascular Responses to Inflammation." *Free Radical Biology and Medicine* 52(3):556–92.
- Lam, K. W., L. Wang, B. S. Hong, and D. Treble. 1993. "Purification of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase from Bovine Retina." *Current eye research* 12(1):9–15.
- Lapice, Emanuela, Maria Masulli, and Olga Vaccaro. 2013a. "Iron Deficiency and Cardiovascular Disease: An Updated Review of the Evidence." *Current atherosclerosis reports* 15(10):358.

- Lapice, Emanuela, Maria Masulli, and Olga Vaccaro. 2013b. "Iron Deficiency and Cardiovascular Disease: An Updated Review of the Evidence." *Current atherosclerosis reports* 15:358.
- Lee, Chee K., Sarah J. Lord, Alan S. Coates, and R. John Simes. 2009. "Molecular Biomarkers to Individualise Treatment: Assessing the Evidence." *The Medical journal of Australia* 190(11):631–36.
- Lee, R. 2012. "Evaluating Oxidative Stress in Human Cardiovascular Disease: Methodological Aspects and Considerations." *Current Medicinal Chemistry* 19.
- Levine, R. L. et al. 1990. "Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins." *Methods in enzymology* 186:464–78.
- Lewis, Gregory D., Aarti Asnani, and Robert E. Gerszten. 2008. "Application of Metabolomics to Cardiovascular Biomarker and Pathway Discovery." *Journal of the American College of Cardiology* 52(2):117–23.
- Libby, Peter, Paul M. Ridker, and Göran K. Hansson. 2009. "Inflammation in Atherosclerosis. From Pathophysiology to Practice." *Journal of the American College of Cardiology* 54(23):2129–38.
- Martínez-González, Miguel Ángel 1957-, Almudena Sánchez-Villegas, Estefanía Toledo Atucha, and Francisco Javier Faulín. 2014. *Bioestadística Amigable*. 3a ed. Barcelona : Elsevier.
- Maryam Khoubnasabjafari, Khalil Ansarin and Abolghasem Jouyban. 2015. "Reliability of Malondialdehyde as a Biomarker of

- Oxidative Stress in Psychological Disorders." *Bioimpacts* 5(3):123–27.
- Mashima, Ryuichi, Takako Nakanishi-Ueda, and Yorihiro Yamamoto. 2003. "Simultaneous Determination of Methionine Sulfoxide and Methionine in Blood Plasma Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Analytical Biochemistry* 313(1):28–33.
- Mateos, Raquel, Elena Lecumberri, Sonia Ramos, Luis Goya, and Laura Bravo. 2005. "Determination of Malondialdehyde (MDA) by High-Performance Liquid Chromatography in Serum and Liver as a Biomarker for Oxidative Stress: Application to a Rat Model for Hypercholesterolemia and Evaluation of the Effect of Diets Rich in Phenolic Antioxidants from Fruits." *Journal of Chromatography B* 827(1):76–82.
- Mayeux, Richard. 2004. "Biomarkers: Potential Uses and Limitations." *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 1:182–88.
- Méndez, Lucía et al. 2014. "Protein Carbonylation Associated to High-Fat, High-Sucrose Diet and Its Metabolic Effects." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25(12):1243–53. Retrieved May 24, 2017
- Di Minno, Alessandro et al. 2016. "8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Literature." *Antioxidants & Redox Signaling* 24(10):548–55.

- Misra, H. P. and I. Fridovich. 1972. "The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase." *The Journal of biological chemistry* 247:3170–75.
- Montuschi, Paolo, Peter J. Barnes, and L.Jackson Roberts. 2004. "Isoprostanes: Markers and Mediators of Oxidative Stress." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(15):1791–1800.
- Muñoz, Manuel, Isabel Villar, and José Antonio García-Erce. 2009. "An Update on Iron Physiology." *World Journal of Gastroenterology* 15(37):4617–26.
- Neri, Monica et al. 2015. "A Meta-Analysis of Biomarkers Related to Oxidative Stress and Nitric Oxide Pathway in Migraine." *Cephalalgia* 35(10):931–37.
- Niki, Etsuo. 2010. "Assessment of Antioxidant Capacity in Vitro and in Vivo." *Free Radical Biology and Medicine* 49:503–15.
- Nordan RP, Richards CD, Gauldie J. 2001. "Measurement of Interleukin 6." in *Curr Protoc Immunol*.
- Ong, Kwok Leung et al. 2013. "Trends in C-Reactive Protein Levels in US Adults from 1999 to 2010." *Am J Epidemiol* 177(12):1430–42.
- Orino, Koichi and Kiyotaka Watanabe. 2008. "Molecular, Physiological and Clinical Aspects of the Iron Storage Protein Ferritin." *The Veterinary Journal* 178(2):191–201.
- Ortega, Fidel. 2010. "Estrategias Analíticas En La Investigación de Nuevos Biomarcadores." in *Monografía XXX: Biomarcadores:*

Analítica, diagnòstico y terapéutica.

- Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior. 2001. "Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe." *Journal of agricultural and food chemistry* 49:4619–26.
- Packard, R. R. and P. Libby. 2008. "Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction." *Clin Chem* 54(1):24–38.
- Parente EB. 2016. "Is Body Mass Index Still a Good Tool for Obesity Evaluation?" *Arch Endocrinol Metab* 60(6):507–9.
- Paulus, Patrick, Carla Jennewein, and Kai Zacharowski. 2011. "Biomarkers of Endothelial Dysfunction: Can They Help Us Deciphering Systemic Inflammation and Sepsis?" *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 16 Suppl 1:S11–21.
- Pedrosa, Ignacio et al. 2014. "Pruebas de Bondad de Ajuste En Distribuciones Simétricas, ¿qué Estadístico Utilizar?" *Universitas Psychologica* 14(1):245–54.
- Piccardi, Benedetta et al. 2017. "Blood Markers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in Cardioembolic Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis." *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 1–27.
- Pinchuk, I., H. Shoval, Y. Dotan, and D. Lichtenberg. 2012. "Evaluation of Antioxidants: Scope, Limitations and Relevance of Assays." *Chemistry and Physics of Lipids* 165(6):638–47.

- Plebani, M. 2010. "The Detection and Prevention of Errors in Laboratory Medicine." *Annals of Clinical Biochemistry* 47(2):101–10.
- Plebani, Mario. 2009. "Exploring the Iceberg of Errors in Laboratory Medicine." *Clinica Chimica Acta* 404(1):16–23.
- Poljsak, Borut, Dušan Šuput, and Irina Milisav. 2013. "Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:956792.
- Prescott, Jeffrey William. 2013. "Quantitative Imaging Biomarkers: The Application of Advanced Image Processing and Analysis to Clinical and Preclinical Decision Making." *Journal of Digital Imaging* 26(1):97–108.
- Rahal, Anu et al. 2014. "Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay." *BioMed Research International* 2014.
- Ren, Yao and Thomas Walczyk. 2014. "Quantification of Ferritin Bound Iron in Human Serum Using Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry." *Metallomics* 6(9):1709–17.
- Reuter, Simone, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi, and Bharat B. Aggarwal. 2010. "Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked?" *Free Radical Biology and Medicine* 49(11):1603–16.
- Richard, Marie Jeanne et al. 1992. "Malondialdehyde Kit Evaluated for Determining Plasma and Lipoprotein Fractions That React with

- Thiobarbituric Acid." *Clinical Chemistry* 38:704–9.
- Ricós, Carmen et al. 2010. "Variación; Biológica. Revisión Desde Una Perspectiva Práctica." *Revista del Laboratorio Clínico* 3(4):192–200.
- Rogowska-Wrzesinska, A., K. Wojdyla, O. Nedić, C. P. Baron, and H. R. Griffiths. 2014. "Analysis of Protein Carbonylation — Pitfalls and Promise in Commonly Used Methods." *Free Radical Research* 48(10):1145–62.
- Romeu, Marta et al. 2010. "Evaluation of Oxidative Stress Biomarkers in Patients with Chronic Renal Failure: A Case Control Study." *BMC research notes* 3:20.
- Romeu, Marta et al. 2016. "Virgin Olive Oil Enriched with Its Own Phenols or Complemented with Thyme Phenols Improves DNA Protection against Oxidation and Antioxidant Enzyme Activity in Hyperlipidemic Subjects." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(9):1879–88.
- Roth, Erich, Nicole Manhart, and Barbara Wessner. 2004. "Assessing the Antioxidative Status in Critically Ill Patients." *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 7(2):161–68.
- Shah, Nirav R., Eric R. Braverman, JR Cerhan, AJ Flint, and L. Hannan. 2012. "Measuring Adiposity in Patients: The Utility of Body Mass Index (BMI), Percent Body Fat, and Leptin" edited by Q. Nizami. *PLoS ONE* 7(4):e33308.
- da Silva, Rose Mary Ferreira Lisboa. 2017. "Influence of Inflammation and Atherosclerosis in Atrial Fibrillation." *Current Atherosclerosis*

Reports 19(1):2.

