

Xavier Ortín Font

DISTRÈS OXIDATIU EN PACIENTS AMB ESTADIS
INICIALS DE LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA.
VALORACIÓ I CORRELACIÓ AMB
FACTORS PRONÒSTICS

TESI DOCTORAL

Dirigida per la Dra. Montserrat Giralt Batista
i per la Dra. Marta Romeu Ferran
Departament de Farmacologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Facultat de Medicina
i Ciències de la Salut

Reus, 2010



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES
CÀTEDRA DE FARMACOLOGIA I TERAPÈUTICA
CARRER SANT LLORENÇ, 21
TEL. 977 - 75 93 78
FAX 977 - 75 93 22
43201 - REUS

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat “Distrès oxidatiu en pacients amb estadis inicials de leucèmia limfàtica crònica. Valoració i correlació amb factors pronòstics”, que presenta Xaver Ortín Font per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat.

Reus, 23 de juliol de 2010-07-23

Els directors de la tesi doctoral

Dra. Montserrat Giralt Batista

Dra. Marta Romeu Ferran

AGRAÏMENTS

Voldria agrair a totes aquelles persones que, d'alguna manera, mitjançant el seu recolzament i col·laboració, m'han fet costat en les diverses etapes de realització d'aquesta tesi i que sense cap d'elles no hauria estat possible. I a tots els que han contribuït de manera directa o indirecta en la realització d'aquest treball d'investigació.

A la Dra. Romeu per la seva tasca i temps invertits, de manera constant, en aquest treball i sense els quals no hauria estat possible. També pels seus coneixements i treballs previs que han servit de base per a l'elaboració d'aquesta tesi.

A la Dra. Giralt per les ensenyances, orientacions i rigorositat científica que han fet possible la realització d'aquesta tesi. A ella i a la Dra. Nogués agraeixo la dedicació científica donada.

Al Dr. Mallol per la confiança, el recolzament i la dedicació donats en tot moment.

A tota la Unitat de Farmacologia, especialment a Vanessa Sánchez per la feina realitzada des del punt de vista tècnic.

Al Servei Lingüístic de la Universitat Rovira i Virgili, especialment al Sr. Jordi de Bofarull i a la Sra. Isabel Obrados, per la revisió d'aquesta tesi.

Al Servei d'Hematologia, metges i metgesses, personal d'infermeria i tècnics de laboratori, i per extensió a tot l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, per haver-me permès desenvolupar aquesta tesi, i per les facilitats i suport donats en totes les fases del treball. A tots els voluntaris que s'han deixat extreure sang, ja que han servit com a mostres control de l'estudi.

A tots els malalts que han donat el seu consentiment per participar en l'estudi. Ells són la motivació diària per a seguir treballant i aprenent cada dia.

Al Servei d'Hematologia de l'Hospital Joan XXIII, Dr. Boixadera, Dra. Escoda, Dr. Llorente i Dra. Ugarriza, per haver-me introduït i format en l'hematologia i per encomanar-me les ganes d'aprendre i de seguir endavant per aquest camí.

Als meus pares, a la Fran i a la Len. Models i guies en tot i per a tot.

A Josep M^a, Jesús, Marcel, Emma, Jesús i Elena.

A Evelín, gràcies per la teva paciència, ajuda i recolzament.

A la petita Ariadna, per la teva mirada. A la petita Íngrid, pel teu somriure.

El sentiment, que ens mena al progrès
i ens impulsa a seguir investigant en la ciència
per aconseguir nous horitzons,
neix justament de la insatisfacció,
d'una necessitat d'estar cada vegada millor

Joan Corbella Roig

ÍNDEX

	1
1. LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA	3
1.1. GENERALITATS	3
1.1.1. DEFINICIÓ I DIAGNÒSTIC	4
1.1.2. MORFOLOGIA LIMFOCITÀRIA I AFECTACIÓ MEDULAR	6
1.1.3. PATRÓ IMMUNOFENOTÍPIC	8
1.1.4. EXPLORACIONS DIAGNÒSTIQUES COMPLEMENTÀRIES	11
1.2. BIOLOGIA I ORIGEN DE L'LLC	13
1.3. EPIDEMIOLOGIA DE L'LLC	17
1.4. MANIFESTACIONS CLÍNiques I COMPLICACIONS	18
1.4.1. MANIFESTACIONS I CURS CLÍNIC	18
1.4.2. COMPLICACIONS EN EL CURS CLÍNIC	20
1.5. ORIENTACIÓ TERAPÈUTICA GENERAL DE L'LLC	22
1.5.1. GENERALITATS I PAUTES DE TRACTAMENT	22
1.5.2. RECOMANACIONS DE TRACTAMENT	28
1.6. FACTORS PRONÒSTICS	31
1.6.1. GENERALITATS	31
1.6.2. FACTORS PRONÒSTICS CLÀSSICS	35
1.6.2.1. ELS SISTEMES D'ESTADIATGE	35
1.6.2.2. HISTOLOGIA DE MOLL DE L'OS	38
1.6.2.3. TEMPS DE DUPLICACIÓ LIMFOCITÀRIA	39
1.6.2.4. MORFOLOGIA LIMFOCITÀRIA	39

1.6.2.5.	MARCADORS SÈRICS	40
1.6.3.	NOUS MARCADORS PRONÒSTICS	42
1.6.3.1.	ESTAT MUTACIONAL DE LA REGIÓ VARIABLE DE LA CADENA PESADA DE LES IMMUNOGLOBULINES (IGV _H)	43
1.6.3.2.	EXPRESSIÓ DE CD38	45
1.6.3.3.	PROTEÏNA 70 ASSOCIADA A ZETA (ZAP-70)	47
1.6.3.4.	ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES	49
1.6.3.5.	TOMOGRAFIA COMPUTERITZADA	54
1.6.3.6.	DETERMINACIÓ DE RESPOSTA PER MALALTIA MÍNIMA RESIDUAL	54
1.6.4.	FACTORS PRONÒSTICS. APLICACIONS PRÀCTIQUES	58
1.6.5.	VALIDACIÓ DE MARCADORS PRONÒSTICS ADDICIONALS	64
2.	RADICALS LLIURES I ESPÈCIES REACTIVES DE L'OXIGEN	67
2.1.	GENERALITATS	67
2.1.1.	ORIGEN DELS RADICALS LLIURES	69
2.1.2.	TIPUS D'ERO	72
2.1.3.	MECANISMES DE PRODUCCIÓ DELS RLLO I LES ERO	74
2.1.4.	FONTS D'RLLO I D'ERO	78
2.2.	SISTEMES ANTIOXIDANTS	82
3.	EL DISTRÈS OXIDATIU	88
3.1.	EL DANY OXIDATIU: LÍPIDS, PROTEÏNES I DNA	92
3.1.1.	DANY OXIDATIU ALS LÍPIDS	92
3.1.2.	DANY OXIDATIU A LES PROTEÏNES	94

3.1.3. DANY OXIDATIU AL DNA	95
4. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU	97
4.1. BIOMARCADORS DE L'ESTAT OXIDATIU	98
4.1.1. PRODUCTES DEL DISTRÈS OXIDATIU	100
4.1.1.1. PROMOTORS	100
4.1.1.2. INHIBIDORS	101
4.1.1.2.1. ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR	101
4.1.1.2.2. ENZIMS I MACROMOLÈCULES	104
4.1.1.3. PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ	108
4.1.1.3.1. PEROXIDACIÓ DE LÍPIDS	109
4.1.1.3.2. PEROXIDACIÓ DE PROTEÏNES	110
4.1.1.3.3. PEROXIDACIÓ DEL DNA	111
4.1.2. SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ	114
4.1.3. CAPACITAT ANTIOXIDANT	115
4.2. EL DISTRÈS OXIDATIU EN DIFERENTS SITUACIONS	116
4.2.1. DISTRÈS OXIDATIU EN SITUACIONS PATOLÒGIQUES	116
4.2.2. DISTRÈS OXIDATIU EN SITUACIONS FISIOLÒGIQUES	117
5. RELACIÓ ENTRE LLC I RADICALS LLIURES	118
5.1. CARCINOGENÈSI DELS RLO EN LES SLPC	118
5.2. NIVELL DE DISTRÈS OXIDATIU I LLC	120
5.3. TERÀPIA D'LLC I DISTRÈS OXIDATIU	123

HIPÒTESI I OBJECTIUS	129
MATERIAL I MÈTODES	139
1. DESCRIPCIÓ DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI	141
1.1. PACIENTS AMB LLC	141
1.2. CONTROLS SANS	148
2. OBTENCIÓ, PREPARACIÓ I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES	149
2.1. TUB D'HEPARINA-LITI	149
2.2. TUB D'EDTA	151
3. MÈTODES UTILITZATS	152
3.1. DETERMINACIÓ DE FACTORS PRONÒSTICS	152
3.1.1. DETERMINACIONS ANALÍTIQUES	152
3.1.2. DETERMINACIONS RADIOLÒGIQUES	153
3.1.3. DETERMINACIONS DE LA MORFOLOGIA LIMFOCITÀRIA	153
3.1.4. DETERMINACIONS D'IMMUNOFENOTIP	154
3.1.5. DETERMINACIONS CITOGENÈTIQUES I FISH	155
3.2. DETERMINACIONS D'ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR	157
3.2.1. GLUTATIÓ OXIDAT/REDUÏT	157

3.3.	DETERMINACIÓ D'ENZIMS ANTIOXIDANTS	159
3.3.1.	SUPERÒXID-DISMUTASA	159
3.3.2.	GLUTATIÓ-PEROXIDASA	160
3.3.3.	CATALASA	161
3.3.4.	GLUTATIÓ-REDUCTASA	162
3.4.	DETERMINACIÓ DE PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA (TBARS)	163
3.5.	DETERMINACIÓ DE LA CAPACITAT ANTIOXIDANT (ORAC)	164
4.	PUNTUACIÓ GLOBAL DEL DISTRÈS OXIDATIU	165
4.1.	PUNTUACIÓ DELS ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR	166
4.1.1.	PUNTUACIÓ DEL GLUTATIÓ OXIDAT/REDUÏT	166
4.2.	PUNTUACIÓ DELS ENZIMS I ANTIOXIDANTS	168
4.2.1.	PUNTUACIÓ DE LA SUPERÒXID-DISMUTASA	168
4.2.2.	PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ-PEROXIDASA	169
4.2.3.	PUNTUACIÓ DE LA CATALASA	169
4.2.4.	PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ-REDUCTASA	171
4.3.	PUNTUACIÓ DELS PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA	172
5.	ESTUDI ESTADÍSTIC	173

RESULTATS	177
1. DISTRÈS OXIDATIU EN CONTROLS SANS	179
1.1. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU	179
1.2. RANGS DE NORMALITAT	186
2. VALORACIÓ DELS FACTORS DE RISC EN L'LLC	189
2.1. PARÀMETRES DEMOGRÀFICS DE LA MOSTRA	189
2.2. DADES ANALÍTIQUES DE LA MOSTRA	192
2.3. FACTORS PRONÒSTICS	194
2.3.1. FACTORS PRONÒSTICS CLÀSSICS	196
2.3.2. NOUS FACTORS PRONÒSTICS	197
3. DISTRÈS OXIDATIU EN ELS ESTADIS INICIALS D'LLC	200
3.1. VALORACIÓ GLOBAL DEL DISTRÈS OXIDATIU	200
3.2. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU	201
3.2.1. VALORACIÓ DE LA PDO	203
3.2.2. VALORACIÓ DE LA CAPACITAT ANTIOXIDANT	204
3.2.3. VALORACIÓ CONJUNTA DELS BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU	207
3.3. DISTRÈS OXIDATIU I FACTORS PRONÒSTICS	211
3.3.1. PUNTUACIÓ DIAGNÒSTICA D'LLC	211
3.3.2. CD38	213
3.3.3. ZAP70	214

3.3.4. ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES	216
3.3.5. LDH I B2M	218
3.3.6. DISTRÈS OXIDATIU I FACTORS DE MAL PRONÒSTIC	223
DISCUSSIÓ	227
CONCLUSIONS	243
BIBLIOGRAFIA	249
PUBLICACIONS PRÒPIES	271
COMUNICACIONS A CONGRESSOS	273
ANNEXOS	275
1. CLASSIFICACIÓ DE L'OMS PER A NEOPLÀSIES LIMFOIDES DE CÈL·LULES B MADURES	277
2. LIMFOPOESI	279
3. MOLÈCULES CD	283
4. DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL DE LES SLPC-B	286
5. DOCUMENTS DE CONSENTIMENT I D'INFORMACIÓ LLIURATS ALS PARTICIPANTS DE L'ESTUDI	287
ABREVIACIONS	291

ÍNDEX FIGURES I TAULES

INDEX FIGURES

Figura 1	LLC-B. Morfologia limfoide i ombres de Gumprecht	7
Figures 2 i 3	Morfologia de prolimfòcits. Leucèmia prolimfocítica	7
Figura 4	Patrons d'infiltració medul·lar	8
Figura 5	Síndrome de Richter. Cèl·lules atípiques d'LLC amb immunoblastes	21
Figura 6	Estat dels spins direccionals	69
Figura 7	Vies de formació de les ERO	77
Figura 8	Característiques de les ERO	81
Figura 9	Balança prooxidant-antioxidant	90
Figura 10	Seqüència de reaccions bàsiques en la lipoperoxidació	93
Figura 11	Principals biomarcadors del distrès oxidatiu	99
Figura 12	Malalties i situacions fisiopatològiques en les quals s'ha determinat l'existència de distrès oxidatiu amb biomarcadors de peroxidació	113
Figura 13	Relacions metabòliques relacionades amb la síntesi de glutatió en eritròcits humans	181
Figura 14	Principals etapes de formació-eliminació de les ERO	182
Figura 15	Diagrama de flux de l'estudi amb pacients d'LLC	191
Figura 16	Distribució de freqüències de PDO	203
Figura 17	Diagrama de correlacions entre ORAC i glutatió	205
Figura 18	Diagrama de correlacions entre ORAC i SOD, i entre ORAC i GPx	206
Figura 19	PDO dels subgrups d'LLC CD38 negatiu i positiu	213
Figura 20	PDO dels subgrups d'LLC ZAP70 negatiu i positiu	216
Figura 21	PDO dels subgrups d'LLC segons cariotip	218

Figura 22	PDO dels subgrups d'LLC segons beta-2-microglobulina	219
Figura 23	Diagrama de correlacions entre GSH i beta-2-microglobulina	222
Figura 24	Proposta d'un model d'incorporació de la PDO en els factors pronòstics de l'LLC	224

INDEX TAULES

Taula 1	Puntuació pel diagnòstic diferencial d'LLC amb altres SLPC	10
Taula 2	Patró de diagnòstic de l'LLC	12
Taula 3	Mecanismes fisiopatològics involucrats en l'LLC	15
Taula 4	Indicacions d'inici de tractament en LLC	23
Taula 5	Esquemes terapèutics emprats en LLC	27
Taula 6	Proposta de tractament en primera i segona línia per a l'LLC	28
Taula 7	Nous marcadors pronòstics	34
Taula 8	Factors pronòstics i risc en l'LLC	35
Taula 9	Estadis clínics en l'LLC	37
Taula 10	Mitjana de supervivència d'acord amb els estadis de Rai i Binet	38
Taula 11	Incidència d'anormalitats cromosòmiques en 325 malalts d'LLC	49
Taula 12	Anàlisi cromosòmica: Ús de FISH com a dada pronòstica	53
Taula 13	Criteris de resposta al tractament segons el NCI-WG	56
Taula 14	Cursos potencials associats a marcadors pronòstics	57
Taula 15	Índex pronòstic basat en la presència de factors de risc	61
Taula 16	Supervivència global (OS) i risc relatiu (RR) de mortalitat segons els grups de risc (n= 1.617)	61

Taula 17	Grups de risc segons el CLL4 trial	62
Taula 18	Grups de risc de pacients basats amb estadis inicials d'LLC	62
Taula 19	Índex pronòstic basat en factors de risc	63
Taula 20	Factors de mal pronòstic en l'LLC	64
Taula 21	Espècies reactives de l'oxigen (ERO)	72
Taula 22	Característiques principals dels biomarcadors de capacitat antioxidant	115
Taula 23	Mètodes emprats en les diferents variables analítiques	144
Taula 24	Característiques principals de les tècniques utilitzades per determinar els factors pronòstics d'LLC	146
Taula 25	Característiques principals de les tècniques utilitzades per determinar el distrès oxidatiu	147
Taula 26	Sistema de puntuació diagnòstica	154
Taula 27	Valors pronòstics assignats als pacients amb LLC segons troballes al cariotip	156
Taula 28	Puntuació PDO de la mostra de controls	185
Taula 29	Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup control. Rangs de normalitat	188
Taula 30	Dades demogràfiques, de seguiment i analítiques de la mostra de pacients	193
Taula 31	Paràmetres valorats a l'estudi i significació pronòstica	195
Taula 32	Troballes de l'anàlisi citogenètica de la mostra	199
Taula 33	Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup control i de pacients d'LLC	202
Taula 34	Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons subgrups d'score diagnòstic	212
Taula 35	Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons subgrups amb ZAP70 negatiu i ZAP70 positiu	215
Taula 36	Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons cariotip	217
Taula 37	Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons LDH	220

Taula 38	Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons B2M	221
Taula 39	Freqüències d'NFMP en cada una de les PDO obtingudes en els pacients amb LLC	223
Taula 40	Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons NFMP	226

INTRODUCCIÓ

1. LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA

1.1. GENERALITATS

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és una malaltia inclosa dintre les anomenades síndromes limfoproliferatives cròniques (SLPC) de baix grau de malignitat, caracteritzada per la proliferació i acumulació de limfòcits immunocompetents, de mida petita, aspecte madur i fenotip de limfòcit B.

Les manifestacions clíniques d'aquesta malaltia es deuen a la infiltració progressiva de la medulla òssia, ganglis limfàtics i altres teixits per aquestes cèl·lules, així com les alteracions immunològiques que acompanyen la malaltia.

L'LLC és la forma de leucèmia més freqüent dels països occidentals, que es presenta, generalment, en persones d'edat adulta i la seva incidència augmenta amb l'edat.

El curs clínic és molt variable entre els malalts i la mitjana de supervivència és d'uns 10 anys. Hi ha malalts, però, que moren al poc temps de ser diagnosticats, mentre que d'altres no tenen afectada la seva esperança de vida.

Encara que, en la majoria dels casos, l'LLC és una malaltia incurable, en els darrers anys s'han assolit importants progressos en el seu tractament amb la

introducció de nous fàrmacs i pautes de quimioteràpia molt més efectives, així com la millora en procediments terapèutics com són les diferents modalitats de progenitors hematopoètics (Montserrat, 2006a).

L'LLC és la síndrome limfoproliferativa crònica que constitueix el tipus de leucèmia més freqüent dels països occidentals, amb acumulació i proliferació de limfòcits madurs. Afecta, generalment, persones en edat adulta amb manifestacions clíniques degudes a la infiltració progressiva de medul·la òssia i ganglis. El curs clínic, però, és molt variable entre els malalts.

Així, donada la gran variabilitat clínica i la millora en les teràpies de les quals es disposa, en els darrers anys s'està donant gran importància a la valoració i recerca de factors pronòstics que puguin predir, de manera acurada, en el moment del diagnòstic, quins pacients tindran una probabilitat alta de progressió i, per tant, es beneficiaran d'un tractament precoç malgrat que es trobin en estadis inicials de la malaltia (Wierda i col·l., 2006).

1.1.1. DEFINICIÓ I DIAGNÒSTIC

La classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) distingeix les SLPC partint d'una combinació de trastorns clínics, trets morfològics, immunofenotípics i genètics (Harris i col·l., 1999). En general, es consideren

com a malalties cròniques de pacients d'edat avançada, que es creu que moriran per causes no relacionades amb la malaltia. Aquestes assumpcions actualment, però, no són acceptables a causa dels avenços ocorreguts en aquest camp en els darrers anys (Shanafelt i col·l., 2004).

Dintre d'aquestes síndromes, els trastorns de baix grau de cèl·lula B, com l'LLC, encara s'avaluen sense distingir-los, entre si són clínicament indolents o bé són agressius.

L'OMS distingeix l'LLC d'altres SLPC de baix grau amb les quals s'ha de fer el diagnòstic diferencial. Les principals SLPC de baix grau que inclou l'OMS en la seva classificació són:

- ▣ limfoma limfoplasmocític i malaltia de Waldenström
- ▣ leucèmia prolimfocítica
- ▣ limfoma del mantell
- ▣ limfoma esplènic amb limfòcits vellosos
- ▣ limfoma de la zona marginal incloent el limfoma B nodal monocitoide

Es reconeix l'LLC i el limfoma limfocític de cèl·lula petita (SLL) com una mateixa categoria, ja que les dues variants sorgeixen de la mateixa cèl·lula, i la principal diferència és el teixit involucrat: sang o moll de l'os (MO) -en el cas d'LLC- i nòduls limfàtics i altres òrgans limfoides en SLL (Walewski i col·l., 2005).

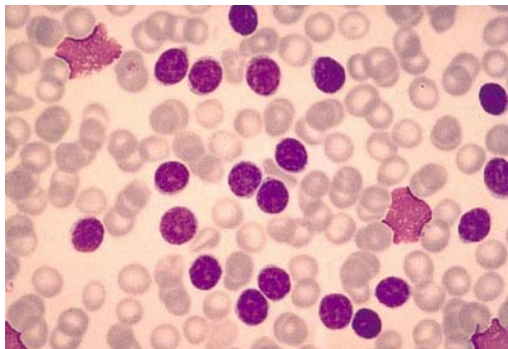
1.1.2.MORFOLOGIA LIMFOCITÀRIA I AFECTACIÓ MEDULLAR

En l'LLC, la morfologia que presenten els limfòcits neoplàsics és generalment de limfòcit petit i madur (figura 1), encara que hi ha casos amb més variabilitat i atipia morfològica. Ocasionalment es pot veure un nombre augmentat de prolimfòcits (figures 2 i 3), ja al diagnòstic o en el curs de la malaltia, troballa que implicarà un curs agressiu o ràpidament progressiu (transformació prolimfocítica).

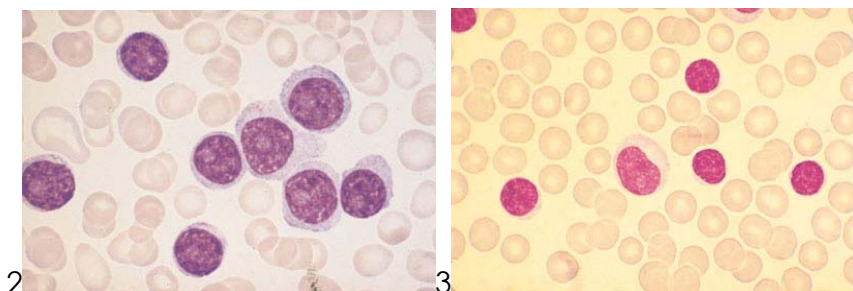
Definicions

- *Leucèmia limfàtica crònica*: SLPC, amb presència de limfocitosi absoluta superior a 5.000 limfòcits/ μ L a sang perifèrica. Els limfòcits tenen aspecte madur, amb menys d'un 55% de cèl·lules atípiques (p. ex. prolimfòcits), expressen CD5, CD19, CD20, CD23 i tenen baixa densitat d'immunoglobulines de superfície (sIg) amb restricció de cadenes lleugeres.
- *Transformació prolimfocítica*: LLC amb més de 55% de prolimfòcits a sang perifèrica o moll de l'os.

Extret de Chiorazzi i col·l., 2005

Figura 1. LLC-B Morfologia limfoide i ombres de Gumprecht

Extret de *Fondo de Imagen en Hematología*. Asociación Española de Hematología i Hemoterapia (AEHH).

Figures 2 i 3. Morfologia de prolimfòcits. Leucèmia prolimfocítica

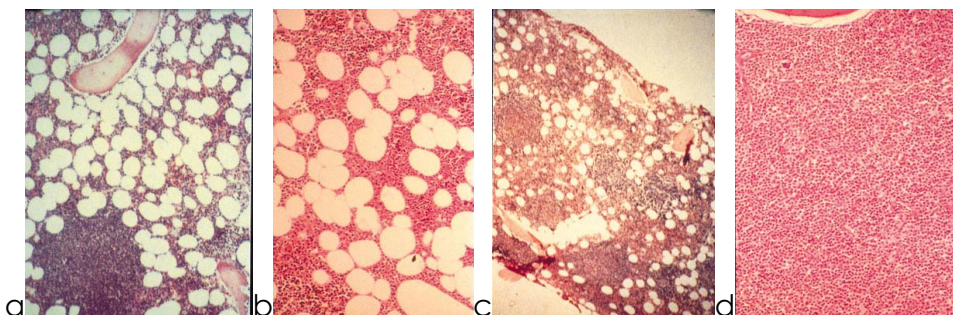
Extret de *Fondo de Imagen en Hematología*. AEHH.

En l'LLC sempre hi ha afectació de la medul·la òssia. Aquesta afectació medullar es presenta en forma de diferents graus d'intensitat d'infiltració per limfòcits. S'han definit quatre patrons d'afectació d'MO (figura 4):

- nodular
- intersticial
- mixt
- difús

En el patró d'afectació de moll de l'os per LLC tipus nodular, els limfòcits s'agreguen en formacions arrodonides de mida més gran que un fol·licle limfoide no patològic i, a més, es localitzen a nivell paratrabecular. En la forma intersticial, la infiltració limfocitària respecta l'arquitectura normal, barrejant-se amb la cel·lularitat hematopoètica i adipòcits. En el tipus mixt, s'associen característiques morfològiques de les dues anteriors. En la forma difusa hi ha invasió limfocitària massiva (Woessner i Florensa, 2000).

Figura 4. Patrons d'infiltració medular



Extret de Fondo de Imagen en Hematología. AEHH.

a) Nodular; b) Intersticial; c) Mixt; d) Difús.

1.1.3. PATRÓ IMMUNOFENOTÍPIC

L'estudi immunofenotípic és de gran ajuda diagnòstica en l'LLC, ja que els limfòcits de la malaltia presenten un patró d'expressió de marcadors típic que

permet el diagnòstic diferencial amb altres SLPC de cèl·lula limfocitària B (SLPC-B).

S'ha de realitzar en tots els casos que requereixin tractament i, també, especialment, en els casos amb recomptes limfocitaris baixos i en pacients que tenen morfologia limfocitària atípica, per la gran ajuda diagnòstica que ofereix (Oscier i col·l., 2004).

El perfil d'expressió antigènica correspon a un fenotip de limfòcit madur activat (Pangalis i col·l., 1999) amb les característiques següents:

- Expressen sempre marcadors immunofenotípics pan-B (CD19, CD20).
- Són CD5 positius (CD5+) en més del 90% dels casos .
- Tenen una expressió dèbil d'slg, i que són, generalment, de tipus Ig M i/o Ig D.
- S'expressa activació de l'antigen CD23 en la majoria dels casos (75% a 90%).
- CD22 s'expressa en un 40% dels casos i ho fa d'una forma dèbil..
- FCM7 és positiu en menys del 20% dels casos.

Altres característiques de l'immunofenotip que cal destacar són que CD38 s'expressa en aproximadament el 20% dels casos i s'associa a una morfologia atípica, i, com veurem més endavant, a mal pronòstic. Els limfòcits d'LLC són CD10 negatius (CD10-) i Cd79b s'expressa només en un 5% dels casos.

S'ha desenvolupat un score diagnòstic en base un panell de cinc anticossos monoclonals. Valorant la seva presència o absència, així com la seva intensitat d'expressió, s'atorga un punt segons els criteris preestablerts (taula 1). Segons la suma d'aquesta puntuació s'ha vist que:

- 92% dels pacients ja diagnosticats d'LLC tenen una puntuació de 4 o 5.
- 6% tenen una puntuació de 3.
- 2% puntuen 1 o 2 (Matutes i col·l., 1994).

Es millora el rendiment d'aquest sistema de puntuació diagnòstica amb la incorporació de l'anticòs monoclonal CD79b a la valoració global (Moreau i col·l., 1997).

Taula 1. Puntuació per al diagnòstic diferencial de l'LLC amb altres SLPC

Marcador	Puntuació	
	1 punt	0 punts
slg	Expressió dèbil	Moderada/Intensa
CD5	Positiu	Negatiu
CD23	Positiu	Negatiu
FMC7	Negatiu	Positiu
CD22membrana/CD79b	Dèbil/Negatiu	Moderat/Intens

Extret de Moreau i col·l., 1997.

La realització de l'immunofenotip és bàsica no només en el diagnòstic de l'LLC, sinó també en el diagnòstic diferencial, en la determinació pronòstica i en la valoració de la resposta al tractament i seguiment de la malaltia.

1.1.4. EXPLORACIONS DIAGNÒSTIQUES COMPLEMENTÀRIES

En l'estudi diagnòstic de l'LLC es recomanen les investigacions addicionals següents:

- Test d'antiglobulina (Coombs) directa: essencial en tots els pacients amb anèmia i abans d'iniciar qualsevol tractament.
- Recompte reticulocitari.
- Bioquímica renal i hepàtica, nivells d'immunoglobulines.
- Radiografia de tòrax.
- Aspiració medul·lar i biòpsia d'MO:

Encara que essencials, la presència de centres proliferatius i l'absència de focus paratrabeculars positius per a ciclina D1 reforça el diagnòstic en casos morfològicament atípics i baixa puntuació d'immunofenotip. L'examen d'MO també és d'utilitat per determinar les causes de citopènies i té informació pronòstica per assegurar la resposta al tractament.

La biòpsia limfàtica no és necessària per al diagnòstic d'LLC típica, però pot estar indicada en els casos de diagnòstic incert.

Al llarg d'aquests trenta anys han ocorregut canvis significatius en el patró de diagnòstic d'LLC (taula 2). Així, s'ha passat de diagnosticar pocs pacients per aparició de nòduls bulky o citopènies, a realitzar actualment el diagnòstic generalment per troballa casual de limfocitosi en anàlítica de control, i precisar-lo més amb l'ús de l'immunofenotip per citometria de flux (Oscier i col·l., 2004; Pangalis i col·l., 1999).

Taula 2. Patró de diagnòstic de l'LLC

Expansió clonal de limfòcits B anormals a sang perifèrica

Almenys 5×10^9 limfòcits B/L

Cèl·lules limfoides atípiques o immadures <55%

Baixa densitat d'Ig de superfície amb restricció de cadenes lleugeres

Antígens B de superfície (CD19, CD20, CD23)

CD5 antígen de superfície

Extret de Gibben, 2010.

1.2. BIOLOGIA I ORIGEN DE L'LLC

Els mecanismes fisopatològics involucrats en l'LLC es resumeixen a la taula 3.

A diferència de les cèl·lules dels tumors ràpidament progressius, la majoria de cèl·lules de l'LLC es troben en fase G_0 del cicle cel·lular que s'acumulen per defectes en l'apoptosi més que per augment de la divisió cel·lular. La família de proteïnes de Bcl-2 s'han vist implicades en la fisiopatologia d'LLC. A més, un gran nombre d'aquestes proteïnes tenen implicacions pronòstiques i terapèutiques en la malaltia. Les proteïnes de la família Bcl-2 expressades en LLC es poden dividir segons la seva estructura o la seva funció. Així, en trobem d'anti-apoptòtiques com Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1 i Bfl1/A1 i de proapoptòtiques, com Bax i Bak entre d'altres (Buggins, 2010).

L'augment en els nivells de proteïnes antiapoptòtiques, incloent Bcl-2, Mcl-1 i XIAP, sembla que mitjança la resistència antiapoptòtica, i que contribueix a la relativa resistència a la quimioteràpia i als anticossos monoclonals de les cèl·lules de d'LLC, la qual cosa fa que sigui necessari l'ús d'altres estratègies terapèutiques. Sembla que la resistència a l'apoptosi es troba regulada per CD160, un receptor glicosilfosfatidilinositol expressat en els limfòcits d'LLC, però no en els limfòcits B normals. Aquest fet s'associa a la regulació a l'alça de Bcl-2, Bcl-x i Mcl-1 però no a Bax. Els canvis en les ratios Bcl-2/Bax i Bcl-x/Bax, activa CD160, que a la vegada, indueix la síntesi de DNA, i la proliferació i progressió

cel·lular. També estimula la secreció de senyals d'activació i supervivència cel·lular com IL-6 i IL-8 (Liu FT i col·l., 2010).

Així, a la consideració clàssica de l'LLC com una malaltia "*per acumulació*", s'afegeixen noves evidències que suggereixen que l'estimulació antigènica, així com interaccions amb cèl·lules i citocines accessòries, és un factor que promou la proliferació de cèl·lules LLC i que els permet evitar l'apoptosi (Shanafelt i col·l., 2005; Zhao i col·l., 1998).

Altres vies que juguen un paper important en el manteniment de la supervivència cel·lular en l'LLC són l'activació de les vies de la fosfatidilinositol-3-cinasa, entre les quals es troba la serina-treonina-cinasa Akt. L'Akt afavoreix la supervivència cel·lular per inhibició de la via pro-apoptòtica de p53. La inhibició d'Akt, podria tenir un valor potencial en l'estratègia terapèutica de l'LLC (Frias i col·l., 2009; Zhuang i col·l., 2010).

Aquestes disparitats fan que el curs clínic i el pronòstic sigui incert. Així, es pensa que els subtipus d'LLC, que són més actius i progressius, es correlacionen amb rangs de proliferació cel·lular alts i, així, aquesta reserva de cèl·lules leucèmiques en divisió poden ser diana terapèutica per limitar l'expansió i evolució cel·lular clonal (Chiorazzi i col·l., 2005; Chiorazzi i col·l., 2006; Pangalis i col·l., 1999).

També, les cèl·lules d'LLC tenen diferents nivells de massa mitocondrial, que, per altra banda, sempre són més alts que en els limfòcits B normals. S'ha demostrat que la regulació del nivell de càrrega mitocondrial de les cèl·lules en l'LLC està influenciat per la presència augmentada d'espècies radicals com l'òxid nítric.

Taula 3. Mecanismes fisiopatològics involucrats en l'LLC

<p>Estimulació (auto)antigènica via el receptor antigènic de cèl·lula</p> <ul style="list-style-type: none"> Activació de vies de regulació amb expansió clonal de cèl·lules leucèmiques Promoció de supervivència cel·lular (activació de fosfatidilinositol-3-cinasa)
<p>Sobreexpressió de proteïnes anti-apoptòtiques</p> <ul style="list-style-type: none"> Bcl-2 ATM/p53 Altres
<p>Desregulació de citoquines autocrines</p>
<p>Interacció amb factors microambientals (citoquines paracrines i cèl·lules accessòries)</p>

Extret de Zhuang i col·l., 2010.

Aquesta càrrega augmentada de mitocondries pot arribar a fer que hi hagi menor sensibilitat a fàrmacs antileucèmics com la fludarabina, i s'explica així, en part, perquè hi ha variabilitat de sensibilitat al fàrmac en diferents LLC (Carew i col·l., 2004).

A diferència dels tumors ràpidament progressius, les cèl·lules de l'LLC s'acumulen per defectes en l'apoptosi, fet que contribueix a la relativa resistència a la quimioteràpia, la qual cosa fa necessari l'ús d'altres estratègies terapèutiques. L'estimulació antigènica contribueix a la proliferació de cèl·lules LLC.

1.3. EPIDEMIOLOGIA DE L'LLC

L'LLC és la forma més freqüent de leucèmia en els països occidentals i representa aproximadament el 25-30% de les leucèmies de l'adult i afecta 3-5 individus/100.000 habitants i any.

Hi ha el doble de freqüència d'afectacions en homes respecte les dones.

L'edat mitjana al diagnòstic de l'LLC és de 65 anys, encara que el 30% dels pacients recentment diagnosticats es troben per sota dels 65 anys i el 12% per sota dels 55. Els pacients de menys de 55 anys tenen un risc major de morir per progressió de la seva malaltia que els pacients més grans (85% vs. 49% $P < 0,001$).

No hi ha evidència que l'exposició a carcinògens augmenti la seva incidència. Hi ha increment de neoplàsies limfoides, incloent LLC, en parents de primer i segon grau de pacients amb LLC, i la incidència de segones neoplàsies es troba augmentada en pacients amb LLC, tant si n'han estat tractats com si no (Shanafelt i col·l., 2004).

1.4. MANIFESTACIONS CLÍNiques I COMPLICACIONS

1.4.1. MANIFESTACIONS I CURS CLÍNIC

Actualment, el 70-80% dels pacients amb LLC es diagnostiquen casualment en analítiques sol·licitades per altres causes, en estadis inicials de la malaltia, i a diferència de la majoria de neoplàsies, aquests malalts no requeriran tractament i seran controlats en actitud d'esperar i veure. La malaltia, però, es considera actualment incurable amb els tractaments convencionals.

En el curs de la malaltia es pot presentar anèmia, neutropènia o trombopènia com a conseqüència del fracàs medul·lar, de l'hiperesplenisme o per mecanismes autoimmunes. La progressió i el pronòstic de la malaltia, però, mostra gran variabilitat entre els diferents individus afectats:

- Alguns malalts presentaran curs lentament progressiu:
 - Amb una mortalitat anual al voltant d'un 8% i una mitjana de supervivència d'aproximadament sis anys (un 20%, més de deu anys), amb tendència a allargar-se en els darrers anys per un diagnòstic cada cop més precoç.
 - Les infeccions i les segones neoplàsies són les principals causes de mortalitat en aquests malalts.

-
- Molts pacients, però, fins i tot havent estat diagnosticats en estadis inicials, podran presentar progressió de la malaltia, activitat clínica d'aquesta, refractarietat al tractament, patir complicacions infeccioses o autoimmunes i tenir pronòstic fatal.

Malalts d'edat avançada i amb malaltia quiescent no presenten escurçament de la supervivència com a conseqüència de l'LLC. Malalts joves diagnosticats de malaltia avançada o progressiva tenen disminució en la seva expectativa de vida per progressió de l'LLC o bé per la falta de tractament curatiu. La supervivència serà inferior a tres anys, període inacceptable en aquest grup de malalts.

Els paràmetres de malaltia activa i/o en progressió, i, per tant, indicadors d'inici de tractament definits pel National Cancer International Working Group (NCI-WG) són (Chenson i col·l., 1996):

- Presència de símptomes constitucionals (pèrdua de més del 10% de pes en menys de sis mesos, febre en absència d'infecció, suors nocturnes i/o fatiga extrema).
- Fracàs medul·lar (anèmia progressiva o trombocitopènia).
- Esplenomegàlia massiva (més de 6 cm) per sota de la revora costal.
- Adenopaties massives (> 10 cm).
- Increment de més del 50% en el recompte limfocitari en menys de dos mesos (o temps de duplicació limfocitària (TDL) inferior a sis mesos).

No hi ha recompte leucocitari específic o recompte absolut de limfòcits que siguin indicadors de requeriment d'inici de tractament.

- Presència de fenòmens autoimmunes (anèmia o trombocitopènia).
- Estadis avançats de malaltia segons els sistemes clàssics d'estadiatge.

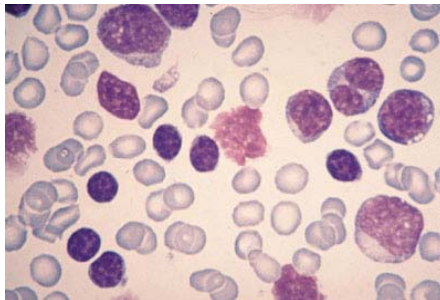
Malgrat que l'NCI-WG estableix clarament els criteris de malaltia en estadis avançats i, per tant, de requeriment de tractament, no estableix aquests criteris en el cas de pacients diagnosticats d'LLC de tractament de pacients en estadis inicials i amb marcadors biològics de malaltia agressiva (Shanafelt i col·l., 2004).

Hi ha canvis significatius en el sistema de defensa antioxidant en casos de pacients amb LLC quan es compara respecte als controls sans, això condueix a un augment de l'acció de radicals de l'oxigen que ocasiona peroxidació lipídica (Bakan i col·l., 2003).

1.4.2.COMPLICACIONS EN EL CURS CLÍNIC

Els pacients amb LLC poden presentar en el curs de la seva malaltia les complicacions següents:

- Transformació d'LLC a limfoma d'alt grau, l'anomenada *síndrome de Richter* (SR) [figura 5] (Fong i col·l., 2005; Rossi i col·l., 2006; Rossi i col·l., 2008).

Figura 5. Síndrome de Richter. Cèl·lules atípiques d'LLC amb immunoblastes.

Extret de Fondo de Imagen en Hematología. AEHH.

▫ Fenòmens autoimmunes

La relació entre l'LLC i el sistema immune està ben establerta. La malaltia es caracteritza per immunodeficiència, hipogammaglobulinèmia i alta prevalença de fenòmens autoimmunes: anèmia hemolítica autoimmune (AHA), la púrpura trombocitopènica idiopàtica (PTI) i l'aplàsia pura de cèl·lules roges (Mauro i col·l., 2000; Barcellini i col·l., 2006; Pangalis i col·l., 1999; Bowen i col·l., 2010).

▫ Presentar un segon trastorn limfoproliferatiu

El LDCGB és el més freqüent (Maddocks-Christianson i col·l., 2007).

1.5. ORIENTACIÓ TERAPÈUTICA GENERAL DE L'LLC

1.5.1. GENERALITATS I PAUTES DE TRACTAMENT

El tipus de tractament i el moment d'iniciar-lo varia en funció de factors del pacient i de la malaltia. La indicació de tractar o no la malaltia es dóna segons l'estadi clínic, la presència de símptomes i l'activitat de la malaltia (taula 4).

Generalment, pacients asimptomàtics, d'edat avançada, amb limfocitosi lleu aïllada, no requereixen d'entrada tractament i poden ser controlats en centres d'atenció primària (Oscier i col·l., 2004).

Els pacients amb estadis inicials d'LLC no tindran supervivència més llarga per rebre tractament en el moment del diagnòstic, abans que la seva malaltia progressi, en comparació amb els pacients que no reben tractament fins a la progressió. Malalts en estadis clínics inicials, generalment, no reben tractament i es monitoritzen amb l'estratègia d'esperar i veure. (Brugiatelli i col·l., 2006).

L'evidència que l'inici del tractament pugui tenir impacte pronòstic favorable només és viable en pacients en estadis avançats de la malaltia. Fins i tot, en pacients diagnosticats d'LLC en estadi de malaltia avançada es podria

justificar, en alguns casos, l'actitud d'esperar i veure si hi ha absència de progressió de la malaltia (Halleck i col·l., 2005).

Taula 4. Indicacions d'inici de tractament en LLC

Fracàs medul·lar progressiu: aparició o empitjorament d'anèmia i/o trombocitopènia
Adenopaties massives (> 10 cm) o progressives
Esplenomegàlia massiva (> 6 cm) progressiva
Limfocitosi progressiva
Increment de > 50% en 2 mesos
TDL < 6 mesos
Síntomes sistèmics*
Pèrdua de pes > 10% en els darrers 6 mesos
Febre > 38 °C durant ± 2 setmanes
Fatigabilitat extrema
Suors nocturnes
Citopènies autoimmunes
*Havent exclòs altres causes per a aquests símptomes com pot ser la infecció.
Hipogammaglobulinèmia asimptomàtica i presència de paraproteïna no són indicadors de tractament.
Extret de Brugiatelli i col·l., 2006.

Pel que fa referència a pacients amb LLC candidats al tractament, des de fa quaranta anys, el clorambucil ha estat el tractament principal dels pacients amb LLC. Però malgrat que s'han obtingut resultats en la pal·liació dels símptomes, sol s'obtenen resultats modestos en la millora de la supervivència.

A més, ha quedat demostrat que en pacients en estadis inicials d'LLC, l'administració de clorambucil precoçment al diagnòstic no ofereix millors resultats que la seva administració en el moment en què la malaltia progressa, i, en aquests casos, règims de poliquimioteràpia (per exemple: ciclofosfamida,

vincristina, prednisona (COP), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona (CAP), ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina i prednisona (CHOP) produeixen rangs de resposta més alts que els agents alquilants (clorambucil) aïllats, però sense millorar la supervivència.

Rituximab és un anticòs anti-CD20 que ha mostrat eficàcia en LLC, tant com a agent únic com en combinació amb quimioteràpia, i recentment ha estat aprovat el seu ús conjuntament amb quimioteràpia en primera línia de tractament, donats els excel·lents resultats mostrats en estudi fase II i III (Jaglowski i col·l., 2010).

Els anàlegs de les purines, i més concretament la fludarabina i la cladribina, no només produeixen rangs de resposta més elevats, sinó també una supervivència lliure de malaltia més llarga que el clorambucil, fet que ha constituït el primer avanç real en el tractament d'LLC (Leupin i col·l., 2010; Robak i col·l., 2010).

L'associació de fludarabina a anticòs monoclonals, i/o altres agents citotòxics, aconsegueix l'augment de l'efecte terapèutic dels anàlegs de les purines (Robak, 2010).

La bendamustina, un agent alquilant amb un anell similar al dels anàlegs de les purines, mostra també activitat en l'LLC. Ho fa de manera independent a l'expressió de ZAP-70 i de l'estat de p53. Actua de manera sinèrgica als

anàlegs de les purines i a rituximab, i així aquesta associació és efectiva en casos resistents a la quimioteràpia estàndard amb mutació en p53 (Roué i col·l., 2008; O'Brien, 2009; RobaK, 2010).

Les expectatives del tractament continuen sent la pal·liació de la malaltia, ja que aquesta es considera incurable. Tant és així que tots els malalts recauran malgrat assolir respostes inicials segons els criteris de l'NCI-WG, ja que la malaltia mínima residual (MMR) persisteix després del tractament i ocasiona la recurrència morfològica i clínica.

Malgrat tot, però, les noves modalitats terapèutiques han millorat de manera substancial els rangs de resposta i supervivència en l'LLC i, a mesura que s'augmenten els rangs de resposta, els objectius del tractament també varien des de la pal·liació fins a la curació:

- En pacients prèviament no tractats sense factors de mal pronòstic existeix una probabilitat alta d'obtenir MMR negativa després d'un tractament de primera línia amb règims que continguin fludarabina associada a citostàtics i/o anticossos monoclonals (RobaK, 2010).
- En pacients amb persistència d'MMR malgrat obtenir-se resposta amb aquests règims, es podria considerar el tractament amb alemtuzumab (anticòs monoclonal anti-CD52) o altres règims.

- El trasplantament de progenitors hematopoètics (TPH) s'ha de considerar sols en pacients en els quals no s'és capaç d'eradicar MMR malgrat la resposta a altres teràpies.