Silvestre, V., S. Goupry, M. Trierweiler, R. Robins, and S. Akoka. 2001.

“Determination of Substrate and Product Concentrations in Lactic Acid Bacterial Fermentations by Proton NMR Using the ERETIC Method.” *Analytical chemistry* 73(8):1862–68.

Speziale, A. M. Terrés. 2007. “Six Sigma: Determinación de Metas

Analíticas Con Base En La Variabilidad Biológica Y La Evolución Tecnológica.” *Rev Mex Patol Clin* 54:28–39.

Sturtz, Lori A., Kerstin Diekert, Laran T. Jensen, Roland Lill, and Valeria

Cizewski Culotta. 2001. “A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria. A Physiological Role for SOD1 in Guarding against Mitochondrial Oxidative Damage.” *Journal of Biological Chemistry* 276(41):38084–89.

Takashima, Mizuki et al. 2012. “Assessment of Antioxidant Capacity for

Scavenging Free Radicals in Vitro: A Rational Basis and Practical Application.” *Free Radical Biology and Medicine* 52(7):1242–52.

Taverniers, Isabel, Marc De Loose, and Erik Van Bockstaele. 2004.

“Trends in Quality in the Analytical Laboratory. I. Traceability and Measurement Uncertainty of Analytical Results.” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 23(7):480–90.

Terrés-Speziale, Arturo M. 2006. “Estimación de La Incertidumbre Y de

La Variabilidad Total En El Laboratorio Clínico.” *Rev Mex Patol Clin* 53(4):185–96.

- Thaipong, Kriengsak, Unaroj Boonprakob, Kevin Crosby, Luis Cisneros-Zevallos, and David Hawkins Byrne. 2006. "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts." *Journal of Food Composition and Analysis* 19(6):669–75.
- Thammasitboon, Satid, Supat Thammasitboon, and Geeta Singhal. 2013. "System-Related Factors Contributing to Diagnostic Errors." *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 43(9):242–47.
- Timo Tuovinen, Riikka Rytty, Virpi Moilanen, Ahmed Abou Elseoud, Juha Veijola, Anne M. Remes and Vesa J. Kiviniemi. 2016. "The Effect of Gray Matter ICA and Coefficient of Variation Mapping of BOLD Data on the Detection of Functional Connectivity Changes in Alzheimer's Disease and bvFTD." *Front Hum Neurosci* 10:680.
- Vasan, Ramachandran S. 2006. "Biomarkers of Cardiovascular Disease: Molecular Basis and Practical Considerations." *Circulation* 113:2335–62.
- Victor, Victor M., Milagros Rocha, and Monica De La Fuente. 2004. "Immune Cells: Free Radicals and Antioxidants in Sepsis." *International Immunopharmacology* 4:327–47.
- Westgard, James O, PhD et al. 2012. *Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Approved Guideline-Third Edition*.

- Wheeler, C. R., J. A. Salzman, N. M. Elsayed, S. T. Omaye, and D. W. Korte Jr. 1990. "Automated Assays for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, and Glutathione Reductase Activity." *Anal Biochem* 184:193–99.
- Wittmann, C. et al. 2012. "Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin." *Advances in Hematology* 2012.
- World Health Organization. 2010. "Recomendaciones Mundiales Sobre Actividad Física Para La Salud." *Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication*.
- Wu, Peter S. C. and Gottfried Otting. 2005. "Rapid Pulse Length Determination in High-Resolution NMR." *Journal of Magnetic Resonance* 176(1):115–19.
- Wu, Tianying, Nader Rifai, L.Jackson Roberts, Walter C. Willett, and Eric B. Rimm. 2004. "Stability of Measurements of Biomarkers of Oxidative Stress in Blood Over 36 Hours." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 13(8):1399 LP-1402.
- Yin, B. et al. 1995. "Determination of 8-Hydroxydeoxyguanosine by an Immunoaffinity Chromatography-Monoclonal Antibody-Based ELISA." *Free radical biology & medicine* 18:1023–32.
- Zakynthinos, Epaminondas and Nikolitsa Pappa. 2009. "Inflammatory Biomarkers in Coronary Artery Disease." *Journal of Cardiology* 53(3):317–33.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Avaluació de la qualitat analítica de diferents biomarcadors de l'estrès oxidatiu
i la inflamació en una població sana

Vanessa Sánchez Martos