Encara no coneixem quin és el tractament “*gold standard*” de la malaltia, però queda clar que, en el segle actual, ni la fludarabina ni el clorambucil usats aïlladament són la resposta (Brugiatelli i col·l., 2006; Montserrat, 2005; Wierda i col·l., 2006). La taula següent mostra alguns dels esquemes terapèutics més emprats en LLC, tant en primera com en successives línies de tractament:

Taula 5. Esquemes terapèutics emprats en LLC

Tractament amb fludarabina	Tractament amb clorambucil
<p>Esquema F: Fludarabina 25 mg/m²/dia ev (o 40 mg/m²/dia oral) durant 3 dies Fludarabina 25 mg/m²/dia ev durant 5 dies cada 4 setmanes per 6 cicles</p> <p>Poliquimioteràpia FND: Fludarabina 30 mg/m²/dia ev durant 3 dies Mitoxantrona 10 mg/m²/dia, dia 1 Dexametasona 20mg oral/dia per 5 dies Repetir cada 28 dies amb un màxim de 6 cicles</p> <p>Poliquimioteràpia FN Fludarabina 30 mg/m²/dia ev durant 3 dies Mitoxantrona 10 mg/m²/dia, dia 1 Repetir cada 28 dies amb un màxim de 6 cicles</p> <p>Poliquimioteràpia FC Fludarabina 25 mg/m²/dia ev durant 3 dies Ciclofosfamida 250-300 mg/m²/dia, per 3 dies Repetir cada 28 dies, 5-6 cicles</p> <p>Poliquimioteràpia FCM Fludarabina 25 mg/m²/dia ev durant 3 dies Ciclofosfamida 200 mg/m²/dia, per 3 dies Mitoxantrona 6 mg/m²/dia ev dia 1 Repetir cada 28 dies 5-6 cicles, amb un màxim de 6 cicles</p>	<p>Dosis baixes de clorambucil 40 mg/m² el dia 1 cada 28 dies 0,4 mg/Kg el dia 1 cada 2 setmanes 0,4-0,8 mg/Kg cada mes Continuar el tractament almenys 6 mesos</p> <p>Dosis intermèdies/altes de clorambucil 30 mg/m² el dia 1 i 15 de cada mes 12 mg/m²/dia de dia 1 al 7 de cada mes 10 mg/m²/dia de dia 1 al 6 de cada mes Continuar el tractament almenys 6 mesos</p>
	Quimioimmunoteràpia
	<p>Poliquimioteràpia FR Fludarabina 25 mg/m² dies 1-5 durant 6 cicles Rituximab en el primer cicle 50 mg dia 1, 325 mg/m² dia 3, 375 mg/m² dia 5 i llavors rituximab 375 mg/m² dia 1 dels cicles 2-6</p> <p>Poliquimioteràpia FCR Fludarabina 25 mg/m² Ciclofosfamida 250 mg/m² dia dies 1-3 cada 5 setmanes durant 6 cicles Rituximab 375 mg/m² dia 0 del primer cicles, després 500 mg/m² el dia 1 dels cicles 2 a 6</p> <p>Alemtuzumab 30 mg ev o sbc tres cops a la setmana, iniciant amb 2 administracions de 3 i 10 mg, respectivament, durant 12-18 setmanes</p>

Extret de Nabhan i col.l., 2006.

1.5.2. RECOMANACIONS DE TRACTAMENT

Les diferents propostes de tractament es resumeixen en la següent taula:

Taula 6. Proposta de tractament en primera i segona línia per a LLC

Estadi	Activitat de malaltia	Molecular Citogenètica	Primera línia de tractament	
			Estàndard	Alternatives
Asimptomàtic Binet A-B o Rai 0-II	Irrellevant	Irrellevant	Cap	Sols en assajos clínics, tractar malalts d'alt risc
Binet C o Rai III-IV, o simptomàtic	Activa	No del(17p) del(17p)	FCR FCR, A o FA i Allo SCT	BR, FR, FA, FCA
	Quiescent	No del(17p) del(17p)	CLB A?	CLB + R, CLB + GA101, B, Dosis reduïdes F o FC o FCR
Recaiguda	Activitat de malaltia	Molecular Citogenètica	Tractament de recaiguda	
			Estàndard	Alternatives
Precoç (< 1any): malaltia refractària	Activa	No del(17p)	A o FA i allo SCT	BR, flavopiridol, lenalidomida.
		del(17p)	A o FA i Allo SCT	Flavopiridol, lenalidomida
	Quiescent	No del(17p) del (17p)	A A	BR, B, lenalidomida Lenalidomida
Tardana (>1any)	Irrellevant		Repetir primera línia	

CLb: clorambucil; F: fludarabina; C: ciclofosfamida; A: alentuzumab; R: rituximab; B: bendamustina; Allo SCT: trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics; GA 101: nou anticòs anti-CD20. Extret de Hallek, 2009.

Les recomanacions generals de tractament de l'LLC són:

▫ Tractament de malaltia avançada o progressiva

▪ Pacients de baix risc:

En absència de factors de risc biològic desfavorables, malalts joves o malalts d'edat avançada seleccionats (bon estat general i sense co-morbiditat) es recomana iniciar tractament, si està indicat, amb fludarabina i ciclofosfamida. S'associarà a corticoides en casos seleccionats (p. ex. presència de citopènies immunes).

▪ Pacients d'alt risc:

▪ Malalts joves amb factors biològics de mal pronòstic: Han de ser considerats com candidats a altes dosis de quimioteràpia o trasplantament de progenitors autòleg o al·logènic; sempre, però, dintre d'assajos clínics.

▪ Pacients d'edat avançada o no candidats a cap dels tractaments anomenats:

- Tant la fludarabina com el clorambucil són opcions terapèutiques. La combinació de fludarabina amb rituximab, amb o sense ciclofosfamida, ha de ser avaluada en pacients no tractats d'LLC. Els malalts en els que fludarabina està contraindicada han de rebre tractaments amb clorambucil per obtenir control de la

simptomatologia, millorar la qualitat de vida i preservar la supervivència global.

- Recentment, s'ha aprovat l'administració d'alemtuzumab en primera línia en malalts no candidats a fludarabina.
-
- La poliquimioteràpia, fora de règims amb anàlegs de les purines, no es recomana en primera línia, per falta d'avantatges en la supervivència.
 - Per falta d'avantatges clars en eficàcia i toxicitat, rituximab no es recomana en primera línia fora d'assajos clínics.
 - Pacients que han respòs inicialment a agents alquilants com el clorambucil poden ser retractats en diferents ocasions, però la qualitat i la durada de la resposta generalment serà inferior a l'obtinguda inicialment; també són menys efectius que els anàlegs de les purines en pacients prèviament tractats (Brugiatelli i col·l., 2006; Oscier i col·l., 2004).

1.6. FACTORS PRONÒSTICS

1.6.1. GENERALITATS

Durant molt temps, l'actitud d'esperar i veure ha estat considerada el tractament estàndard en pacients amb estadis inicials d'LLC.

Aquesta opció es realitza partint de la base de minimitzar les toxicitats en pacients en els quals la seva malaltia no ocasiona clínica, però aquest maneig està variant per l'evidència que l'LLC també afecta pacients joves, en els quals el tractament pal·liatiu és subòptim, i per la disponibilitat de tractaments altament efectius i de factors pronòstics capaços d'indicar el risc de progressió de la malaltia ja des del moment del diagnòstic inicial.

Així doncs, els progressos recents en LLC fan sorgir noves qüestions:

- Quins pacients en estadis inicials han de ser tractats?
- Quins pacients han de rebre tractaments més agressius?
- Quins pacients han de ser sotmesos a trasplantament de progenitors?

Per respondre-les cal una determinació acurada i precisa del pronòstic individual per mitjà de factors pronòstics de valor reconegut (Van Bockstaele i col·l., 2009; Wierda i col·l., 2006).

Entre aquests, s'inclouen:

- Factors pronòstics clàssics (factors clínics):

El pronòstic individual de l'LLC depèn de la relació entre les característiques del malalt (edat, sexe, co-morbiditat, estat general) i la malaltia (creixement, cinètica, biologia del tumor i sensibilitat de la malaltia al tractament) (Shanafelt i col·l., 2004) .

Així, hi ha factors pronòstics que es basen en paràmetres clínics i analítics. Entre aquests , els principals són (Pangalis i col·l., 1999):

- L'estadi clínic (estadis de Rai i de Binet)
- Patró d'infiltració de moll de l'os
- Nivell de recomptes limfocitaris i TDL
- Morfologia limfocitària
- Marcadors sèrics

Aquests factors clàssics seran indicadors de bon pronòstic si es compleixen els paràmetres següents: estadis inicials de Rai i Binet; patró no difús d'infiltració d'MO i TDL > 12 mesos.

En el grup de malalts que compleixen criteris de bon pronòstic segons els marcadors clàssics, hi ha un grup de casos que podran progressar (fins un 40%) i requerir tractament (un 45% d'aquests). A més, més d'un 20% d'aquests pacients moriran per causes relacionades amb l'LLC. Aquests pacients tenen una baixa càrrega tumoral, però un alt risc de progressió.

Així doncs, s'intenten definir nous marcadors de malaltia que identifiquin aquests malalts que podrien beneficiar-se d'intervencions precoces, malgrat no tenir alta càrrega de malaltia (Oscier i col·l., 2002).

- Nous factors pronòstics (factors biològics)

Si considerem que els estadis de la malaltia i altres paràmetres pronòstics clínics no fan més que reflectir el grau de diversitat de la malaltia, en els darrers anys els focus de recerca en factors pronòstics d'LLC han variat des dels factors clínics fins als biològics (taula 7) (Meloni i col·l., 1998; Shanafelt i col·l., 2004; Shanafelt i col·l., 2007).

Taula 7. Nous marcadors pronòstics

Extensament estudiats

Marcadors sèrics
 Timidin-cinasa, sCD23, beta-2
 microglobulina
 Citogenètica convencional/ FISH
 Estat mutacional *IgVH*
 Expressió CD38
 Expressió ZAP-70

Necessiten més estudis

Marcadors sèrics
 VEGF, CD20, CD49b, trombopoetina, Ki-67¹
 Expressió de citocrom-1²
 Llargada telòmers
 Activitat telomerassa
 Expressió *MCL-1*
 Activació mRNA induïda per citidina-deaminasa
 (*AID*)
 Expressió lipoproteïna lipasa A
 Expressió *ADAM29*
 Expressió proteïna HS1
 Signatura genètica micro- RNA
 Expressió *CLLU1*

Relacionats amb el tractament

Resposta a tractament
 Assoliment d'estat de malaltia mínima residual
 negativa

¹Extret de Montserrat, 2006; Moreno, 2008; ²Extret de Bruey, 2010;
²Extret de Jantus, 2008.

La presència d'aquests factors, però, encara no pot ser utilitzada per prendre decisions en el maneig de la malaltia, excepte en el context d'assajos clínics. A mode de resum la taula 8 mostra els diferents factors de risc i la seva indicació pronòstica:

Taula 8. Factors pronòstics i risc en LLC

Factor	Baix risc	Alt risc
Sexe	Dona	Home
Estadi clínic	Binet A Rai 0, I	Binet B o C Rai II, II, IV
Morfologia limfocitària	Típica	Atípica
Patró d'infiltració BMO	No difús	Difusa
TDL	> 12 mesos	< 12 mesos
Marcadors sèrics	Normal	Elevats
Expressió de CD38	< 20-30%	> 20-30%
Anormalitats genètiques	Cap	del 11q23 del 13q aïllada pèrdua/mutació p53
Estat mutacional gen IgV_H	Mutats	No mutats

Extret de Brugiattelli i col·l., 2006.

1.6.2. FACTORS PRONÒSTICS CLÀSSICS

1.6.2.1. ELS SISTEMES D'ESTADIATGE

Els pacients amb LLC mostren heterogeneïtat de curs clínic:

- Un 30% aproximadament del total de malalts sobreviuen molts anys sense tractament i eventualment moren per causes no relacionades amb l'LLC.
- Un 30% de pacients tindran evolució ràpidament fatal malgrat els tractaments agressius.
- La resta presenten malaltia activa, però sense presentar signes de progressió durant molt temps.

Reconeixent aquesta heterogeneïtat, Rai i Binet van dissenyar sistemes d'estadiatge (taula 9) per avaluar l'extensió de la malaltia i mesurar de forma

indirecta la càrrega tumoral que hi ha a partir de la presència d'adenopaties, megàlies i citopènies (Rai i col·l., 1975; Binet i col·l., 1981).

Els avantatges que presenten com a marcadors pronòstics es donen per:

- Representar la pedra angular per a la presa de decisions de cara al seguiment mèdic i de tractament d'aquests pacients.
- Correlacionar els diferents estadis amb la supervivència mitjana.
- Haver estat validats en molts estudis.
- Tenir simplicitat d'ús i facilitar avanços importants en el maneig de l'LLC.

Els factors pronòstics tenen, però, algunes limitacions:

- No tenen capacitat d'identificar quins malalts en estadis inicials evolucionaran de manera progressiva.
- No poden diferenciar aquells pacients capaços de mantenir-se estables en estadis avançats, respecte aquells que presentaran curs agressiu.
- La majoria dels pacients es diagnostiquen quan es troben asimptomàtics durant un examen mèdic de rutina, la qual cosa fa que el 80% del pacients es trobin en el grup de baix risc al diagnòstic, fet que limita el seu valor pronòstic (Chiorazzi i col·l., 2005; Oscier i col·l., 2004; Shanafelt i col·l., 2004).

Taula 9. Estadis clínics en l'LLC

Estadi	Característiques	% de malalts
Estadi de Binet		
A	< 3 àrees ganglionars ¹	60
B	> 3 àrees ganglionars	30
C	Hemoglobina < 10 g/dl o Plaquetes < 100 x 10 ⁹ /L	10
Estadi de Rai		
0 ²	Limfocitosi aïllada	30
I ²	Adenopaties	25
II ³	Hepato o esplenomegàlia amb o sense adenopaties	25
III ⁴	Hemoglobina < 11 g/dl	10
IV	Plaquetes < 100 x 10 ⁹ /L	10

¹Les àrees limfoides implicades són cervicals, aixellars i inguinals, hepatomegàlia i esplenomegàlia.

²Grup de baix risc; ³Grup de risc intermedi; ⁴Grup d'alt risc.

Extret de Rai i col·l., 1975; Binet i col·l., 1981.

En resum, la mitjana de supervivència, des del diagnòstic, usant aquests sistemes d'estadiatge és (taula 10):

- Els malalts de baix risc (estadis 0 de Rai, A de Binet) tenen una mitjana de supervivència propera als 15 anys.
- Els pacients amb risc intermedi (estadis I o II de Rai; estadi B de Binet) tenen una supervivència mitjana de 5-7 anys.
- La majoria de pacients amb alt risc (estadis III o IV de Rai; estadi C de Binet) tenen una expectativa de vida menor a 3-4 anys.

Taula 10. Mitjana de supervivència d'acord amb els estadis de Rai i Binet

Estadi de Rai	Mitjana de supervivència, mesos*
0	150
I	101
II	71
III	19
IV	19

Estadi de Binet	Mitjana de supervivència, mesos*
A	Comparable a controls
B	84
C	24

*Mitjana de supervivència que es va descriure en els estudis inicials.

Extret de Shanafelt i col·l., 2004

1.6.2.2. HISTOLOGIA DE MOLL DE L'OS

La histologia del moll de l'os es pot considerar com a adjunt a l'estadiatge i té el potencial d'identificar pacients amb més probabilitat de progressar i, per tant, que tenen una supervivència més curta.

S'han descrit quatre patrons histològics d'invasió medul·lar de reconegut valor pronòstic (nodular, intersticial, mixt i difús).

En general, els patrons intersticial i el nodular són propis de les fases inicials, i el mixt i el difús de les avançades (Montserrat i col·l., 1996).

1.6.2.3. TEMPS DE DUPLICACIÓ LIMFOCITÀRIA (TDL)

El TDL representa la determinació de mesos transcorreguts perquè la xifra absoluta de limfòcits es dupliqui.

- Pacients amb TDL igual o inferior a 12 mesos tenen una supervivència mitjana de 61 mesos, i és de 70 mesos en pacients amb estadis inicials de la malaltia (A o B de Binet).
- No s'assoleix la supervivència mitjana després de 48 mesos en malalts amb TDL superior a 12 mesos.

Val a dir, però, que les decisions terapèutiques basades en aquest paràmetre poden retardar el tractament de pacients amb característiques de malaltia agressiva (Montserrat, 2006).

1.6.2.4. MORFOLOGIA LIMFOCITÀRIA

Si atenem a les característiques morfològiques dels limfòcits, podem distingir dos subgrups d'LLC:

- LLC típica: > 90% de les cèl·lules són de mida petita o mitjana, amb cromatina quartejada, sense nuclèol i citoplasma clar.
- LLC atípica (15% dels casos): presència de > 10% de prolimfòcits o amb > 15% de cèl·lules de morfologia limfoplasmocitària i/o nucli clivellat.

Els pacients amb trets morfològics d'LLC atípica tenen pitjor pronòstic quant a supervivència i resposta a tractament respecte als pacients amb LLC típica (Oscier i col·l., 2004).

1.6.2.5. MARCADORS SÈRICS

Diferents paràmetres analítics sèrics tenen la capacitat de predir la progressió i la supervivència dels pacients en estadi A de Binet.

La seva validesa, però, es veu limitada per la falta d'estandardització dels diferents mètodes d'assaig i dels punts de tall de positivitat (Montserrat, 2006).

Els marcadors pronòstics principals i més usats són:

- Beta-2 microglobulina (B2M)

Reconegut marcador tumoral, tant en el diagnòstic com en el pronòstic de les síndromes mieloproliferatives i del mieloma múltiple, entre d'altres.

La B2M sèrica es correlaciona amb la càrrega tumoral i l'estadi clínic de pacients amb LLC, i és el marcador predictiu més potent en l'anàlisi multivariable de supervivència a 5 anys respecte pacients-control d'edat i estat general similar (supervivència a 5 anys per estadis de Rai I-II i B2M elevada de 54 mesos versus 116 mesos per a pacients sense elevació de B2M).

El paper de la B2M en el maneig pràctic de pacients amb estadis inicials d'LLC encara ha de ser demostrat (Shanafelt i col·l., 2004).

- Lactat deshidrogenasa (LDH)

Enzim que catalitza l'oxidació reversible de lactat a piruvat en el cicle de Krebs. El seu increment es veu associat a múltiples patologies, entre aquestes les neoplàsies, i, malgrat no tenir especificitat, el seu increment, en general, és proporcional a l'activitat tumoral de les síndromes limfoproliferatives.

- Timidina cinasa sèrica (TK)

És un enzim cel·lular involucrat en la síntesi del DNA. La forma predominant de TK es presenta en les cèl·lules en divisió i es troba absent en les cèl·lules que no es divideixen. Així, aquest enzim és un marcador potencial d'activitat proliferativa.

El nivell sèric de TK es correlaciona amb la massa tumoral i l'activitat proliferativa de les cèl·lules d'LLC. Prediu la probabilitat de progressió de la malaltia, de supervivència i de resposta al tractament. Nivells elevats de TK es relacionen amb estadis de Rai avançats i de malaltia progressiva. També en estadis inicials es veu una mitjana de supervivència lliure de progressió més curta per a pacients amb nivells elevats de TK ($> 7,1$ U/L) en relació amb pacients amb nivells de TK baixos ($p < 0,001$).

Les anàlisis de TK són accessibles comercialment i de fàcil realització, fet que la converteixen en un marcador pronòstic de gran utilitat (Shanafelt i col·l., 2004).

- CD23 soluble

Nivells alts de CD23 s'associen a factors pronòstics adversos com la infiltració difusa d'MO, TDL, i a una progressió de la malaltia en pacients en estadis inicials d'LLC (Montserrat, 2006).

1.6.3. NOUS MARCADORS PRONÒSTICS

El diagnòstic cada cop més precoç de l'LLC i en pacients cada cop més joves, així com la percepció de que una gran proporció de malalts amb estadis inicials progressaran a fases més avançades amb necessitat de tractament, fan que siguin necessaris paràmetres pronòstics addicionals als clàssics per identificar subgrups de malalts en estadis inicials amb que risc de progressar, els quals tindran respostes dolentes al tractament i una supervivència disminuïda.

A més, cal tenir en consideració que el pronòstic d'un malalt determinat dependrà de les complexes relacions entre les característiques del malalt (edat, gènere, comorbiditats, estat general), la malaltia (càrrega, cinètica i biologia tumoral), així com de la sensibilitat de la malaltia al tractament (Moreno i col·l., 2008).

En els darrers anys, s'han descrit diversos factors pronòstics que potencialment poden identificar subgrups de pacients d'alt risc, que tenen probabilitat de tenir un curs de malaltia més agressiu. La identificació d'aquests malalts és de gran interès ja que la disponibilitat de tractaments altament efectius i de tècniques més sensibles de detecció precoç de malaltia, fa que en aquests pacients sigui possible induir rangs de remissió més profunds que suposaran millora en la supervivència (Kay i col·l., 2007; Montserrat, 2006).

Aquests nous factors validats darrerament s'utilitzen cada cop més freqüentment a la pràctica clínica, encara que la presa de decisions que es basin únicament en aquests, encara no ha estat validada. Presentem els més rellevants d'aquests factors (Moreno i col·l., 2008).

1.6.3.1. ESTAT MUTACIONAL DE LA REGIÓ VARIABLE DE LA CADENA PESADA DE LES IMMUNOGLOBULINES (IgV_H)

Aproximadament el 50% dels clons de limfòcits d'LLC exhibeixen mutacions somàtiques en els gens de les seves cadenes d'Ig. La presència d'aquestes mutacions s'ha correlacionat amb el curs clínic de l'LLC.

No hi ha encara consens respecte quin és el punt de tall del percentatge de mutacions que es correlaciona millor amb el curs clínic (generalment s'utilitza entre un 98% i un 95% d'homologia en la línia germinal):

- Pacients amb més de 2-5% de diferències en la seqüència de nucleòtids de les cèl·lules de la línia germinal, es consideren com a clons mutats (*LLC mutada*), mentre que aquells clons amb 2-5% o menys de diferències en la seqüència de nucleòtids de la línia germinal, es consideren, com a no mutats (*LLC no mutada*).

La mitjana de supervivència és de 8 a 9 anys en pacients sense la mutació, i de més de 24 anys per als pacients amb mutacions somàtiques dels gens IgV_H. També, els pacients amb estadis A de Binet estratificats d'acord amb el seu estat mutacional d'IgV_H, presenten diferències respecte a la seva supervivència global:

- Els malalts sense la mutació IgV_H tenen condicions de major malignitat, i s'inclou:
 - evidència de malaltia avançada i/o progressiva.
 - morfologia atípica.
 - citogenètica adversa.
 - evolució clonal.
 - resistència a tractaments, amb la inclusió de major risc de recaiguda després de trasplantament de progenitors.

Hi ha l'excepció en la presència de mutacions genètiques específiques (p.ex. V_H3-21) que tenen pronòstic similar a la de no presentar-ne.

Els principals inconvenients a l'hora d'utilitzar les tècniques de detecció d'IgV_H com a marcadors pronòstics són: el cost elevat, la dificultat tècnica i la falta de viabilitat d'ús clínic (Shanafelt i col·l., 2004; Oscier i col·l., 2004; Montserrat, 2006).

S'han proposat nous marcadors pronòstics, com l'expressió d'mRNA citocrom-A, com a indicador de progressió en estadis inicials d'LLC i que es correlaciona amb l'expressió de les mutacions d'IgV_H i d'altres nous marcadors pronòstics.

1.6.3.2. EXPRESSIÓ DE CD38

La CD38 és una proteïna descrita com a mediadora de l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli, es troba involucrada en funcions efectores de limfòcits T i és una important molècula de senyal en aquestes cèl·lules.

S'ha demostrat que l'expressió aberrant de CD38, tant en limfòcits T com B, causa desregulació del control immune, efecte antiapoptòtic i genera senyals de proliferació cel·lular limfocitària.

La seva expressió en LLC es correlaciona amb la progressió de la malaltia i amb una falta de resposta a tractament i, per tant, té importància clínica com a marcador pronòstic negatiu.

En un estudi recent es va observar que la mitjana de supervivència per a malalts amb estadis intermedis de Rai, amb més del 30% de cèl·lules que

expressen CD38, és de 10 anys; mentre que no s'assoleix la supervivència mitjana en cap pacient amb menys del 30% d'expressió de CD38 (Thihofer i col·l., 2006).

S'ha suggerit que l'expressió de CD38 en les cèl·lules leucèmiques dóna la mateixa informació i pot substituir la determinació de la mutació de gens IgV_H, ja que les cèl·lules d'LLC amb més expressió de CD38 tenen més probabilitat de no presentar mutacions a nivell de gens IgV_H. CD38, però, conserva el seu valor pronòstic independent de cara a la predicció de la probabilitat de progressió, la resposta al tractament i la supervivència global (Oscier i col·l., 2004).

La combinació de CD38 i l'estat mutacional d'IgV_H té més poder pronòstic que el seu ús per separat:

- Els malalts sense la mutació i amb 30% o més d'expressió de CD38 tenen una mitjana de supervivència de 8 anys.
- Els pacients amb la mutació i menys de 30% d'expressió de CD38 tenen una supervivència mitjana de 26 anys.
- Els pacients amb resultats discordants tenen una supervivència mitjana de 15 anys.

CD38 sembla que és un marcador pronòstic útil i viable, però cal remarcar les seves limitacions:

- Mostra diferent expressió per un mateix pacient al llarg de la malaltia.
- El punt de tall de positivitat (30% per a la majoria dels autors) és arbitrari (Hallek i col·l., 2005; Montserrat, 2006; Shanafelt i col·l., 2004).

1.6.3.3. PROTEÏNA 70 ASSOCIADA A ZETA (ZAP-70)

ZAP-70 és una proteïna de 70-kD del tipus tirosina-cinasa intracel·lular que promulga senyals d'activació de limfòcits T i cèl·lules NK per mitjà de receptors de membrana T.

Aquesta proteïna es troba normalment expressada en els limfòcits T i, rarament, està present en cèl·lules B normals però sí que es troba en limfòcits B de pacients amb LLC.

L'anàlisi de l'expressió de ZAP-70, per citometria de flux, i usant un punt de tall de positivitat del 20%, és capaç d'identificar un subgrup de pacients en estadi A de Binet amb mal pronòstic:

- L'expressió de ZAP-70 determinada en pacients amb estadi A de Binet, mostra que la supervivència mitjana és de 90 mesos en els casos ZAP-70 +, mentre que no s'assoleix la supervivència mitjana en els pacients ZAP-70 - (mitjana de seguiment, 63 mesos).

Els principals avantatges de ZAP-70 són:

- Hi ha una molt bona correlació entre l'expressió de ZAP-70 detectada per citometria de flux i les mutacions IgV_H, i així, tenen un valor pronòstic equivalent (prediu de manera exacta l'estat mutacional en el 93% dels pacients).
- ZAP-70 és estable en el temps.
- És complementari a CD38: Pacients que expressin els dos marcadors tindran el pitjor pronòstic, pacients amb discordança dels marcadors tindran pronòstic intermedi i els pacients amb cap dels marcadors tindran millor pronòstic.
- És un marcador accessible i utilitzable de cara al pronòstic de l'LLC.

Les principals limitacions de ZAP-70 per a ús com a marcador pronòstic són:

- L'arbitrarietat del punt de tall de positivitats.
- La falta de consens en el mètode òptim de detecció, que en la majoria dels casos és la citometria de fluxe (Bosch i col·l., 2003; Shanafelt i col·l., 2004), malgrat estant sorgint recentment nous mètodes d'estandardització en la seva mesura per citometria (Gachard i col·l., 2008).

S'ha demostrat que la determinació de l'expressió d'mRNA de ZAP-70 en limfòcits B per PCR, té també excel·lent correlació amb l'estat mutacional de les immunoglobulines i el temps fins a la progressió en estadis inicials d'LLC (Reinoso i col·l., 2008).

1.6.3.4. ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES

Les alteracions citogenètiques que afecten a oncògens freqüentment causen limfomes de cèl·lula B, i, dintre d'ells, també l'LLC.

Les anormalitats cromosòmiques es detecten en el 30-50% dels pacients amb LLC. Tot i que les lesions citogenètiques són rares en el clon leucèmic en estadis precoços de la malaltia, sí que són freqüents al llarg del curs de la malaltia (taula 11).

Taula 11. Incidència d'anormalitats cromosòmiques en 325 malalts d'LLC

Alteració	Nre. de malalts (%)*
Deleció 13q	178 (55)
Deleció 11q	58 (18)
Trisomia 12q	53 (16)
Deleció 17p	23 (7)
Deleció 6q	21 (6)
Trisomia 8q	16 (5)
t(14q32)	12 (4)
Trisomia 3q	9 (3)
Total anormalitats	268 (82)
Cariotip normal	57 (18)

*175 malalts tenen una alteració única aïllada, 67 malalts tenen 2 alteracions i 26 malalts tenen més de 2 alteracions.
Extret de Pangalis i col·l., 1999.

La significació pronòstica de les anormalitats citogenètiques és independent de l'estadi clínic i de l'estat mutacional IgV_H (Montserrat, 2006b).

Entre les diferents alteracions citogenètiques destaquen per la seva freqüència d'aparició i implicacions pronòstiques les següents (Moreno i col·l, 2010):

- Deleció a 13q14.3: És la més freqüent en LLC i ocorre en un 7% dels casos al diagnòstic i en més del 50% de casos al llarg de l'evolució de la malaltia. Aquesta deleció implica avantatge selectiu, possiblement predisposant els clons de cèl·lules B per adquirir mutacions addicionals. Els malalts amb cariotip normal o alteracions en 13q- tenen una supervivència superior a la dels pacients amb trisomia de 12 o cariotip complex i tenen major probabilitat de trobar-se en estadi A. Darrerament, però, hi ha evidències que un alt nombre de pèrdues en la bandes de cromosoma 13q14, s'associa a un pitjor pronòstic, un escurçament del temps des del diagnòstic fins a l'inici del tractament, a una major proliferació cel·lular i a una menor apoptosi (Hernández i col·l., 2009).

- Deleció 11q22-23 i 17p13: Les alteracions que suposen la inactivació de gens reguladors, molts d'aquests situats al cromosoma 11q, i les alteracions del cromosoma 17p, ocasionen disfuncions de la proteïna p53 i són les alteracions citogenètiques de pitjor pronòstic. El gen p53, localitzat al cromosoma 17, juga un paper central en la inducció de l'apoptosi o segrest del cicle cel·lular després d'haver-se produït un dany al DNA.

La gran majoria de fàrmacs citotòxics, com els anàlegs de les purines i els alquilants, actuen induint ruptures en la doble cadena de DNA i donen lloc a l'activació de p53. Així, la integritat funcional de la via de p53 és necessària per induir la mort cel·lular per aquests fàrmacs en l'LLC.

El fet que hi hagi alteracions en aquest nivell implica que s'obtingui una resposta pobre a aquests tractaments. Per contra, l'anticòs monoclonal anti-CD52, l'alemtuzumab, sembla que té activitat en els casos mutats a p53, possiblement per induir mort cel·lular independent a p53.

Els malalts amb delecions 17p o 11q tenen malaltia més avançada que la resta de grups. Aquestes delecions també s'han vist associades a altres paràmetres de pronòstic advers, com la no-mutació de gens IgV_H, o expressió elevada de CD38, i un pronòstic dolent (Döhner i col·l., 2000; Montserrat i col·l., 2006).

En aquests malalts, doncs, podria ser efectiu l'ús de la caracterització del perfil molecular per suggerir les teràpies particulars més apropiades (Butler i col·l., 2010).

- Trisomia 12: Es troba en el 13% dels casos d'LLC i és l'única alteració en el 50% dels casos. Es considera també com de mal pronòstic i es lliga a morfologia i immunofenotip atípics, però, en contra de les delecions 17p

o 11q, els pacients, generalment, responen al tractament amb anàlegs de les purines i tenen una supervivència millor.

- Deleció (6q): Es veu més freqüentment en els limfòcits que tenen característiques plasmocitoides i es correlaciona amb un pronòstic intermedi.

La resta de malalts amb altres alteracions genètiques conformen un grup heterogeni amb alta probabilitat de supervivència (Pangalis i col·l., 1999).

Amb el desenvolupament de tècniques de fluorescència per hibridació in situ (FISH) és possible detectar anormalitats cromosòmiques en cèl·lules que no es trobin en divisió, fet de gran utilitat en l'LLC, on la majoria de limfòcits es troben en fase G₀ del cicle cel·lular.

Les tècniques de FISH en LLC detecten anormalitats cromosòmiques amb més freqüència que les tècniques de citogenètica convencional (80-90% dels casos) i tenen diferent distribució de freqüència:

- 13q-: 55% dels casos
- 11q-: 18%
- trisomia 12: 7%
- 17p-: 6%
- 29% amb més d'una alteració cromosòmica.

Amb l'ús de FISH com a mètode d'anàlisi cromosòmica, s'observa que la mitjana de l'interval lliure de tractament és més llarg en el grup de pacients amb trisomia 12q (33 mesos) i en el grup de cariotip normal (49 mesos), i és encara més llarg en el grup amb deleció 13q (92 mesos) (taula 12).

En el curs clínic de l'LLC, es poden adquirir noves alteracions cromosòmiques les quals porten a terme el concepte d'*evolució clonal*. Els subclons generats poden tenir avantatges de supervivència i això dóna lloc a una malaltia més agressiva (Shanafelt i col·l., 2004; Oscier i col·l., 2004).

Taula 12. Anàlisi cromosòmic: ús de FISH com a dada pronòstica

Categoria	Pacients (%)	Mitjana d'interval lliure de tractament. Mesos*	Mitjana de supervivència. Mesos*
17p-	7	9	32
11q- sense 17p-	17	13	79
Trisomia 12 sense 11q- o 17p-	14	33	114
Cariotip normal	18	49	111
13q- aïllada	36	92	133
Altres alteracions	8	-	-

*Mitjana de seguiment, 70 mesos; - indica grup heterogeni.

Extret de Shanafelt i col·l., 2004

D'altra banda, val a dir que els marcadors d'expressió gènica d'altres marcadors pronòstics, com l'expressió de ZAP-70, LPL, i TCF7, no són d'utilitat a l'hora de substituir els factors pronòstics genètics comentats en aquest darrer apartat, però sí que poden ser d'utilitat com a cribatge del risc genètic, en el context de l'anàlisi de la situació clínica del malalt i dels altres factors pronòstics clàssic i nous (Kienle i col·l., 2010).

1.6.3.5. TOMOGRAFIA COMPUTERITZADA (TC)

La TC és essencial en el diagnòstic d'extensió en l'àmplia majoria de trastorns limfoproliferatius crònics.

Encara que segons l'NCI-WG, la TC no és necessària de rutina per avaluar l'extensió de la malaltia per mitjà de l'estudi de les àrees ganglionars afectades, els estudis d'imatge, incloent els de TC, es realitzen vénen cada cop més sovint en malalts amb LLC per assegurar l'extensió de la malaltia i la resposta al tractament. A més, la detecció d'adenopaties ha estat relacionada amb alteracions citogenètiques de mal pronòstic, com la deleció 11q, i també amb fracassos terapèutics als fàrmacs com l'alemtuzumab.

Hi ha treballs que demostren que les alteracions a nivell de TC s'associen a variables indicadores de càrrega tumoral, com el recompte limfocitari a sang perifèrica, el grau d'infiltració medul·lar i un menor temps fins a la progressió de la malaltia (Muntañola i col·l., 2007).

1.6.3.6. DETERMINACIÓ DE RESPOSTA PER MALALTIA MÍNIMA RESIDUAL

Els criteris de l'NCI-WG de 1996 (taula 13) s'usen per avaluar la resposta al tractament i com a determinació pronòstica, ja que pacients que assoleixen algun tipus de resposta segons aquests criteris tenen millor pronòstic.

Amb l'aparició de tècniques més sensibles, com la citometria de flux de quatre colors i la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) quantitativa per a la detecció d'MMR, es discuteix la utilització dels criteris de l'NCI-WG a la pràctica clínica, ja que s'ha vist que els malalts que assolien resposta, segons criteris d'NCI-WG, típicament tenien encara presència d'MMR amb les noves tècniques de detecció.

L'avaluació de l'MMR probablement constituirà un important pronòstic predictiu atès que:

- És extremadament sensible (per citometria de fluxe es detecta una cèl·lula leucèmica entre 10^5 leucòcits normals i per PCR es pot detectar una cèl·lula leucèmica entre 1×10^6 cèl·lules normals). A més, és una tècnica ràpida, quantitativa i aplicable a tots els pacients amb LLC.
- No es veu afectada per cèl·lules B policlonals.
- Pot usar-se tant en sang perifèrica com en moll de l'os.
- A més, hi ha relació entre estat mutacional IgV_H, MMR i probabilitat de recaiguda (Hillmen i col·l., 2003; Nabhan i col·l., 2006).

Encara és aviat per recomanar l'ús rutinari de l'MMR a la pràctica clínica per valorar la resposta al tractament i com a factor pronòstic, entre d'altres motius per la falta d'estandardització d'aquestes tècniques.

Taula 13. Criteris de resposta al tractament segons l'NCI-WG

Criteri	Resposta completa	Resposta parcial	Malaltia progressiva
Síntomes	Cap		
Adenopaties	Cap	Disminució > 50%	Increment > 50% o nous nòduls
Fetge/Melsa	No palpables	Disminució > 50%	Increment > 50% i/o nous nòduls
Hemoglobina	> 11 g/dL	> 11 g/dL o millora > 50% del valor base	
Neutròfils	> 1,5 x 10 ⁹ /L	> 1,5g x 10 ⁹ /L o > 50% increment del valor basal	
Limfòcits	< 4 x 10 ⁹ /L	Disminució > 50%	Increment > 50%
Plaquetes	> 100 x 10 ⁹ /L	> 100x 10 ⁹ /L o > 50% d'increment del valor basal	
Aspirat medul·lar	< 30% limfòcits		
Biòpsia moll de l'os	No infiltrats, intersticials o nodulars	Poden trobar-se nòduls limfoides residuals	

Extret de Chenson i col·l., 1996.

A mode de resum la taula 14 mostra els cursos potencials associats a marcadors pronòstics en pacients amb LLC.

Taula 14. Cursos potencials associats a marcadors pronòstics

Marcador pronòstic	Estadi inicial, amb malaltia no tractada o asimptomàtica	Malaltia progressiva que requereix tractament	Estadi avançat o malaltia recaiguda/refractària
Deleció 17p	Progressió de la malaltia. Necessitat de tractament. OS disminuïda	Disminució de resposta a alquilants o a tractaments basats en F; disminució de PFS i OS a tractaments basats en F	Disminució de TTP i OS amb FCR o altres poliquimioteràpies
Deleció 11q	Progressió de la malaltia. Necessitat de tractament. OS disminuïda	Disminució de resposta a alquilants o a F en monoteràpia; disminució de PFS i OS a tractaments basats en F	Disminució de TTP i OS amb FCR
IgV _H No mutat	Progressió de la malaltia. Necessitat de tractament. OS i PFS disminuïts	Disminució de resposta a alquilants; disminució de resposta, PFS i OS a tractaments basats amb F; recaiguda clínica amb TASP	Recaigudes MMR positives i recaigudes clíniques amb TASP
ZAP-70 ⁺	Progressió de la malaltia. Necessitat de tractament. OS disminuït	Disminució de resposta, PFS i OS a tractaments basats en F	
CD38 ⁺	Progressió de la malaltia. Necessitat de tractament. OS disminuït	Disminució de resposta i PFS a tractaments basats en F	
B2M elevada	Progressió de la malaltia. OS disminuït		Disminució de TTP i OS amb FCR

TASP: trasplantament autòleg de progenitors hematopoètics; F: fludarabina; FCR: fludarabina, ciclofosfamida, rituximab; MMR: malaltia mínima residual; OS: supervivència global; PFS: supervivència lliure de progressió, TTP: temps fins a progressió.

Extret de Kay I col·ls, 2007.

1.6.4. FACTORS PRONÒSTICS. APLICACIONS PRÀCTIQUES

Encara han de ser aclarits diferents punts. Per exemple, si un sol marcador dóna determinació pronòstica suficientment acurada per permetre decisions de maneig clínic, o bé si s'haurien d'usar diversos marcadors a la vegada per augmentar la validesa pronòstica.

En diferents treballs s'han determinat la presència o absència de diferents marcadors pronòstics en pacients no tractats amb LLC que presentaven signes de progressió i, per tant, candidats a rebre tractament (taula 17). Es mesura la resposta al tractament iniciat, supervivència lliure de progressió i supervivència global.

En resum, els resultats obtinguts permeten dividir als pacients en 3 grups de risc:

- Un grup d'alt risc (6% dels pacients), que són els que presentaven pèrdua de p53.
- Un grup de risc intermedi (72%), sense pèrdua de p53 i amb almenys un dels factors següents: gens V_H no mutats i/o Ig V_{H3-21} , deleció 11q, B2M > 4 mg/L.
 - Intermedi baix (1 factor de risc).
 - Intermedi alt (2 o 3 factors de risc).
- Un grup de baix risc (22%) amb absència de tots els anteriors o gens V_H mutats.

La supervivència lliures de progressió als 5 anys va ser 0%, 12% i 34%, respectivament, i la supervivència global als 5 anys va ser 9%, 53% i 79%, respectivament.

Aquestes dades haurien de facilitar el disseny de nous assaigs per al tractament de malalts en estadis avançats de la malaltia o estadis inicials amb factors de mal pronòstic (Oscier i col·l., 2010).

Entre els pacients amb estadis inicials i prèviament no tractats, aproximadament el 25-50%, tindran marcadors d'alt risc, incloent 17p- o 11q- (12-14% entre els estadis Rai 0-2 o Binet A), IgV_H no mutada (28-40% en Binet A) i/o ZAP-70 + (52% entre Rai 0 o Binet A).

L'ús dels nous factors pronòstics en l'LLC apunta que és de gran utilitat en l'LLC i han de permetre en un futur aclarir el maneig pràctic de la malaltia. Per exemple:

- Pacients joves amb marcadors de mal pronòstic (sense mutació a gens IgV_H o mutacions de p53, per exemple) haurien de ser considerats per a tractaments nous o intensius independentment del seu estadi clínic (Kharfan-Dabaja i col·l., 2007; Oscier i col·l., 2002).
- Al voltant del 50% dels pacients en els quals s'adopta la posició d'esperar i veure de cara a l'inici del tractament, tenen un o més marcadors de mal pronòstic de la malaltia. Amb aquesta base, una teràpia iniciada

precoçment podria justificar-se en grups amb marcadors de mal pronòstic, encara que amb un estadi clínic inicial.

Malgrat tot, la determinació dels nous factors pronòstics, no pot ser encara criteri per iniciar tractament en malalts en estadis inicials, a causa de la falta d'harmonització d'aquests factors entre els diferents laboratoris i a que encara no hi ha suficient evidència demostrada en assajos prospectius dels avantatges que pot conferir aquest tractament precoç (Brugiatelli i col·l., 2006; Chiorazzi i col·l., 2005; Halleck i col·l., 2005; Montserrat, 2006).

En aquest sentit, s'estan duent a terme diferents assajos clínics prospectius que avaluen l'efecte pronòstic dels marcadors en el resultat dels tractaments. Entre aquests, l'assaig CLL7 del grup alemany per a l'LLC, que estratifica per risc pacients en estadi A de Binet en funció de diferents factors pronòstics. No obstant això, els pacients en estadis inicials, però que tenen alt risc de progressió s'al·leatoritzen per si han de rebre tractament o no. En l'estudi, els pacients de baix risc es mantindran en actitud d'esperar i veure. Els resultats d'aquest treball encara estan pendents d'obtenir-se (Kay i col·l., 2007).

A la pràctica clínica, els nous factors pronòstics sí que són d'utilitat per conèixer el pronòstic inicial individual. S'han establert normogrames pronòstics (taules 15 i 16) en malalts no tractats que identifiquen factors de risc per predir la supervivència global. Aquests models pronòstics poden ajudar pacients i

metges de cara a decisions clíniques, així com a la recerca i disseny d'assajos (Wierda i col·l., 2007).

Taula 15. Índex pronòstic basat en la presència de factors de risc

Característiques	Puntuació			
	0	1	2	3
Edat (anys)	-	<50	50-65	>65
B2M (mg/L)	<LSN	1-2 x LSN	> 2 x LSN	-
Recòmpte limfocitari (x10⁹/L)	< 20	20-50	>50	-
Sexe	Dona	Home	-	-
Estadi Rai	0-II	III-IV	-	-
Nre. d'àrees ganglionars involucrades	≤2	3	-	-

L'índex pronòstic és la suma total de punts de cada una de les 6 característiques. Un índex d'1-3 indica baix risc; 4-7 risc intermedi; ≥8, alt risc. -, no aplicable; LSN, límit superior de normalitat.

Extret de Wierda i col·l., 2007

Taula 16. Supervivència global (OS) i risc relatiu (RR) de mortalitat segons els grups de risc (n = 1.617)

Grup de risc	Índex score	Nre. de malalts	5-a OS (DE)	10-a OS (DE)	RR	95% IC
Baix	1-3	194	0,97 (0,01)	0,8 (0,01)	1	Referència
Intermedi	4-7	1.236	0,80 (0,01)	0,52 (0,01)	3,89	2,42-6,26
Alt	≥ 8	187	0,55 (0,04)	0,26 (0-0,6)	10,48	6,27-17,53

Extret de Wierda i col·l., 2007.

Altres mètodes d'estratificació per risc inclouen els paràmetres següents (taula 17):

Taula 17. Grups de risc segons el CLL4 trial

Grup de risc	Definició	Progrèssió o mort/n	Univariant valor-p	Supervivència a 3 anys
	> 20% pèrdua p53			
Estàndard	V _H no mutat o delecció 11q o V _H 3-21	208/292		24,7%
Bo	Mutació V _H excloent V _H 3-21	79/161		

Extret d'Oscier i col.l., 2010.

Aquests mètodes permeten classificar els pacients amb estadis inicials de Rai (0-I) amb LLC, segons els criteris següents mostrats a la taula 18:

Taula 18. Grups de risc de pacients amb estadis inicials d'LLC

Grup de risc	Criteris
Pacient simptomàtic	Pacient amb febre, pèrdua de pes, suors nocturnes o fatiga no explicable per altres causes
Pacient de baix risc	Asimptomàtics Sense 17p- o 11q- Amb 13q-, cariotip normal o mutació dels gens IgV _H (o baixa expressió de ZAP-70)
Pacient de risc intermedi	Asimptomàtics Amb trisomia 12
Pacient d'alt risc	Asimptomàtics Amb 17p- o 11q- Sense mutació del gen IgV _H (o alta expressió de ZAP-70)

Extret de Shanafelt i col.l., 2007.

Recentment també s'ha proposat un índex pronòstic basat en trets clínics i de laboratori reproduïbles, per tal de predir la supervivència en malalts prèviament no tractats per LLC. Els malalts en estadis inicials d'LLC es divideixen en diferents grups pronòstics, segons la puntuació obtinguda en cada un dels factors de risc (taula 19): baix risc, 0-2 punts; risc intermedi, 3-4 punts; i alt risc, 5-7 punts. La probabilitat de mantenir-se lliure de tractament als 5 anys és del 100% en el grup de baix risc, 81,2% en el grup de risc intermedi i de 61,3% en el grup d'alt risc. (Molica i col·l., 2010).

Taula 19. Índex pronòstic basat en factors de risc

Característica	Puntuació			
	0	1	2	3
Edat (anys)	-	<50	50-65	> 65
B2M (mg/L)	< ULN	1-2 x ULN	> 2 x ULN	-
Sexe	Femení	Masculí	-	-
Estadi Rai	0	I-II	-	-
Nombre d'àrees ganglionars afectades	0-2	> 3		

B2M: beta-2 microglobulina, ULN: per sobre del límit normal, ALC: recompte limfocitari absolut.

Extret de Molica i col·l., 2010.

A mode de resum la taula següent mostra els factors de mal pronòstics reconeguts en l'LLC:

Taula 20. Factors de mal pronòstic en l'LLC

Estadi avançat al diagnòstic
Edat avançada
Sexe masculí
Patró difús d'infiltració de moll de l'os
TDL curt
Alta expressió de Ki67, p27
Alts nivells sèrics de B2M, timidina-cinasa, CD23s, factor de necrosi tumoral
Citogenètica de mal pronòstic
Alts nivells de CD38
Alts nivells de ZAP-70
Alts nivells d'expressió de lipoproteïna-lipasa
Expressió alterada de micro-RNA
Resposta pobre i/o de curta durada al tractament

Extret de Gribben, 2010.

1.6.5. VALIDACIÓ DE MARCADORS PRONÒSTICS ADDICIONALS

Donada la importància de la determinació dels factors pronòstics per predir l'evolució de la malaltia, ja en fases inicials d'aquesta, hi ha un interès creixent en la validació de nous factors, que reforcin i ampliin aquesta informació de cara al maneig pràctic de l'LLC.

En la determinació del paper dels factors pronòstics per a la identificació de subgrups de pacients d'alt risc amb LLC cal tenir present que:

- La capacitat d'un nou marcador pronòstic per predir el curs clínic de la malaltia és altament depenent de la situació clínica de cada malalt.

- Un marcador pronòstic pot predir per diferents aspectes, tals com la probabilitat de progressar de la malaltia, la supervivència global i/o la resistència a tractament, i alguns marcadors poden ser vàlids per a punts en concret.
- La significació dels diferents factors pronòstics pot sobreposar-se entre aquests i no sempre la significació de cada un d'aquests és independent de la presència o no dels altres.
- Diferents factors pronòstics poden combinar-se per donar una estratificació de risc de la malaltia més acurada que no de manera individual.
- Diferents factors pronòstics, considerats per a ser predictius en el mateix aspecte, poden tenir resultats discordants.

Un nou marcador pronòstic, per incloure'l com a tal, cal que aportí informació addicional sobre les eines que ja hi ha per a justificar el cost que suposi en el maneig del pacient.

L'elecció de l'ús de factors pronòstics ha de seguir les consideracions següents:

- Ha de ser barat, accessible, controlable i validat en assajos clínics.
- Ha d'aportar informació addicional als factors ja coneguts.
- Ha de tenir en consideració que el valor dels diferents factors pot variar en funció dels tractaments (p. ex., anormalitats de p53 prediuen resposta

pobra a alquilants, rituximab en monoteràpia i anàlegs de les purines, però no a altes dosis de corticoides o alemtuzumab) i també al llarg de la malaltia (p. ex., expressió de CD38, mentre que l'estat mutacional de gens IgV_H es manté constant al llarg de la malaltia) (Oscier i col·l., 2004; Wierda i col·l., 2006).

Així, recentment, es realitzen esforços en la recerca i detecció de nous marcadors pronòstics que es correlacionin amb els ja testats, que superin els desavantatges d'us d'aquests darrers, i que a la vegada siguin capaços d'aportar informació pronòstica addicional de cara al tractament d'individus en estadis precoços de la malaltia amb alt risc de progressió.

2. RADICALS LLIURES I ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN

2.1. GENERALITATS

Els radicals lliures (RLL) són molècules o fragments moleculars que contenen un o més electrons desaparellats a l'orbital més extern. També han estat definits com a espècies químiques amb electrons de similar *spin* direccional. S'ha de recordar que els electrons, en els àtoms, ocupen regions de l'espai conegudes com a orbitals. A cada orbital hi ha com a màxim dos electrons amb *spins* direccionals oposats (figura 6).

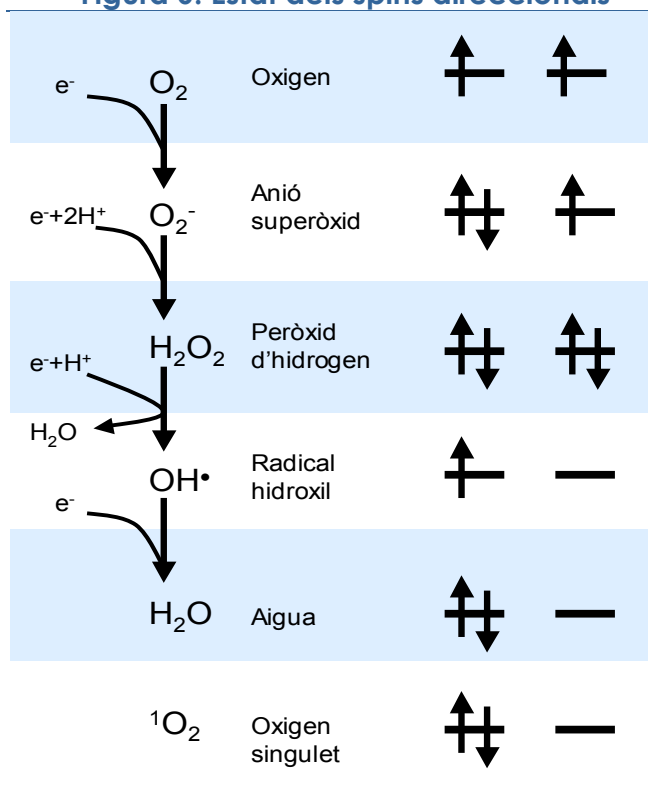
A principis del segle XX, Gomberg (1900) i Paneth (1923) ja van demostrar l'existència d'unes molècules relativament estables que tenien un electró desaparellat en l'orbital més extern. Des de llavors, l'estructura dels RLL està representada pel símbol R^\bullet , en què el punt indica la presència d'un electró desaparellat, és a dir, que està sol a l'orbital. La majoria de molècules biològiques no tenen radicals, sinó que els seus electrons estan aparellats, ja que les molècules són més estables quan els electrons estan aparellats en l'orbital (Halliwell, 1989).

Una molècula pot convertir-se en radical lliure tant per guany com per pèrdua d'electrons i també per fissió d'enllaços homolítics. En trencar-se un enllaç covalent de manera simètrica tots dos fragments retenen un electró i, per tant,

es converteixen en un radical lliure. Aquest electró desaparellat confereix al radical lliure una gran inestabilitat, tant energètica com cinètica, cosa que fa que siguin compostos altament reactius (Axelrod i col·l., 1990; De Paulet, 1990). Si el que fa el radical és donar o agafar un electró d'un no radical, aquest es transforma en radical i inicia una reacció en cadena que té com a resultat la generació de múltiples radicals lliures (Halliwell, 1989).

En els últims vint anys hi ha hagut un interès cada vegada més gran en l'estudi d'aquestes molècules i del seu comportament en els sistemes biològics. Hi ha molts treballs que pretenen aclarir les implicacions dels RLL en l'ésser humà, no solament la seva fisiologia des del punt de vista molecular sinó també el seu comportament en diferents patologies, en les quals aquests elements es poden generar com a conseqüència o a causa d'aquestes patologies. Per arribar a entendre la importància que tenen els radicals lliures en l'ésser humà cal conèixer amb anterioritat les molècules que poden formar-los, els tipus d'RLL que hi ha i els mecanismes utilitzats per generar-los.

Figura 6. Estat dels spins direccionals



Estat dels spins direccionals de diverses molècules implicades en la cadena de reacció dels radicals lliures.

2.1.1. ORIGEN DELS RADICALS LLIURES

Els RLL poden provenir de diferents molècules, entre les quals tenim les següents:

- l'àtom d'hidrogen (H^\bullet)
- l'oxigen molecular (O_2)

- els metalls de transició, com el ferro i el coure, que tenen un paper important en els processos de lipoperoxidació
- les molècules d'oxigen nitrogenades (NO_x), com el NO i el NO_2 , que són contaminants atmosfèrics,
- els fosfolípids de les membranes, que en ser atacats per substàncies oxidants desencadenen la lipoperoxidació
- qualsevol molècula que, en acceptar energia o per trencament d'enllaços, pot convertir-se en RLL.

De totes aquestes molècules ens centrarem en la molècula d'oxigen. L'existència dels organismes superiors està condicionada per la presència d'oxigen. L'ésser humà és aerobi i, per tant, no pot existir sense l'oxigen; tanmateix, aquest oxigen és, a la vegada, perillós per a la seva existència ja que pot formar RLL. Aquesta dualitat, coneguda des de fa molts anys, està començant a ser entesa a través de les espècies actives de l'oxigen i els **radicals lliures d'oxigen** (RLLO) (Thannickal, 2003).

El perill de l'oxigen és inherent a la seva estructura. L'àtom d'oxigen en estat estable té vuit electrons, dos dels quals són imparells, amb *spin* paral·lel. La molècula d'oxigen (O_2) és doncs un bon agent oxidant ja que els hidrogenions que atrau ocupen els spins vacants en l'orbital i es col·loquen de manera antiparalel·la. En captar energia, l'oxigen pot produir formes més reactives. Les espècies reactives de l'oxigen (ERO) més importants es detallen a la taula 21.

L'oxigen molecular actua com a element oxidant en acceptar fins a quatre electrons a l'orbital més extern -reducció tetravalent- per donar lloc a dues molècules d'aigua. El O_2 pot també sofrir una reducció univalent, divalent o trivalent, en acceptar un, dos o tres electrons, de la qual cosa en resulta la formació d'espècies reactives d'oxigen.

Els RLO són les formes moleculars o atòmiques de l'oxigen que posseeixen un nombre imparell d'electrons en l'òrbita externa, ja sigui per fixació d'un electró suplementari, per transferència d'un electró a partir de l'òrbita interna o per la pèrdua d'un electró de l'òrbita externa.

Els RLO són molt reactius i tenen una gran capacitat de participar en reaccions en cadena, tot formant una cascada de radicals lliures susceptibles de desnaturalitzar i de destruir nombroses molècules biològiques com lípids, proteïnes i àcids nucleics (Junod, 1989).

Sovint, el terme *radical d'oxigen* està mal utilitzat, perquè s'assigna a tots els reactius intermedis de les espècies d'oxigen, incloent-hi totes les formes moleculars que no són radicals. Per aquest motiu, seria més indicat parlar d'*espècies reactives d'oxigen* (ERO) en lloc de radicals lliures d'oxigen.

Taula 21. Espècies reactives de l'oxigen (ERO)

Radicals		
Hidroxil	$\cdot\text{OH}$	
Alcoxil	$\text{L(R)O}\cdot$	
Hidroperoxil	$\text{HOO}\cdot$	És l'àcid conjugat de l'anió superòxid i és present en solució aquosa a concentracions dependents de pH
Peroxil	$\text{L(R)OO}\cdot$	
Òxid nítric	$\text{NO}\cdot$	Per ell mateix és poc reactiu i a vegades es veu com a antioxidant en la peroxidació lipídica, però en presència de superòxid forma peroxinitrit, que és molt oxidant
Superòxid	$\text{O}_2^{\cdot-}$	No és un bon oxidant però és capaç d'oxidar i reduir ions de metalls de transició. Com a resultat, genera peròxid d'hidrogen que pot a la vegada formar els radicals hidroxil en presència d'ions reduïts de metalls de transició
No radicals		
Peroxinitrit	ONOO^-	
Hipoclorit	^-OCl	
Hidroperòxid	L(R)OOH	En presència d'ions de metalls de transició, permet la formació de radicals alcoxil i peroxil
Oxigen singulet	$^1\text{O}_2$	
Peròxid d'hidrogen	H_2O_2	

Extret d'Abuja i col·l., 2001.

2.1.2. TIPUS D'ERO

- El *radical superòxid* és una molècula d'oxigen que ha fixat un electró extern suplementari. Es representa amb el símbol $\text{O}_2^{\cdot-}$. Si bé aquest radical no és una espècie particularment reactiva, pot fàcilment travessar lípids de membrana per mitjà de canals d'anions i produir altres

radicals lliures molt més reactius, com el **radical hidroxil** ($\cdot\text{OH}$) i el **radical perhidroxil** (HO_2^-), per exemple (Axelrod i col·l., 1990).

- El *radical hidroxil*, $\cdot\text{OH}$, és el resultat de la descomposició de l'aigua oxigenada (H_2O_2). Està format a partir del radical superòxid i és encara més reactiu que el primer i té una vida més curta. La formació dels radicals hidroxils de l'aigua pot ser catalitzada per productes que continguin ferro, com la ferritina, l'hemoglobina o la mioglobina. Igual que l'anió superòxid ($\text{O}_2^{\cdot -}$), està format per processos enzimàtics estimulats per aportacions energètiques, sobretot en forma de radiacions ultraviolades (UV), lumíniques o ionitzants.

- L'*oxigen singlet*, $^1\Delta\text{O}_2$, igualment molt agressiu, no és un RLLO, però sí que es tracta d'una molècula d'oxigen excitada, la qual, sota l'acció directa d'un quàntum d'energia, ha transferit un electró de l'òrbita interna a l'òrbita externa. Aquesta captació d'energia per la molècula de O_2 modifica la seva configuració electrònica externa, cosa que condueix a dues formes particularment reactives, una de tipus radicalari i l'altra de tipus no radicalari, les quals, a causa de la seva relativament llarga vida mitjana, tenen un paper molt important en les oxidacions de microorganismes.

- Totes aquelles ERO que van apareixent al llarg de la lipoperoxidació i que, atesa la seva naturalesa, esdevenen a la vegada radicals; per exemple, els radicals acicloxil, acilperoxil i d'altres (Pré, 1991).

Les ERO tenen la particularitat de reaccionar, amb relativa facilitat, amb substrats endògens cel·lulars i ho fan també amb altres substrats exògens.

Un *radical lliure* és un fragment molecular amb un electró sol a la seva òrbita exterior, que provoca una oxidació molt alta, és inestable i reacciona instantàniament amb altres substàncies pròximes. La seva vida biològica mitjana és inferior a microsegons, però té la capacitat de reaccionar amb tot el que hi ha al seu voltant, cosa que provoca un gran dany a molècules i membranes cel·lulars. Aquestes reaccions poden produir una cascada de radicals lliures amb els efectes multiplicats, una autèntica reacció en cadena.

2.1.3.MECANISMES DE PRODUCCIÓ DELS RLO I LES ERO

L'activació de l'oxigen és produïda per una reducció monovalent, de la qual en resulta la formació de l'anió superòxid, el peròxid d'hidrogen, el radical hidroxil i, finalment l'aigua. La primera reacció, que implica la formació de superòxid, és una reacció endotèrmica, mentre que la resta de reaccions són exotèrmiques.

El *superòxid* ($O_2^{\bullet -}$) pot actuar com a oxidant o com a reductor; pot oxidar sulfur, àcid ascòrbic o NADPH, o pot reduir el citocrom C i ions metàl·lics. Una reacció de dismutació duu a la formació de peròxid d'hidrogen i oxigen, bé espontàniament o bé per la catàlisi de l'enzim superòxid-dismutasa (SOD). En el seu estat protonat ($pK_a = 4,8$), el superòxid forma el radical perhidroxil, el qual és un potent oxidant, però la seva funció biològica és menor arran de la seva baixa concentració a pH fisiològic.

La reducció univalent del superòxid produeix *peròxid d'hidrogen* (H_2O_2), el qual no és un radical lliure, perquè tots els seus electrons estan aparellats. El peròxid d'hidrogen és permeable a través de les membranes de manera que no queda compartimentat a l'interior cel·lular. Nombrosos enzims, peroxidases, utilitzen el peròxid d'hidrogen com a substrat en reaccions d'oxidació implicades en la síntesi de complexes molècules orgàniques.

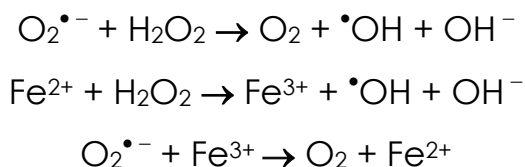
El peròxid d'hidrogen no té una reactivitat per si mateix, sinó que necessita la presència d'un metall reductor per formar *radical hidroxil* ($\bullet OH$), el qual és l'agent oxidant més potent i reactiu dels que es coneixen.

Fenton va descriure el potencial oxidatiu del peròxid d'hidrogen mesclat amb sals de ferro a finals del segle XIX.



En els sistemes biològics, la disponibilitat d'ions ferrosos marca el factor limitant, però com a conseqüència del reciclatge del ferro, gràcies a un agent reductor -des d'ions fèrrics a ferrosos- és possible el manteniment d'una reacció de Fenton, de la qual en resulta la generació de radicals hidroxils (Pré, 1991).

Un agent reductor possible és el superòxid, el qual participa en la reacció global (la primera) que és la suma de les altres dues:

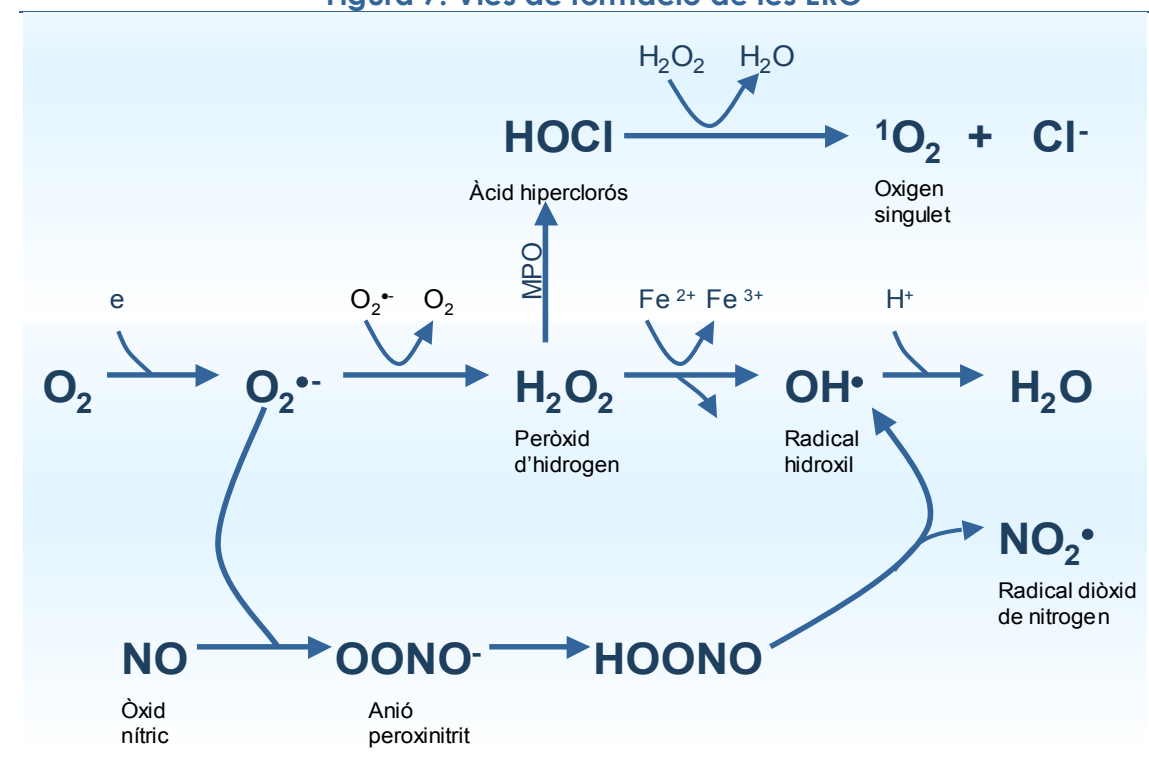


Així doncs, en presència de traces d'ions de ferro, la reacció del superòxid amb el peròxid d'hidrogen generarà els perillosos radicals hidroxils i, així, aquests radicals podran iniciar l'oxidació de substrats orgànics.

Els metabòlits de O_2 tenen una vida molt curta, per exemple de l'ordre de 10^{-9} s per al $\bullet\text{OH}$; altres metabòlits actius, com el H_2O_2 , són molt més estables (Kohen i col.l., 2002).

Els radicals hidroxils es poden produir també a través d'una via Fe-independent a partir de l'òxid nítric (figura 7). Aquesta via també promou la formació del radical diòxid de nitrogen (NO_2^\bullet).

Figura 7. Vies de formació de les ERO



Extret de Benzie i col.l., 2003.

Qualsevol substància, endògena o exògena, que pugui tenir reduccions podria formar un radical que després reacciona amb el O_2 i genera $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell, 1989).

2.1.4. FONTS D'RLLO I D'ERO

Les ERO poden tenir un origen tant endogen, de la mateixa cèl·lula, com exogen.

Entre les *fonts endògenes* destaquen:

- La cadena respiratòria, en què la reducció monovalent de la molècula d'oxigen dóna lloc a la formació de la majoria d'aquests compostos. A més el O_2 actua com a acceptor d'electrons i dóna origen a la formació de radicals.
- Les cèl·lules fagocitàries (neutròfils, monòcits o macròfags), que utilitzen el sistema de la NADPH-oxidasa i generen directament anió superòxid ($O_2^{\bullet-}$). Per altra banda, com a mecanisme de defensa, aquestes cèl·lules també generen òxid nítric (NO^{\bullet}), per acció de l'òxid nítric sintasa sobre l'arginina. Per tant, les cèl·lules dotades de propietats fagocitàries, sota la influència d'estímuls bacterians o proinflamatoris, produeixen fisiològicament les ERO, que els permeten destruir els microorganismes. Al

mateix temps, però, la formació d'ERO pot alterar altres molècules i contribuir als processos inflamatoris.

Els *factors exògens* que incrementen la producció d'ERO són els següents:

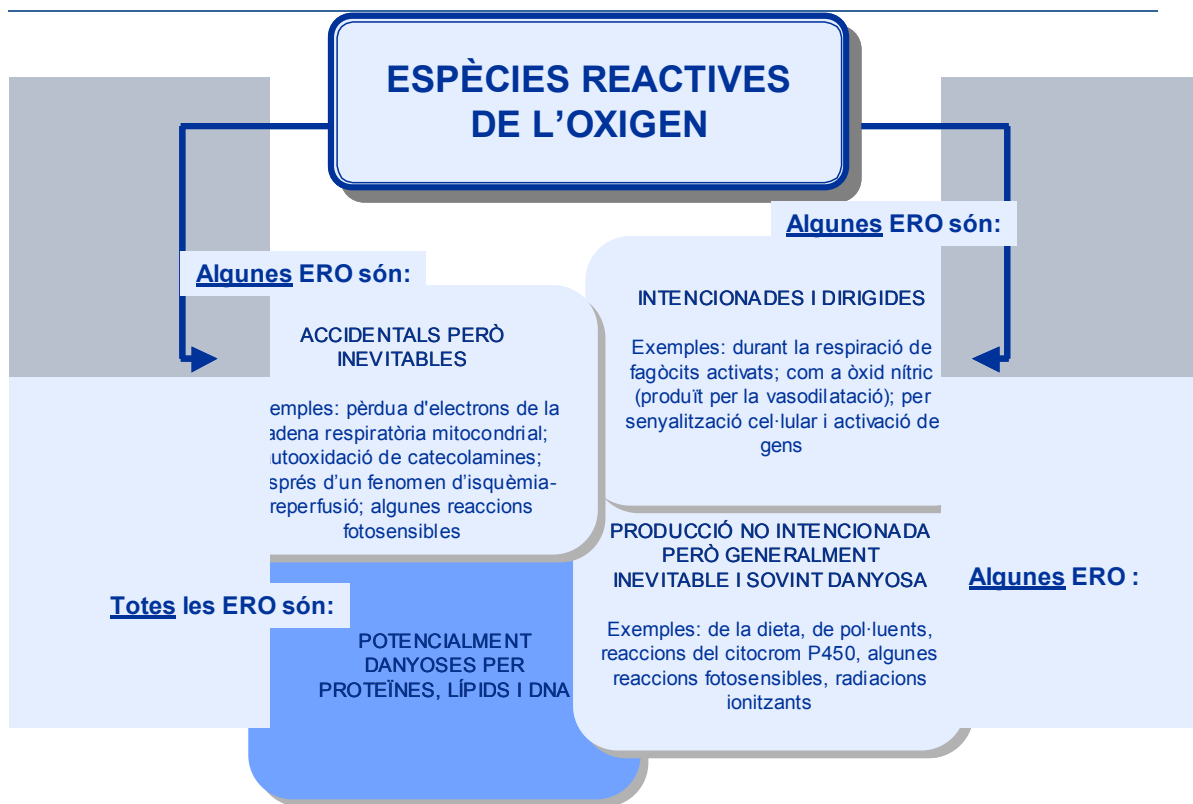
- Factors químics:
 - Augment dels metalls pesants, reaccions en presència de plom, ferro o coure tipus Fenton. El peròxid d'hidrogen, en presència de metalls produeix radical hidroxil, un dels més reactius i perillosos.
 - Components del fum del tabac com l'amoniac, el benzopirè, el cianur d'hidrogen, el diòxid i el monòxid de carboni, restes de plom o arsènic, etc.
 - Els inhibidors de sistemes defensius antioxidants, com l'azida, la hidroxilamina, l'aminotriazol, que inhibeixen les catalases (CAT), i l'àcid ditiocarbàmic, que inhibeix la superòxid-dismutasa (SOD).
 - Fàrmacs que indueixen la proliferació de peroxisomes com el clofibrat, i fàrmacs antineoplàstics, en els quals l'eficàcia està lligada a la seva transformació en radical, tot causant el dany irreversible dels enzims, membranes i DNA de les cèl·lules tumorals (Pré, 1991; Dansen i col·l., 2001).
 - Els agents actius sobre les membranes cel·lulars, que són importants sota el punt de vista de la carcinogènesi, entre els quals tenim lectines, teleodicina, mezerines, l'aflatoxina B1, el benzopirè, l'asbest i la sílice (Clemens i col·l., 1980; Romero i col·l., 1990).

-
- Nombroses molècules estranyes a l'organisme són l'origen d'una producció indirecta de $O_2^{\bullet-}$ (p. ex. toxicitat pulmonar per paraquat) (Pré, 1991).
- Factors físics:
- Les radiacions ultraviolades i les radiacions de l'espectre visible que intervenen com a quàntums d'energia a la pell i estimulen la formació de superòxids i d'oxigen singulet (Romero i col·l., 1990).
 - L'oxigen hiperbàric. Una pressió parcial elevada d'oxigen, per exemple, en els alvèols pulmonars, incrementa significativament la formació de $O_2^{\bullet-}$. En aquest sentit, durant la recuperació dels estats anòxics, la reoxigenació sobtada i massiva d'un òrgan isquèmic (reperfusió) s'acompanya paradoxalment d'un agreujament del dany cel·lular -paradoxa de l'oxigen- que és, en efecte, la conseqüència d'una hiperoxidació de $O_2^{\bullet-}$. Aquests processos han estat tots particularment estudiats en la isquèmia miocàrdica i intestinal (Maffei i col·l., 1999).
 - Les radiacions ionitzants, generades per les explosions atòmiques, provoquen la formació de grans quantitats d'ERO, que seran les responsables d'anomalies cromosòmiques lligades al seu efecte sobre el DNA.
- Factors orgànics i metabòlics:
- Dieta hipercalòrica o amb poc contingut en antioxidants.

- Patologies com la diabetis, processos inflamatoris, traumatismes i isquèmia-reperfusió.
- Exercici extenuant.

Les principals característiques de les ERO es resumeixen a la figura 8.

Figura 8. Característiques de les ERO



Extret de Benzie i col·l., 2003.

2.2. SISTEMES ANTIOXIDANTS

Com hem vist fins ara, la producció d'ERO és un fenomen natural, dinàmic i continu. El dany que aquests compostos poden provocar depèn d'un delicat equilibri amb els sistemes antioxidants que protegeixen les cèl·lules del nostre organisme.

Un *antioxidant* es pot definir com qualsevol molècula capaç d'inhibir o prevenir l'oxidació d'un substrat susceptible (Benzie, 2003). Els nivells d'antioxidants s'utilitzen com a biomarcadors del distrès oxidatiu, ja que tenen un temps de vida mitjana més llarg que els radicals lliures, que són molt més difícils de quantificar.

Els mecanismes de defensa per neutralitzar les ERO són múltiples i variats i es poden dividir en dos grups segons la seva *naturalesa*:

- *Enzimàtics*: Representen la primera barrera per a la producció d'ERO. Es tracta d'enzims amb capacitat antioxidant, que no es consumeixen en reaccionar amb les ERO, i són dependents de certs cofactors, generalment metalls, com el coure, el ferro, el magnesi, el zinc o el seleni. Els enzims antioxidants més importants són la superòxid-dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatió-reductasa (GR) i la glutatió-peroxidasa (GPx).

La *SOD*, descoberta a final dels anys seixanta (McCord i col·l., 1969), catalitza la transformació del radical superòxid en peròxid d'hidrogen, que pot ser alhora transformat, gràcies a la *CAT*, en aigua i oxigen molecular. Encara que l'anió superòxid, com ja hem vist, no és per si mateix particularment reactiu, pot reduir metalls de transició, com el ferro, i així convertir-se en un dels radicals més potents com és el radical hidroxil. Per això, és important l'eliminació del superòxid.

La *GR* és un enzim que catalitza la reducció del glutatió oxidat a glutatió reduït, el qual serà utilitzat per la *GPx*.

La *GPx* redueix peròxids lipídics (*ROOH*), formats durant l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats (*PUFA*, de l'anglès *polyunsaturated fatty acids*), en una molècula d'àcid gras hidroxil (*ROH*), que és no tòxica i és estable. Juntament amb les fosfolipases, la *GPx* també pot convertir els hidroperòxids fosfolipídics (*L-OOH*) en hidròxids fosfolipídics (*L-OH*) (Ursini i col·l., 1982; Van Kuijk i col·l., 1987).

- *No enzimàtics*: Elements principalment exògens, responsables de la capacitat antioxidant dels fluids biològics. Aquests compostos, a diferència dels enzims, es consumeixen durant la seva acció antioxidant, motiu pel qual han de ser reemplaçats. Provenen principalment de la dieta a través de les aportacions de vitamina E, vitamina C, betacarotens, polifenols, flavonoides i oligoelements. A més, hi ha alguns components d'origen endogen com el glutatió (*GSH*), l'urat, l'ubiquinol,

la melatonina i algunes proteïnes plasmàtiques que també exerceixen un rol protector.

Segons l'*estructura química*, els antioxidants no enzimàtics podem classificar-los en:

- *Proteïnes d'alt pes molecular*: Albúmina, ceruloplasmina, transferrina i haptoglobulina. Són presents en el plasma i s'uneixen a metalls per reduir la possibilitat de producció de radicals lliures catalitzats per metalls (Halliwell i col·l., 1989).

- *Antioxidants de baix pes molecular*: Els podem dividir en antioxidants solubles, lípids (tocoferol, carotens, quinones, bilirubina i alguns polifenols) i antioxidants solubles en aigua (àcid ascòrbic, àcid úric i alguns polifenols). El glutatió (GSH), la vitamina C (àcid ascòrbic), la melatonina i l'àcid úric són els més importants, ja que a més de ser potents antioxidants tenen també un efecte sinèrgic amb altres antioxidants.

El **GSH** és un antioxidant molt important, tant a l'interior de la cèl·lula com al compartiment extracel·lular. Les característiques del GSH i de la mateixa molècula quan s'oxida (GSSG) es detallen més endavant. Aquestes molècules tenen la capacitat de retardar o inhibir el dany cel·lular.

Segons el *mecanisme d'acció* dels antioxidants, els podem classificar d'aquesta manera:

- Un primer mecanisme pot ser el que trenca la cadena de formació de radicals lliures: l'antioxidant dóna un electró a l'RLLO present en el sistema. Un exemple és la neutralització dels radicals lipídics.

- El segon mecanisme implica l'eliminació dels radicals lliures mitjançant antioxidants secundaris que esmorteixen la catalització de la reacció en cadena dels radicals lliures.

No s'ha d'oblidar que alguns antioxidants també poden tenir efectes sobre l'expressió gènica directament o indirectament (Vaya i col·l., 2001). Un cert nombre de gens es regulen per canvis en l'estat d'oxidoreducció cel·lular (Allen i col·l., 2000). I aquest estat depèn, entre altres coses, del balanç prooxidant-antioxidant en els teixits i la sang, i també del tipus i nivell dels antioxidants presents.

Segons el *lloc d'acció* hi haurà diferent grau de defensa contra processos radicalaris:

- En el medi intracel·lular la protecció està assegurada per:
 - Enzims citosòlics que catalitzen l'eliminació de $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 , amb la qual cosa es redueix al màxim la formació de $\bullet OH$.

- Molècules amb capacitat de fixar i destruir radicals lliures: els scavengers (recol·lectors) i els neutralitzants de l'oxigen singulet o quenchers (desactivadors). Els scavengers tenen la propietat de bloquejar i destruir els radicals lliures oxigenats, destruint-se o modificant-se ells mateixos. Els quenchers estan implicats en la protecció contra els processos radicalaris de peroxidació lipídica.

- El compartiment extracel·lular només disposa de mitjans de protecció febles. En zones inflamatòries, els seus constituents estan plenament exposats al flux d' $O_2^{\bullet -}$ i H_2O_2 provinent dels fagòcits actius. Scavengers i quenchers participen poc en la defensa extracel·lular. En el plasma, sembla admès que els antioxidants que actuen són principalment la vitamina C, l'urat, la α -tocoferol i l'albúmina, per ordre decreixent d'eficàcia.

Per prevenir la creació descontrolada de les ERO, les cèl·lules tenen una gran varietat de sistemes de control antioxidant. Els antioxidants regulen les reaccions desitjades i necessàries dels radicals lliures i els eliminen o neutralitzen quan són perillosos.

Així com l'eficàcia dels antioxidants, en matèria de prevenció d'algunes malalties és un fet demostrat àmpliament, la utilització com a mètode terapèutic és més discutida (Kalliora i col·l., 2006; Lewis, 2004). Molts estudis

veuen una millora de la patologia gràcies a una teràpia antioxidant (Rodrigo i col·l., 2005), però d'altres no perceben aquesta millora. Per aquest motiu, la teràpia antioxidant ha de tenir en compte el tipus de radicals que es formen en cada malaltia i els sistemes que són afectats per l'oxidació.

El futur de la teràpia antioxidant és tenir antioxidants de síntesi capaços d'actuar en els diferents nivells on té lloc l'oxidació i el dany de radicals lliures, en els casos on hi ha patologia diagnosticada (Day, 2004) i promoure una dieta rica en vitamina C, carotenoides, vitamina E, polifenols i altres antioxidants alimentaris en la població general per afavorir la prevenció de determinades malalties.

3. EL DISTRÈS OXIDATIU

Tal com hem vist, hi ha una producció necessària i inevitable de radicals lliures d'oxigen en el nostre cos. Així mateix, també hi ha mecanismes per aturar-ne l'efecte negatiu sobre les diferents estructures.

El balanç entre producció i eliminació dels RLLLO és el que determinarà, doncs, l'estat general de l'individu en aquest sentit. El que ens dóna una idea sobre aquest estat és, per una banda, la quantitat de radicals lliures que hi ha i, per l'altra, la quantitat i la qualitat dels enzims i altres substàncies antioxidants que s'encarreguen de neutralitzar els electrons desaparellats.

Podem trobar-nos, doncs, amb diverses situacions:

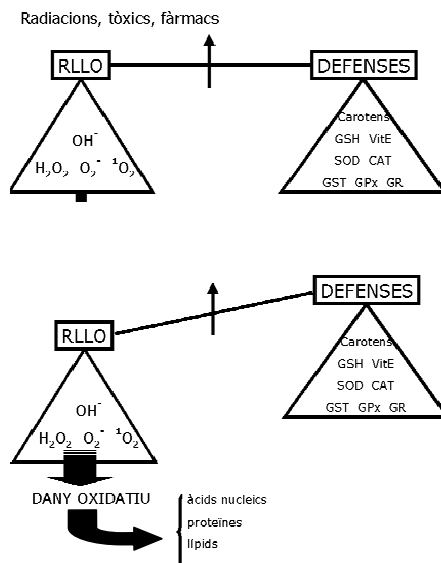
- Equilibri: Es pot donar sempre que el nivell de formació dels radicals lliures sigui equiparable al nivell de neutralització d'aquests radicals. És a dir, encara que l'agressió radicalària augmenti, si els sistemes defensius responen de la mateixa manera, es manté l'equilibri de la balança.
- Desequilibri: Té com a conseqüència un augment del dany de tipus radicalari, és el resultat de dues situacions diferents.
 - En primer lloc, si augmenta l'agressió per part dels radicals lliures però els sistemes de defensa, tot i estar en situació normal, no poden neutralitzar-los en la seva totalitat, hi haurà dany oxidatiu.

- En segon lloc, encara que els nivells de formació d'RLLO siguin els esperats, si els antioxidants es troben disminuïts respecte a la normalitat, també hi haurà un desequilibri a favor del dany oxidatiu i, per tant, ens trobem amb un estat de distrès.

L'esquema següent (figura 9) representa la balança de producció i eliminació d'RLLO i el possible desequilibri indicador de distrès oxidatiu.

Parlem, però, en el nostre treball, de *distrès oxidatiu*, ja que la balança presentada també es pot decantar de manera oposada als desequilibris explicats fins ara. És a dir, l'individu pot trobar-se en un estat antioxidant quan, si són normals els nivells de formació d'ERO, tingui les defenses augmentades amb relació amb aquestes ERO. Aquest mateix estat també es produeix quan, si comptem amb els sistemes antioxidants en situació normal, la formació de radicals sigui menor a l'esperada.

Figura 9. Balança prooxidant-antioxidant



Balança prooxidant-antioxidant en situació d'equilibri (a dalt) i desequilibri a favor del dany oxidatiu (a baix).

Segons això, hi ha tres tipus de situacions del balanç oxidatiu:

- Estat d'**equilibri oxidatiu**: el sistema antioxidant de l'individu és capaç d'eliminar les ERO que produeix.
- Estat de **distress oxidatiu**: el sistema antioxidant de l'individu no pot eliminar les ERO totalment i es produeix dany oxidatiu.
- elimina les ERO en la seva totalitat i, a més, es podria protegir sense problemes d'un atac d'ERO encara més gran.

La situació, en termes d'oxidació, d'un individu en un moment determinat pot ser el reflex de l'estat de la malaltia que li ha estat diagnosticada, o pot indicar el risc de patir un dels molts trastorns que són producte d'un distrès oxidatiu. No obstant això, és molt difícil poder determinar l'estat de la balança prooxidant-antioxidant ja que hi ha una gran diversitat d'ERO i, de la mateixa manera, els tipus i ubicacions dels antioxidants que es coneixen també és molt variat i, a més, les ERO i els antioxidants es comporten de maneres diferents dependent de l'estat fisiopatològic de l'individu. Per això, s'intenten trobar els biomarcadors que millor informen de l'estat del balanç oxidatiu (Dotan i col·l., 2004; Argüelles, 2004).

3.1. EL DANY OXIDATIU: LÍPIDS, PROTEÏNES I DNA

A continuació es detallen els mecanismes d'acció que utilitzen les espècies reactives de l'oxigen i els RLO per produir l'oxidació sobre els lípids de membrana, les proteïnes i el DNA.

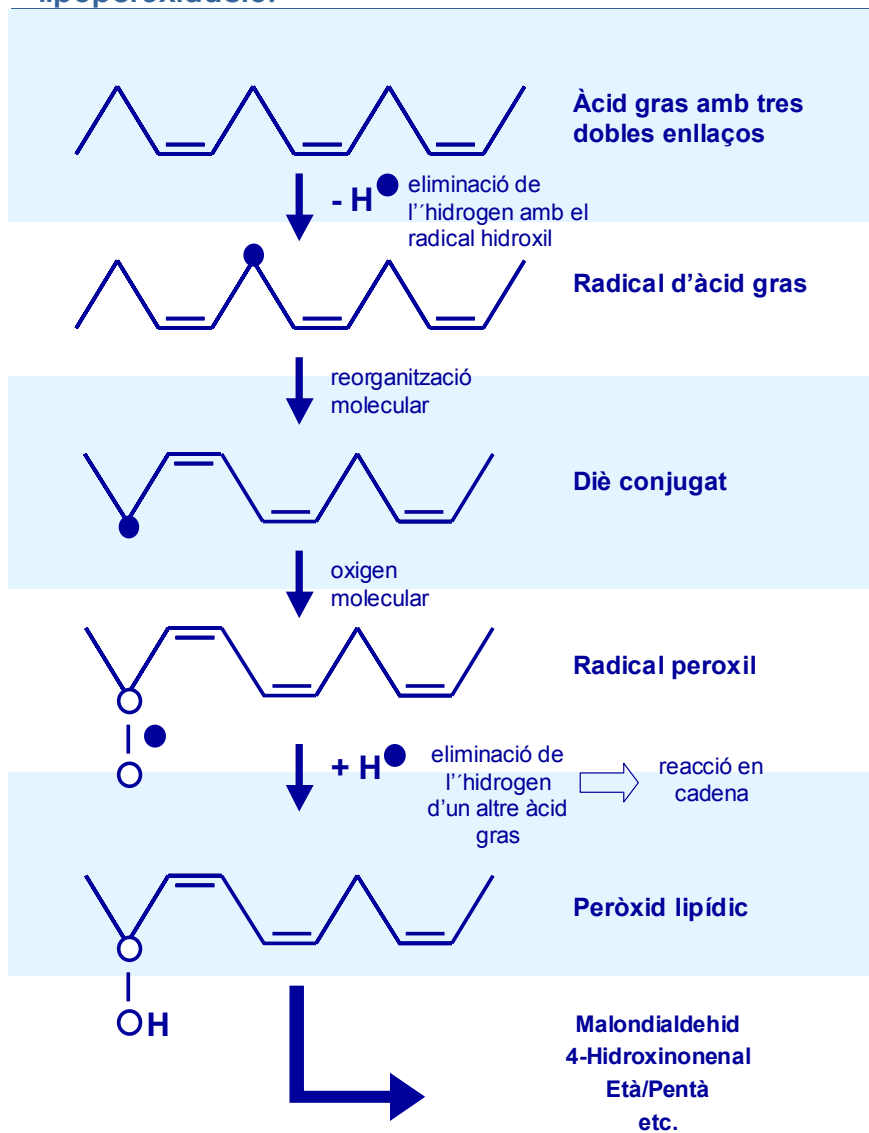
3.1.1. DANY OXIDATIU ALS LÍPIDS

La reacció d'eliminar un àtom d'hidrogen de les cadenes alquílques dels àcids grassos poliinsaturats (PUFA) s'anomena *peroxidació lipídica*, i genera la formació de radicals peroxil (ROO^{\bullet}), així com altres productes, d'entre els quals els aldehids, com el malondialdehid, i els hidrocarburs, com l'età i l'etilè.

La lipoperoxidació es produeix constantment. És un procés que es pot desenvolupar amb l'ajut d'enzims o també de forma espontània, com a resultat d'un encadenament de reaccions de tipus radicalari (figura 10).

Els radicals lliures ataquen sobretot a nivell dels dobles enllaços de les cadenes hidrofòbiques dels fosfolípids que formen part de l'estructura de les membranes biològiques. Així, els radicals eliminen un àtom d'hidrogen dels àcids grassos poliinsaturats o PUFA que formen la porció hidrofòbica dels fosfolípids de les membranes.

Figura 10. Seqüència de reaccions bàsiques en la lipoperoxidació.



Extret de Young i col.l., 2001

La *peroxidació lipídica* o *lipoperoxidació* és una reacció autocatalítica en què les espècies reactives de l'oxigen o radicals lliures sostrauen àtoms d'hidrogen a les molècules d'àcids grassos poliinsaturats. La reacció acaba quan dues molècules de peròxids xoquen entre si o quan reaccionen amb algun antioxidant disponible. El ferro pot tenir un paper catalitzador tant en la fase d'iniciació com en la de propagació.

3.1.2. DANY OXIDATIU A LES PROTEÏNES

Les proteïnes i els àcids nucleics sembla que són menys susceptibles que els lípids a l'atac dels radicals lliures. Si una proteïna es troba lligada a un metall de transició, els radicals lliures li poden provocar un dany amb més facilitat. (Marx i col·l., 1986; Stadtman i col·l., 1991).

Les proteïnes es danyen amb l'oxidació d'una zona del residu aminoàcid enganxat a un grup hidroxil, que altera l'estructura de la proteïna i la lesiona. La majoria d'aquestes proteïnes són eliminades ràpidament per enzims proteolítics presents a la cèl·lula. Els canvis en l'estructura de les proteïnes també poden ser causats per la producció d'errors en la seva síntesi, i l'origen dels errors pot ser-hi als radicals lliures. Aquesta nova estructura molecular alterada pot provocar la pèrdua de funcionalitat de la proteïna i iniciar una cadena d'alteracions en el funcionament del metabolisme cel·lular.

El grau d'afectació de la cèl·lula per l'atac dels radicals lliures a proteïnes pot ser molt ampli, així, si l'organisme no respon de manera adequada, i tenint en compte que les proteïnes regulen multitud de funcions, els radicals lliures poden catalitzar l'aparició de patologies greus o empitjorar l'estat d'un individu en determinades situacions (Anderson i col·l., 1999).

3.1.3. DANY OXIDATIU AL DNA

Els radicals lliures d'oxigen formats en llocs propers al DNA cel·lular l'ataquen ràpidament, tal com s'ha demostrat clarament en el cas de les radiacions. El DNA és, doncs, un lloc important i vulnerable a l'acció dels radicals lliures d'oxigen. Tot i així, com en el cas de les proteïnes, la possibilitat d'una reacció en cadena és molt menor que la que hi ha quan el blanc són els lípids de membrana. A més, perquè es produeixi una mutació en el material genètic caldrà que els radicals lliures d'oxigen actuïn sobre un lloc específic d'unió, i que el sistema de reparació del DNA, que es posa en funcionament durant la replicació, passi per alt la modificació que han provocat (Cheeseman i col·l., 1993).

Són sobretot els radicals lliures hidroxils ($\cdot\text{OH}$) els que ataquen qualsevol de les posicions del sucre desoxiribosa i els que provoquen trencaments d'una o de les dues cadenes del DNA. Els radicals hidroxils també desaminen nucleòtids i

desencadenen mutacions puntuals o canvis en els parells de bases, transicions i transversions.

En la mitocòndria, el dany al DNA provocat pels RLLO n'accelera la degradació. L'acumulació de mutacions en gens codificadors de transportadors d'electrons (NADH-deshidrogenasa, citocroms i coenzim Q) fa disminuir l'eficiència del transport, que, a la vegada, augmenta la producció de radicals lliures hidroxils.

4. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU

La mesura de l'estat oxidatiu en humans ha estat, com hem dit, motiu de preocupació durant molts anys; per això, actualment hi ha més de quaranta índexs per calcular aquest paràmetre. El nombre de mètodes que hi ha s'eleva a més de cent, ja que un índex pot ser mesurat per diferents mètodes, per exemple: la concentració de malondialdehid es pot mesurar pel mètode anomenat *TBARS* (substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric) però també es pot dur a terme mitjançant *HPLC* (cromatografia líquida d'alta pressió) (Dotan i col·l., 2004).

Les ERO són capaces de reaccionar amb gairebé qualsevol tipus de molècula orgànica, tant lípids, proteïnes com àcids nucleics. Aquest fet s'ha hagut de tenir en compte a l'hora de dissenyar els mètodes de valoració de l'estat oxidatiu dels individus.

Els radicals lliures són àtoms o molècules que tenen energia de fàcil alliberament; en entregar-la, provoquen reaccions químiques en cadena en les cèl·lules i teixits. Aquestes reaccions poden determinar un dany o alteració orgànica, a vegades irreversible, que es pot mesurar mitjançant múltiples mètodes.

4.1. BIOMARCADORS DE L'ESTAT OXIDATIU

En els últims anys s'ha intentat buscar un biomarcador de distrès oxidatiu universal, és a dir, que es pugui utilitzar en qualsevol context, que sigui comparable entre individus i informatiu del seu estat fisiopatològic. No obstant això, cada cop pren més força la creença que no és possible mesurar l'estat d'oxidació general si no es fa amb biomarcadors múltiples (Dotan i col·l., 2004; Abuja i col·l., 2001).

Dotan i col·l. van proposar el 2004 un criteri de classificació dels diferents biomarcadors de distrès oxidatiu en tres categories (figura 11):

- Mètodes basats en la mesura de les concentracions dels productes d'oxidació de lípids, proteïnes i DNA, així com les concentracions d'antioxidants (*productes del distrès oxidatiu*).
- Mètodes que valoren l'oxidabilitat de les estructures exposades a una font de radicals lliures (*susceptibilitat d'oxidació*).
- Mètodes per valorar la capacitat antioxidant dels líquids biològics (*capacitat antioxidant*).

A la figura 11 hi ha una representació dels biomarcadors més importants de cada una de les categories metodològiques que es detallen a continuació.

Figura 11. Principals biomarcadors del distrès oxidatiu

BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU	Productes de l'estrès oxidatiu	Promotors	Producció de RLLO ESR Luminol	
		Inhibidors	Antioxidants de baix pes molecular: Vitamina C i E Àcid Úric Carotens GSH	Enzims i macromolècules: SOD CAT GR GPx GST
		Productes de la peroxidació	Peroxidació lípids: MDA Diens conjugats	Peroxidació proteïnes: Proteïnes carbonilades
	Susceptibilitat d'oxidació	Resistència dels lípids: Hemòlisi		
Capacitat antioxidant	Radicals atrapats totals (TRAP) Capacitat antioxidant dels RLLO (ORAC)		Capacitat antioxidant relativa al trolox (TEAC) Poder reductor anioxidant del ferro (FRAP)	

Classificació dels principals biomarcadors del distrès oxidatiu, adaptat de Dotan i col l., 2004.

La valoració del distrès oxidatiu d'un individu podria ser, doncs, resultat de la quantitat de molècules que ha generat l'atac de radicals lliures, de la susceptibilitat dels components oxidables i de la capacitat del cos per fer front a l'oxidació radicalària. Segons Dotan, conèixer aquests tres paràmetres és indispensable per valorar correctament l'estat oxidatiu d'un individu.

4.1.1. PRODUCTES DEL DISTRÈS OXIDATIU

En el procés d'oxidació hi intervenen els radicals lliures (promotors), els antioxidants (inhibidors) i les molècules que es formen com a conseqüència de la peroxidació (productes de la peroxidació).

4.1.1.1. PROMOTORS

La determinació de la concentració dels agents oxidants (els anomenats *promotors*), com a mesura del distrès oxidatiu, és una tècnica directa. No obstant això, i tal com s'ha comentat anteriorment, la seva quantificació és molt complicada, ja que els radicals lliures tenen una vida mitjana molt curta. Per exemple, el radical hidroxil té una vida mitjana aproximada de 10^{-9} segons, que el fa gairebé indetectable en la majoria de tècniques més comunes. Això ha creat la necessitat de desenvolupar noves tècniques per detectar-lo o millorar les que ja hi ha (Murrant i col·l., 2001; Reiter i col·l., 2001; Halliwell i col·l.,

1989). Majoritàriament, són tècniques molt cares i poc disponibles en els laboratoris de recerca biomèdica (Cheng i col·l., 2003).

La complexitat i el cost de les tècniques que pretenen quantificar els radicals lliures fa que, per valorar els productes del distrès oxidatiu, en la majoria de treballs s'utilitzin altres biomarcadors (inhibidors de l'oxidació o productes de la peroxidació) més senzills de quantificar i que també aporten informació sobre l'estat oxidatiu de l'individu.

4.1.1.2. INHIBIDORS

Els inhibidors de l'oxidació o antioxidants protegeixen l'individu i li eviten el distrès oxidatiu. Com ja s'ha comentat, hi ha dos tipus de molècules que realitzen aquesta funció: els antioxidants de baix pes molecular i les macromolècules.

4.1.1.2.1. ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR

Dins d'aquest grup trobem gran quantitat de molècules, les que s'utilitzen més comunament com a biomarcadors es mostren a la figura 14.

El *glutatió (GSH)* és una de les molècules antioxidants més importants i el biomarcador, d'aquesta categoria, que s'ha utilitzat en aquest treball.

El *GSH* és un tripèptid d'àcid glutàmic, cisteïna i glicina, sintetitzat majoritàriament al fetge. Es una de les molècules petites més abundants a la natura. La majoria de les seves funcions biològiques depenen del grup tiol del residu de cisteïna (Chasseaud, 1979).

Gairebé tots els teixits en tenen, encara que no necessàriament en totes les seves cèl·lules. Per exemple, n'hi ha al cervell però no a l'estroma neuronal, que ha de tenir alternatives per a la defensa antioxidant.

Com ja hem dit, el glutatió reduït es manté en un cicle redox amb el GSSG (glutatió oxidat) dins el mitocondri i és regenerat per la glutatió-reductasa (GR), un enzim citosòlic NADPH-dependent. En els eritròcits, que no tenen mitocondris, les alteracions en el metabolisme de la glucosa per la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa afectaran la disponibilitat d'NADPH i, per tant, es limitarà l'activitat reductasa.

Quan augmenta el distrès oxidatiu, la capacitat del sistema GSH-peroxidasa/GSH-reductasa pot ser superada i produir-se un cúmul intracel·lular de GSSG. Per mantenir l'estat redox de la cèl·lula, el GSSG és transportat activament fora. Així doncs, el nivell de GSSG plasmàtic pot ser considerat un bon índex del distrès oxidatiu intracel·lular (Deleve i col·l., 1990).

El glutatió té funcions com a reductor intracel·lular i juga un important paper en la catàlisi, el metabolisme i el transport cel·lular. Així, protegeix les cèl·lules

davant radicals lliures, espècies reactives de l'oxigen i compostos tòxics d'origen endogen i exogen. És, per tant, a més d'una bona defensa davant de xenobiòtics electrofíllics i oxidants intracel·lulars, un regulador del potencial redox cel·lular.

En la bibliografia es reflecteix la importància de valorar, no només el glutatió reduït, sinó també el glutatió oxidat, per tal d'establir la ràtio entre les dues molècules, que ens informa sobre el nivell d'oxidació en sang o en el teixit estudiat. La ràtio entre el glutatió oxidat i el reduït ens dóna una idea més clara de l'estat d'aquest sistema de detoxificació. Així, la biodisponibilitat de GSH és clau per evitar el distrès oxidatiu o, el que és el mateix, un valor màxim en el quocient GSH/GSSG ens ofereix més garanties de protecció davant dels RLLO.

Destaquem, doncs, dos punts clau en l'estudi del glutatió:

- En primer lloc, el GSH en sang elevat ha estat correlacionat, en humans, amb un bon estat de salut, i amb una vida mitjana llarga en ratolins. La qüestió és si en els individus malalts el glutatió decreix. Aquest fenomen s'ha pogut comprovar en diverses patologies cròniques com el càncer, que utilitza la ràtio GSSG/GSH per determinar l'estat de la malaltia i també com a marcador sistèmic de lesions canceroses, malalties genitourinàries, gastrointestinals, cardiovasculars i del múscul esquelètic. Algunes anèmies, com l'anèmia de Fanconi, es caracteritzen perquè són

deficients en la detoxificació de les ERO, cosa que implica una deficiència del sistema del glutatió, i comporta alteracions en el citoesquelet eritrocitari i, per tant, en la funcionalitat i integritat cel·lular. Un cop més, un paràmetre relacionat amb els radicals lliures, s'apunta com a bon indicador de la severitat i l'estat patològic de l'individu (Lang, 2000).

- En segon lloc, el glutatió reduït és l'antioxidant més potent del medi intracel·lular. La ràtio GSSG/GSH serveix com a marcador de la capacitat antioxidativa cel·lular. La concentració d'aquesta molècula es pot incrementar amb l'administració de GSH, èsters de glutatió o precursors de GSH com la glutamina o la cisteïna. És a dir, es pot modular terapèuticament el metabolisme del glutatió per millorar la simptomatologia de moltes patologies (Exner i col·l., 2000).

Altres molècules antioxidants de baix pes molecular són: la *vitamina E* (Fulbert i col·l., 1992), la *vitamina C* (McArdle i col·l., 2002) i l'*àcid úric* (Becker, 1993).

4.1.1.2.2. ENZIMS I MACROMOLÈCULES

Els enzims superòxid-dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatió-peroxidasa (GPx), glutatió-reductasa (GR) i glutatió S-transferasa (GST) són els principals inhibidors de l'oxidació. Tots s'utilitzen com a biomarcadors del dany oxidatiu

en aquest treball, ja que actuen a diferents nivells dins la xarxa de detoxificació de tipus radicalari.

La família de les *superòxid-dismutases (SOD)* està formada per quatre metaloformes: dues contenen coure i zinc, una conté manganès i l'altra ferro.

Aquest enzim catalitzador de la transformació del radical superòxid en peròxid d'hidrogen ha estat valorat en l'estudi de diverses patologies i la utilització com a biomarcador de distrès oxidatiu està molt estesa.

El deteriorament de la defensa antioxidant pot contribuir a la mort neuronal, la qual cosa significa que els radicals lliures són una causa important de les malalties neurodegeneratives i de les malalties relacionades amb el sistema nerviós. Exemples que s'estudien actualment són l'Alzheimer, la malaltia de Kennedy (desordres de les neurones motores), el Parkinson, el traumatisme cranial, l'esquizofrènia, la isquèmia cerebral aguda i l'envelliment en general (Facchinetti i col·l., 1998).

La superòxid-dismutasa coure-zinc (CuZn SOD) també ha estat estudiada i valorada com a indicador de distrès oxidatiu en el càncer, la inflamació intestinal, la malaltia de Crohn (inflamació crònica de la mucosa gastrointestinal), la malaltia de Graves (tirotoxicosi), la cirrosi i la pancreatitis, la malaltia vascular arterioscleròtica, la malaltia coronària arterial i la menopausa, l'artritis reumatoide, el risc de malaltia cardiovascular associada

amb altres patologies com la síndrome d'ovaris poliquístics o la diabetis, la malaltia de Blackfoot (trombosi vascular, només present en una zona de Taiwan), la miocarditis aguda viral, la malaltia de Lyme (associada a eritema), l'acne, les afectacions de la còrnia i les malalties mitocondrials entre d'altres (Bednarek i col·l., 2005; Hseu i col·l., 2001).

En alguns d'aquests estudis, com en el cas de la malaltia de Graves, es fa referència a la importància de poder utilitzar la determinació de l'estat de distrès oxidatiu del pacient com a mesura de la gravetat de la malaltia i també d'utilitzar els antioxidants per millorar les manifestacions clíniques de la patologia (Bela i col·l., 2001; Guerra i col·l., 2001).

La *glutatió-peroxidasa (GPx)* és un enzim selenodependent format per quatre subunitats idèntiques que porten cada una, en el lloc actiu, un àtom de seleni sota la forma de selenocisteïna, és a dir, una cisteïna en la qual l'àtom de sofre és reemplaçat per un àtom de seleni.

Amb la intervenció del glutatió reduït (GSH), catalitza la reducció de l'aigua oxigenada i dels hidroperòxids.

La seva eficàcia va molt lligada a la de la glutatió-reductasa, la qual necessita per a la seva acció el NADPH, que li és subministrat gràcies a la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH).

La GPx destrueix el H_2O_2 , i, de manera general, de tots els hidroperòxids orgànics.

És molt activa en hepatòcits i eritròcits, on la catalasa no intervé si la concentració del peròxid no és gaire elevada. La GPx també participa en la

reparació de membranes, perquè permet el reciclatge dels fosfolípids per àcids grassos no peroxidats (De Paulet, 1990; Pré, 1991).

La *catalasa* (CAT) intervé en l'eliminació del peròxid d'hidrogen com a segona línia de defensa. Només és present als peroxisomes i, com hem dit anteriorment, té una afinitat menor que la GPx per als hidroperòxids (Fulbert i col·l., 1992; Pré, 1991).

La diferència radica en el fet que la catalasa usa el H_2O_2 com a substrat i també com a acceptor d'hidrogen, en canvi, la GPx necessita un acceptor addicional.

És un enzim homotetramèric, té un pes molecular de 240.000 daltons, i està constituït per quatre grups prostètics hemínics, en el si dels quals el ferro està sempre sota la forma fèrrica (Pré, 1991).

La relació de la CAT amb patologia va lligada a una reducció de la reserva antioxidant enzimàtica, és a dir, a un nivell de distrès oxidatiu elevat.

Les *glutatió S-transferases* (GST) són una família de proteïnes multifuncionals, catalítiques i fixadores, àmpliament distribuïdes, que tenen un paper fisiològic important en la detoxificació, ja que catalitzen la conjugació del grup tiol [-SH] del GSH amb el centre electrofílic d'un gran nombre de molècules hidrofòbiques endògenes i exògenes. Així s'originen els tioèters conjugats, que constitueixen el primer pas en la biosíntesi dels àcids mercapturs, que

s'eliminaran per l'orina, la qual és un important camí d'eliminació de citotòxics potencials o compostos mutagènics de l'organisme.

El descobriment de multitud d'isoenzims amb diverses especificitats per als substrats i la diversitat de funcions de la GST ha creat un gran interès per estudiar-los. A més, s'ha demostrat l'existència d'expressions alterades en les isoformes de la GST en determinades situacions patològiques. Els isoenzims humans són els α , μ , π i θ .

La GST està lligada a la detoxificació de carcinògens, així com de molts altres tòxics, és per això que molts estudis realitzats en càncer utilitzen aquest enzim com a marcador de distrès oxidatiu (Giralt i col·l., 1996; Nogués i col·l., 2002).

La gran heterogeneïtat de la molècula i la seva importància detoxificadora fa que molts articles publicats relacionin patologia amb variacions o mutacions de l'enzim. En són alguns exemples: artritis reumatoide, anèmia aplàstica, endometriosis, arteriosclerosi, leucèmia limfoblàstica i mieloide, esclerosi, pancreatitis, malaltia hipotalàmicapituitària, β -talassèmia, malalties del cor i també disfuncions renals (Spurdle i col·l., 2001).

4.1.1.3. PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ

Les ERO poden oxidar lípids, proteïnes i DNA, és per això que hi ha biomarcadors diferents segons el lloc diana de l'oxidació.

- Entre els indicadors de les alteracions dels *lípid*s de membrana destaquen les substàncies reactives a l'àcid barbitúric (TBARS), entre les quals hi ha el malondialdehid, el 4-OH-nonenal, els diens conjugats i els hidroperòxids (Pré, 1991).
- Els metabòlits anormals dels àcids nucleics, especialment la 8-OH-desoxiguanosina i la 8-OH-guanosina (derivades del DNA i RNA, respectivament) són biomarcadors del dany oxidatiu (Cathcart i col·l., 1984).
- Algunes formes d'ERO ataquen també a les *proteïnes*, i donen origen a derivats carbonil (Stadtman, 2001). Les proteïnes carbonilades són biomarcadors del dany oxidatiu.

4.1.1.3.1. PEROXIDACIÓ DE LÍPIDS

L'oxidació de les lipoproteïnes implica la peroxidació dels seus PUFA i la producció de molts productes, per exemple els *diens conjugats*. Els diens conjugats apareixen en el primer estadi de l'oxidació dels lípids, en la qual es produeix una reestructuració dels dobles enllaços dels àcids grassos (Esterbauer i col·l., 1989). La susceptibilitat a oxidació dels lípids es pot mesurar, doncs, induint la formació de diens conjugats amb ions de coure.

La mesura dels productes de degradació d'hidroperòxids lipídics com alcans i aldehids, entre els quals es troba el *malondialdehid (MDA)*, és un altre dels

procediments per conèixer el grau de peroxidació lipídica en sistemes biològics. Per la seva simplicitat i sensibilitat, un dels tests més utilitzats és l'anomenat TBARS (de l'anglès *thiobarbituric acid reactive substances*).

Els biomarcadors de lipoperoxidació s'han utilitzat en la mesura del grau de distrès oxidatiu en individus amb malaltia cardiovascular, en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer o el Parkinson, en la insuficiència renal, en la malaltia pulmonar obstructiva crònica, etc., i en altres situacions no patològiques com l'embaràs, l'envelliment o l'obesitat.

4.1.1.3.2. PEROXIDACIÓ DE PROTEÏNES

La introducció de *grups carbonils* en els residus aminoacídics de les proteïnes provocada per radicals lliures és un indicador de la modificació oxidativa. La reacció d'aquests grups amb agents carbonilats proporciona un mètode per detectar i quantificar l'oxidació de proteïnes catalitzada per metalls. Aquesta reacció altera la capacitat funcional de les proteïnes afectades i la seva determinació espectrofotomètrica, mitjançant la unió de les proteïnes danyades a dinitrofenilhidrazina forma part de les tècniques d'avaluació del dany oxidatiu.

Les patologies més importants que s'han relacionat amb la peroxidació de lípids i de proteïnes es mostren a la figura 12.







4.1.1.3.3. PEROXIDACIÓ DEL DNA

La determinació de derivats hidroxilats de guanosina i de desoxiguanosina ha estat descrit per valorar de manera indirecta el grau d'afectació dels àcids nucleics quan han estat en contacte amb les ERO. Hi ha diversos treballs que demostren un augment dels valors de 8-OH-desoxiguanosina, procedent del DNA mitocondrial, en subjectes sotmesos a esforços intensos i en pacients afectats amb malalties musculars degeneratives (Okamura i col·l., 1997). Aquests indicadors poden valorar-se mitjançant tècniques d'HPLC, però recentment s'han comercialitzat anticossos capaços de reaccionar amb tots dos derivats de la guanosina, que poden aplicar-se a tècniques d'ELISA i d'immunohistoquímica. No obstant això, els resultats d'aquests mètodes han estat posats en dubte per alguns autors que afirmen que els valors obtinguts són, en la seva majoria, fruit dels artefactes de la tècnica.

La fragmentació del DNA també es pot valorar directament mitjançant tècniques com ara la tècnica cometa (de l'anglès *comet assay*) o el TUNEL (de l'anglès *terminal uridine nick end-labeling assay*). El problema és que aquests mètodes avaluen el dany al DNA en general i no només aquell que ha estat ocasionat pels RLLO (Dotan i col·l., 2004).

Per avaluar l'estat del balanç prooxidant-antioxidant d'un individu s'han de tenir en compte biomarcadors que ens informin d'aquesta situació a tots els nivells: valorar quantes ERO s'estan formant, quins mecanismes estan a punt per eliminar-les i quines són les conseqüències de l'oxidació que no s'han pogut evitar.

Figura 12. Malalties i situacions fisiopatològiques en les quals s'ha determinat l'existència de distrès oxidatiu amb biomarcadors de peroxidació

	LIOPEROXIDACIÓ	PEROXIDACIÓ DE PROTEÏNES
 MALALTIES CARDIOVASCULARS	Arteriosclerosi, Isquèmia-Reperfusió, Malaltia de l'artèria coronària, Fallida cardíaca, Malaltia renovascular, Hipercolesterolèmia, Diabetis, Hiperhomocisteïnèmia, gènere masculí i fumar	Isquèmia-Reperfusió, Diabetis
 MALALTIES NEUROLÒGIQUES	Alzheimer, Huntington, Esclerosi múltiple, Malaltia de Creutzfeld-Jacob	Alzheimer, Esclerosi lateral amiotròfica, Demència amb cossos de Lewy, Parkinson
 MALALTIES PULMONARS	Asma, MPOC, Fibrosi quística, Malaltia intersticial pulmonar, Dany pulmonar agut o Síndrome del distrès respiratori agut	Síndrome del distrès respiratori agut, MPOC, Displàsia broncopulmonar, Fibrosi quística
 MALALTIES RENALS	Hemodiàlisi, Dany renal induït per rabdomiòlisi	Insuficiència renal crònica, urèmia crònica
 MALALTIES HEPÀTIQUES	Dany hepàtic per alcoholisme crònic, Síndrome hepatorenal, Cirrosi urinària biliar, Trasplantament de fetge	
 ALTRES MALALTIES	Esclerodèrma, Síndrome de Down, Malaltia de Crohn, Osteoporosi	Caracterogènesi, Preeclàmpsia, Psoriasis, Artritis reumatoide i Artritis crònica juvenil, Sèpsia severa, Amiloïdosi sistèmica, Varicel·la

Adaptat de Dalle-Done i col·l., 2003 i Montuschi i col·l., 2004.

4.1.2. SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ

Les ERO són responsables de l'alteració de la membrana cel·lular quan és exposada a un distrès oxidatiu. Aquest dany pot contribuir a potenciar l'aparició i progrés de determinades malalties degeneratives com ara el càncer o malalties cardiovasculars. L'efecte de les ERO sobre els eritròcits humans s'ha utilitzat com a biomarcador de la susceptibilitat d'oxidació, a causa de la relativa facilitat per obtenir aquesta mostra. Els eritròcits són vulnerables a la peroxidació lipídica ja que contenen molts PUFA, metalls de transició i transporten oxigen. L'eritròcit té molts sistemes per a protegir-se del dany de les ERO i de l'hemòlisi: els enzims SOD, CAT i GPx, l'àcid ascòrbic i l'àcid úric, l' α -tocoferol, etc. Si no són eliminades, l'agressió de les ERO dona com a resultat l'escapada de potassi al medi extracel·lular i una consegüent hemòlisi (Bureau i col·l., 2005). Quan s'utilitza l'hemòlisi com a biomarcador de l'estat oxidatiu de l'individu, els eritròcits es posen en contacte amb un oxidant, com ara el 2,2'-azobis(2-amidinopropà)hidroclorid (AAPH), o amb una espècie reactiva d'oxigen, com el peròxid d'hidrogen, i es valora l'hemòlisi produïda com a conseqüència d'aquesta oxidació induïda.

Les deficiències en els sistemes antioxidants, l'atac intensiu de les ERO, algunes malalties com la β -talassèmia, l'anèmia hemolítica, la deficiència en G6PDH i altres motius poden incrementar la susceptibilitat de l'eritròcit a la peroxidació (Zhu i col·l., 2002).

4.1.3. CAPACITAT ANTIOXIDANT

La capacitat antioxidant total d'una mostra per eliminar radicals lliures s'utilitza cada cop més per valorar, de manera més general, l'estat oxidatiu de l'individu (Widlansky i col·l., 2005). Molts d'aquests mètodes han estat dissenyats inicialment per valorar la capacitat antioxidant de productes alimentaris. No obstant això, hi ha estudis que valoren la capacitat antioxidant tant de mostres biològiques, per exemple del plasma, com de mostres d'aliments, especialment fruites, verdures i fruites seques (Prior i col·l., 2003). La majoria de treballs, en animals o humans, valoren la capacitat antioxidant de mostres biològiques després d'haver administrat un aliment antioxidant (Cao i col·l., 1998; Proteggente i col·l., 2002).

Taula 22. Característiques principals dels biomarcadors de capacitat antioxidant

ORAC	TRAP	TEAC	FRAP
<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>	<i>Total radical trapping antioxidant parameter</i>	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>	<i>Ferric iron reducing antioxidant parameter</i>
Reacció amb transferència d'àtoms d'H	Reacció amb transferència d'àtoms d'H	Reacció amb transferència d'electrons	Reacció amb transferència d'electrons
Formació de radicals peroxil amb AAPH	Formació de radicals peroxil amb AAPH	Oxidació dels antioxidants amb ABTS	Oxidació dels antioxidants amb Fe (III)
Cao <i>Methods Enzymol</i> 1998	Miller <i>Clin Sci</i> 1993	Rice i Evans <i>Methods Enzymol</i> 1994	Benzie i Strain <i>Anal Biochem</i> 1996

4.2. EL DISTRÈS OXIDATIU EN DIFERENTS SITUACIONS

Les conseqüències negatives de l'efecte de les ERO en l'organisme humà ha fet que aquests sistemes i tots els mecanismes que hi estan relacionats siguin àmpliament estudiats, no tan sols en el context de la malaltia sinó també en situacions fisiològiques diferents, com, per exemple, l'envelliment o l'embaràs, que no tenen perquè relacionar-se amb cap patologia. Utilitzar els coneixements que es van acumulant per millorar la clínica dels individus afectats és l'objectiu final de tots aquests; no obstant això, els sistemes implicats en el distrès oxidatiu són diferents en cada una de les situacions que s'estudien i cal establir criteris d'actuació diferenciats en cada cas.

4.2.1. DISTRÈS OXIDATIU EN SITUACIONS PATOLÒGIQUES

Les espècies reactives de l'oxigen i els radicals lliures d'oxigen són causa i conseqüència de moltes patologies. Tal com ja s'ha comentat, el càncer, l'arteriosclerosi, les malalties neurodegeneratives han estat relacionades sense cap mena de dubte amb el dany radicalari. I també la insuficiència renal, la malaltia pulmonar obstructiva crònica, la sèpsia i l'infart agut de miocardi.

4.2.2. DISTRÈS OXIDATIU EN SITUACIONS FISIOLÒGIQUES

Les cèl·lules aeròbiques generen RLLLO constantment i el dany que produeixen és detectable no només en situacions de patologia, sinó també en individus sans i joves. Així, quan l'eficiència dels sistemes antioxidants per eliminar els radicals no és del 100%, els individus pateixen, en certa mesura, distrès oxidatiu. L'envelliment, diferències a nivell de gènere, l'embaràs i l'estrès psicològic, s'han relacionat amb variacions en l'estat oxidatiu.

Els radicals lliures i les espècies reactives de l'oxigen tenen un paper important en moltes malalties. En aquest sentit, es desconeix si són causa o conseqüència de la situació patològica i també caldria aclarir, en molts dels casos, quin nivell del sistema prooxidant-antioxidant està afectat.

5. RELACIÓ ENTRE LLC I RADICALS LLIURES

5.1. CARCINOGENÈSI DELS RLO EN LES SLPC

La resposta inflamatòria crònica, s'ha associat amb el risc de patir limfoma no hodgkinà (LNH). Encara que els mecanismes no són del tot ben coneguts, se sap que la inflamació crònica s'associa amb increment del distrès oxidatiu causat per la generació d'ERO, i amb una disminució de l'activitat antioxidant, com s'ha vist en diferents hemopaties com la leucèmia aguda limfoblàstica (Mazor i col·l., 2008).

El dany oxidatiu sobre el DNA pot portar a terme a la neoplàsia i, a la vegada, les ERO poden propagar les citoquines proinflamatòries, que poden estimular limfòcits B per produir anticossos que inicien senyals d'activació limfocitària.

La desregulació entre els mecanismes antioxidants poden influenciar la sensibilitat cel·lular al dany per RLO i alterar la sensibilitat a emmalaltir. Aquest fet té especial importància en els limfòcits i els seus precursors, en els quals la inflamació crònica incrementa el risc de canvis neoplàsics, com ja s'ha vist establert en alguns LNH associats a estat d'inflamació crònica.

Tant l'augment de la SOD com la disminució de l'activitat de GPx, s'han associat amb trastorns limfoproliferatius.

S'han investigat associacions entre el distrès oxidatiu i el càncer, a través de la mesura del dany sobre el DNA causat pels radicals lliures i el nivell d'antioxidants. També, una gran àrea de recerca en el camp de la relació entre el distrès oxidatiu i la susceptibilitat a la malaltia pot ser l'estudi dels polimorfismes en els gens que controlen els nivells del dany cel·lular oxidatiu. Vies candidates a estudi són les dels mecanismes de l'antioxidació i de la reparació del DNA, les quals estan condicionades a variacions genètiques individuals. Així, polimorfismes que afectin la capacitat antioxidant poden influenciar en el risc d'LNH per incrementar els nivells de citoquines pro inflammatòries que comporten l'activació de cèl·lules B (Lightfoot i col·l., 2006).

Una estratègia lògica per al desenvolupament de tractaments antineoplàsics altament selectius és explorar la via de les diferències biològiques entre les cèl·lules normals i les canceroses. Estudis previs suggereixen que moltes cèl·lules canceroses exhibeixen increment en la producció d'espècies reactives de l'oxigen associat a transformació oncogènica i disfunció mitocondrial (Trachootham i col·l., 2008).

5.2. NIVELL DE DISTRÈS OXIDATIU I LLC

S'han realitzat diferents treballs en els quals es mesura el nivell de determinats RLL, així com d'enzims antioxidants en el context de pacients afectats d'LLC i que han rebut tractament per aquesta malaltia o no.

En comparar-se amb els limfòcits normals, s'ha vist en estudis previs que les cèl·lules d'LLC mostren increment substancial en els nivells de distrès oxidatiu amb dany sobre el DNA i mutacions sobre el DNA mitocondrial, especialment en pacients que han rebut tractaments previs. Múltiples mecanismes, incloent la disfunció mitocondrial i el distrès metabòlic, contribueixen al distrès oxidatiu en l'LLC (Trachootham i col·l., 2008).

Els malalts que han rebut algun tipus de quimioteràpia prèvia exhibeixen nivells més alts de $O_2^{\bullet-}$ que els pacients que no han rebut tractament. Les mutacions induïdes per fàrmacs poden ser la causa d'aquest increment (ciclofosfamida i fludarabina, dos dels fàrmacs més usats en LLC, interaccionen amb l'àcid desoxiribonucleic (DNA) incorporant-se o alquilant-lo, i són capaces de causar mutació al DNA) ja que el DNA mitocondrial (mDNA) és particularment vulnerable a dany per falta de la protecció per histones, té una dèbil capacitat de reparació i és el més susceptible a aquest dany. Aquest fet pot generar alteracions en la síntesi d'elements antioxidants.

De manera conjunta, les mutacions d'mDNA sembla que estan associades a un increment en la generació d'RLLO:

- Els malalts refractaris a agents terapèutics convencionals tendeixen a tenir major rang de mutacions que els pacients que responen al tractament.
- La quimioteràpia amb agents que ocasionen dany en el DNA, causa mutacions en l'mDNA de les cèl·lules de l'LLC, i també un increment en la generació d'RLLO (Carew i col·l., 2003).

L'ús d'agents exògens, com per exemple 2-metoxiestradiol (2-ME), que incrementen les espècies reactives de l'oxigen (ROS) causen dany cel·lular a través de l'augment de superòxid intracel·lular per inhibició de la SOD. Aquest fet incapacita la cèl·lula per eliminar el superòxid i li ocasiona dany. Així, s'investiga l'estratègia de tractar les cèl·lules leucèmiques a través de l'apoptosi mitjançada per RLLO, que es creu que seria més eficaç en aquells on hi ha un increment de nivells endògens de ROS. Una forma de fer-ho podria ser per mitjà de la combinació d'inhibidors de la SOD i agents productors d'RLLO, com el triòxid d'arsènic (Zhou i col·l., 2003).

L'activitat d'enzims antioxidants, principalment intracel·lulars, té un paper primordial en la carcinogènesi. Així, hi ha alguns exemples en què es veu un augment d'enzims antioxidants en diferents neoplàsies, i es creu que és un mecanisme compensatori a l'elevació del distrès oxidatiu en aquest tipus de

malalties. Més concretament, en l'LLC, a mode d'exemple, s'ha vist que la ceruloplasmina (Cp), que contribueix a la defensa antioxidant amb augment de la seva concentració en diferents carcinomes, també augmenta la seva activitat oxidativa i la seva concentració en pacients amb LLC (Gundogdu i col·l., 2007).

5.3. TERÀPIA D'LLC I DISTRÈS OXIDATIU

La capacitat d'RLL per a causar dany cel·lular, i així la mort de la cèl·lula, suggereix la possibilitat d'exportar aquesta capacitat per destruir cèl·lules leucèmiques a través de mecanismes mediatos per RLL.

S'ha vist que en l'LLC hi ha una activitat glutatió-peroxidasa més alta que en limfòcits normals i que el contingut de GSH es troba extremadament disminuït. Aquest fet pot ocasionar probablement resistència a fàrmacs per al tractament de la malaltia (Carlucci i col·l., 2009).

Encara que el distrès oxidatiu en cèl·lules canceroses es veu, generalment, com un efecte advers pel seu rol en la promoció d'instabilitat genòmica i proliferació cel·lular, els nivells elevats de radicals lliures també poden induir la mort cel·lular, fet que busca assolir qualsevol tractament citostàtic. Aquest fet és conegut, per exemple, en l'acció terapèutica de bendamustina, on la seva acció citotòxica és mediada per la generació de ROS i el desencadenament d'apoptosi (Roué i col·l., 2008).

Aquesta capacitat terapèutica és de gran importància ja que la majoria de cèl·lules neoplàsiques són metabòlicament actives en la producció d'RLL i es troben intrínsecament sota l'acció de distrès oxidatiu i, així, són més susceptibles al dany exogen induït per radicals lliures. És possible, també, explorar les alteracions en el sistema redox en les cèl·lules d'LLC com a base

de tractament de les cèl·lules tumorals, incloent les resistents a les teràpies convencionals (Trachootham i col·l., 2008).

Un gran nombre d'estudis recents suggereixen que diverses estirps cel·lulars neoplàsiques generen gran quantitat d'RLL en comparació amb cèl·lules normals no neoplàsiques, i estan sota un OS incrementat.

Estudis previs han demostrat que els limfòcits B són més sensibles al distrès oxidatiu que els limfòcits T i, que les cèl·lules de l'LLC B són més sensibles al distrès oxidatiu que els limfòcits normals. Així, s'ha vist que les cèl·lules d'LLC tenen un increment significatiu en els nivells basals d'RLL i tenen disminució en el glutatió cel·lular. Aquestes observacions donen suport a la idea de desenvolupar agents que incrementin el distrès oxidatiu com a teràpia selectiva per a l'LLC:

- Adafostina

L'adafostina és una tirofostina i és de la família dels inhibidors de les tirosina-cinases.

Té la capacitat d'induir la mort cel·lular de cèl·lules neoplàsiques a través de l'elevació de les ERO o de l'alteració de la regulació del factor de creixement de l'endoteli vascular, fet que d'una banda fa que els mecanismes de defensa antioxidant de les cèl·lules tumorals es vegin superats, i de l'altra, es limiti l'aportació de nutrients a les

cèl·lules neoplàsiques per limitació de la seva irrigació vascular. Així, l'adafostina pot induir la mort cel·lular de cèl·lules Bcr/abl negatives incloent les cèl·lules de l'LLC. Aquest agent, en alguns treballs, ha estat associat a agents citostàtics, com la fludarabina, i s'ha analitzat com a teràpia en l'LLC.

Té una activitat similar en totes les varietats de categories de risc, incloent els casos amb factors d'alt risc (anormalitats cromosòmiques 11q- i 17p-; gens no mutats IgV_H), encara que els pacients amb estadis avançats de la malaltia poden ser més sensibles a aquest agent. Això és possible perquè malalts amb estadis avançats de la malaltia poden tenir nivells basals d'RLLO més elevats (Chandra i col·l., 2003; Shanafelt i col·l., 2005; Trachootham i col·l., 2008).

▫ 2-metoxiestradiol (2-ME)

L'augment dels nivells d'ROS que pot induir-se amb agents com el 2-ME per causar la inhibició de la SOD, ha demostrat certa eficàcia en l'LLC.

Com a conseqüència de la inhibició de la SOD s'ocasiona el cúmul del O₂^{•-} i, així, es creu que la generació endògena de O₂^{•-} (tòxic per a la membrana mitocondrial) és el factor crític de l'activitat antileucèmica del 2-ME, ja que l'apoptosi ocasionada és molt més

prominent en les cèl·lules leucèmiques que en els limfòcits sans, potser com a conseqüència d'un distrès oxidatiu intrínsec a les cèl·lules leucèmiques.

La sobreexpressió de SOD, protegeix les cèl·lules de l'efecte tòxic de 2-ME, mentre que la disminució de l'expressió de SOD augmenta la toxicitat cel·lular per 2-ME.

Per aconseguir l'efecte terapèutic de 2-ME es requereixen concentracions del fàrmac relativament altes. La combinació de 2-ME amb agents generadors d'RLLO augmenta la seva capacitat de causar mort cel·lular. Així, l'acció aïllada o combinada d'agents capaços d'augmentar el nivell de distrès oxidatiu (com el triòxid d'arsènic) poden jugar un paper potencial en el tractament de l'LLC (Zhou i col·l., 2003).

▫ β-feniletíl isotiocianat (PEITC)

L'exposició de les cèl·lules LLC a PEITC indueix a una severa depleció de glutatió, acumulació d'RLLO i oxidació de cardiolipina mitocondrial, fet que porta a terme una mort cel·lular massiva.

PEITC és efectiu també en l'eliminació de cèl·lules LLC resistents a fludarabina per mitjà de mecanisme redox amb baixa toxicitat per als limfòcits normals.

S'ha vist també que molècules petites amb activitat oxidant poden ser proposades com a tractament potencial per a l'LLC, partint de la selectivitat in vitro sobre limfòcits neoplàsics comparat amb limfòcits normals. No queda clar el mecanisme per a aquest fet, però s'ha vist implicació de diferents factors capaços de regular la resposta al distrès oxidatiu i que poden veure's elevats en pacients amb LLC (Bancos i col·l., 2009. Wu i col·l., 2010).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

Moltes situacions fisiològiques i patològiques com poden ser l'envelliment, l'embaràs, els processos inflamatoris o els trastorns renals, entre d'altres, s'han relacionat amb la producció d'espècies reactives de l'oxigen. Igualment, s'ha vist aquesta relació en diferents tipus de neoplàsies.

Dintre de la patologia tumoral, en les síndromes limfoproliferatives, pot haver-hi una desregulació entre els mecanismes antioxidants, fet que pot reflectir-se amb l'origen, el diagnòstic i el tractament de la malaltia en algun dels punts següents:

1. El desequilibri entre els mecanismes pro i antioxidants pot influenciar la sensibilitat cel·lular al dany per RLLO i alterar la susceptibilitat a emmalaltir. Aquest fet té especial importància en els limfòcits i els seus precursors, en els quals la inflamació crònica incrementa el risc de canvis neoplàsics i, així, la seva possible transformació a síndromes limfoproliferatives.
2. Un gran nombre d'estudis recents suggereixen que diverses estirps cel·lulars neoplàsiques, incloent-hi les limfocitàries, generen gran

quantitat d'RLLO en comparació amb cèl·lules normals no neoplàsiques i estan sota un distrès oxidatiu incrementat.

3. S'ha demostrat que cèl·lules neoplàsiques com les de l'LLC són més sensibles al distrès oxidatiu que els limfòcits normals, fet que dóna suport a la idea de desenvolupar agents que incrementin el distrès oxidatiu com a teràpia selectiva per a l'LLC.

La documentació bibliogràfica del nivell de distrès oxidatiu present en l'LLC és escassa, parcial i referida a paràmetres molt concrets i específics.

Atès que són molts els factors que intervenen en la generació de distrès oxidatiu, són molts els biomarcadors que ens poden donar informació sobre aquest procés. Però, com ja s'ha comentat, cal recordar que:

1. És molt difícil determinar directament les ERO per la curta semivida que tenen i perquè els mètodes dels quals es disposa per fer-ho no poden aplicar-se a situacions clíniques quotidianes.
2. Quan es generen ERO en major quantitat del normal i/o quan disminueixen les defenses anti-ERO es produeixen una sèrie d'alteracions moleculars que comporten un increment dels indicadors de dany molecular.

3. Atès que hi ha una interrelació entre alguns dels sistemes de defensa enzimàtics, i no enzimàtics i que aquests són capaços d'adaptar-se segons la quantitat d'ERO generades, és evident que un augment en la producció d'ERO determinarà canvis en aquests sistemes. Per tant, si valorem les concentracions d'alguns d'aquests factors defensius i les activitats dels enzims implicats en la defensa anti-ERO, es poden també valorar, indirectament, les situacions de distrès oxidatiu, però cap d'aquestes situacions, de manera individual, ens definirà en termes universals el distrès oxidatiu.

Els pacients en estadis inicials d'LLC són un grup de malalts heterogeni que poden evolucionar de manera que la seva malaltia es mantingui estable al llarg dels anys o que, per contra, poden evolucionar de manera ràpida i progressiva cap a estadis més avançats que requereixin tractament. En aquest sentit, la utilització de nous factors pronòstics podria identificar de manera precoç aquest segon subgrup de malalts. Actualment, s'estan intentant establir nous marcadors pronòstics que, juntament amb els identificats més recentment facilitin aquesta identificació.

En fases inicials de la malaltia, la presència d'un elevat distrès oxidatiu pot ser signe d'activitat de malaltia i, així, de mal pronòstic. En canvi, en fases avançades de la malaltia o en les que s'espera obtenir resposta al tractament administrat, una elevació en els marcadors de distrès oxidatiu podria indicar bona resposta de la malaltia al tractament.

S'haurà de trobar la relació de la malaltia en els dos sentits i valorar el pes de la balança respecte al seu pronòstic, tant si hi ha predomini de marcadors d'oxidació com si hi ha predomini dels sistemes antioxidants o si hi ha equilibri entre tots dos. A més, la valoració de cada marcador individual d'oxidació pot ser important de cara al seu ús com a diana terapèutica o com a capacitat pronòstica en l'LLC.

Davant d'aquests antecedents, la nostra hipòtesi de treball suposa que:

Pacients diagnosticats en estadis inicials d'LLC han de presentar desequilibri entre els mecanismes generadors d'espècies reactives de l'oxigen i els mecanismes de defensa antioxidant a favor dels primers, i, per tant, mostrar un major distrès oxidatiu que la població sana. Atès que s'ha demostrat que els malalts amb estadis inicials d'LLC són un grup de població heterogeni, la presència de diferències en els nivells de distrès oxidatiu podria ser marcador del dany cel·lular i, per tant, indicador d'agressivitat de la malaltia i ser marcador pronòstic negatiu.

OBJECTIUS

Primer objectiu:

Definir les variables demogràfiques i els diferents paràmetres pronòstics reconeguts per la malaltia, en una població diagnosticada d'LLC estadis A/0-1.

Segon objectiu:

Descriure en aquesta mateixa població, els valors corresponents als biomarcadors sistèmics següents: TBARS, GSH, GSSG, ràtio GSSG/GSH, SOD, CAT, GR i GPx i comparar-los amb una població control amb les mateixes característiques d'edat i sexe.

Tercer objectiu:

Establir el pes dels biomarcadors estudiats en un model de puntuació global (segons Romeu i col·l., 2002) que permeti valorar el grau de distrès oxidatiu en pacients en estadis inicials d'LLC i comparar-lo amb una població control.

Quart objectiu:

Valorar si hi ha diferències dels marcadors de distrès oxidatiu en la nostra població d'estudi en relació amb els diferents factors pronòstics analitzats, i també si hi han diferències segons la presència o absència dels marcadors pronòstics.

MATERIAL I MÈTODES

1. DESCRIPCIÓ DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI

1.1. PACIENTS AMB LLC

La població d'estudi es troba formada per pacients diagnosticats d'LLC que compleixen els criteris d'inclusió següents:

- Estar controlats al Servei d'Hematologia de l'Hospital de Tortosa Verge de la Cinta (HTVC), sense tenir en compte la data del diagnòstic.
- Estar classificats dintre dels estadis inicials d'LLC de Rai i Binet (estadis A/0-1) i per tant:
 - No tenir anèmia ($Hb > 10g/dL$).
 - No tenir plaquetopènia (plaquetes $> 100 \times 10^9/L$).
 - No tenir simptomatologia B (ni suors, ni febre $> 38 \text{ }^\circ\text{C}$, ni pèrdua de pes no explicada per altres causes), ni altra simptomatologia (p. ex. prujja).
 - No tenir grans masses ganglionars, ni megàlies palpables a l'abdomen.
- No tenir patologia crònica associada: diabetis, insuficiència renal, hepatopatia, altres neoplàsies.
- No haver rebut tractament per la seva LLC. Tampoc haver rebut tractament antidiabètic o antihipertensiu.
- No presentar signes de progressió de la malaltia al llarg de tot el seguiment clínic del pacient (p. ex. TDL > 12 mesos).

- No tenir hàbits tòxics (ni tabaquisme ni enolisme).
- Accedir a signar el consentiment informat per formar part de l'estudi i permetre la recollida i manipulació de les seves mostres sanguínies.

Aquest estudi ha estat aprovat pels comitès ètics de l'HTVC i de la Facultat de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili. Cada participant ha signat el consentiment informat. La documentació que informa el participant i l'aprovació dels comitès s'adjunta a l'apartat d'annexos.

Des de la consulta d'hematologia de l'HTVC es proposava als pacients candidats que complien els criteris d'inclusió, que participessin en l'estudi a mesura que acudien a la consulta per al seu control rutinari. Es recollien les dades analítiques corresponents a aquella visita i es realitzava l'extracció de sang per a la determinació dels paràmetres de distrès oxidatiu en el moment de signar el consentiment informat. Atès que tot es feia en el moment de la visita, el pacient podia no estar en dejú.

Els pacients candidats a l'estudi i els que, finalment, n'han format part es detallen en forma de diagrama de fluxe a la figura 18, dins l'apartat de resultats i discussió (Boutron i col.l., 2008).

En tot aquest grup (n = 37) s'obté la història clínica detallada per mitjà d'interrogatori directe o per revisió de l'historial mèdic, que s'ha utilitzat per conèixer els hàbits i antecedents que poden ser importants en l'estudi. La

història conté la identitat de l'individu, nom i cognoms, el sexe, l'edat, any de diagnòstic de l'LLC i mesos de seguiment de la seva malaltia, les patologies associades i la medicació actual.

Es van obtenir, de cada pacient, tant l'hemograma com la bioquímica general. En el nostre treball s'inclouen només les dades analítiques de més relleu i lligades a la patologia i, així, es determinen:

- Dades de l'hemograma de més importància de cara a l'estudi.
 - Hemoglobina (mesurada en g/dL), hematòcrit (%), xifra total de leucòcits ($\times 10^9/L$), xifra total de plaquetes ($\times 10^9/L$).
- Dades bioquímiques de més importància de cara a l'estudi.
 - Valors de creatinina (mesurada en mg/dL), glucosa (mg/dL), GOT i GPT (mg/dL).

Als malalts que acceptaven participar en l'estudi i signaven el consentiment informat, se'ls realitzava l'extracció sanguínia necessària per a la realització de la determinació analítica dels paràmetres de l'estudi. Aquesta extracció coincidia en el moment en què acudien a la consulta per al seu control rutinari i, per tant, com s'ha dit, no tots els pacients es trobaven en dejú en aquell moment.

A la taula següent es detallen els mètodes analítics que ens proporcionen aquestes variables:

Taula 23. Mètodes emprats en les diferents variables analítiques

BIOMARCADORS	RANG ANÀLISI	VALORS DE NORMALITAT	Principi del mètode	Tipus de reacció	ANALIZADOR	LLOC DE DETERMINACIÓ
Hemograma						
Hemoglobina	> 10g/dL	13,0-17,5 g/dL	Espectrofotometria		Beckman-Coulter LH Series 750®	Laboratori d'Hematologia HTVC
Hematòcrit	> 30%	36,0-51,0 %	Mesura indirecta a partir de l'hemoglobina i xifra total d'hematies		Beckman-Coulter LH Series 750®	Laboratori d'Hematologia HTVC
Leucòcits	Sense rang	4,3-11,0 x 10 ⁹ /L	Principi de l'impedància		Beckman-Coulter LH Series 750®	Laboratori d'Hematologia HTVC
Plaquetes	> 100 x 10 ⁹ /L	100-440 x 10 ⁹ /L	Principi de l'impedància		Beckman-Coulter LH Series 750®	Laboratori d'Hematologia HTVC
Bioquímica						
Creatinina	< 1,4 mg/dL	0,4-1,2 mg/dL	Mètode cinètic	Reacció amb picrat alcalí	Beckman-Coulter Unicel DXC 800®	Laboratori de Bioquímica HTVC
Glucosa	< 140 mg/dL	65-110 mg/dL	Mètode cinètic que utilitza l'electrode per oxigen de Beckmna Coulter®	Reacció de glucosa-oxidasa	Beckman-Coulter Unicel DXC 800®	Laboratori de Bioquímica HTVC
GOT	< 40 UI/L	5-37 UI/L	Mètode cinètic enzimàtic	Reacció amb L-aspartat i a-cetoglutarat a oxaloacetat i L-glutamat	Beckman-Coulter Unicel DXC 800®	Laboratori de Bioquímica HTVC
GPT	<40UI/L	5-40 UI/L	Mètode cinètic enzimàtic	Reacció amb L-alanina i a-cetoglutarat a piruvat i L-glutamat	Beckman-Coulter Unicel DXC 800®	Laboratori de Bioquímica HTVC

GOT: Aspartat-aminotransferasa; GPT: Alanin-aminotransferasa; HTVC: Hospital de Tortosa verge de la Cinta.

També es recullen en la població d'estudi els valors de diferents *factors pronòstics* reconeguts per l'LLC i que fan referència a la determinació de:

- TDL (superior a 12 mesos en tots els casos) i calculada per revisió de dades analítiques de la història clínica de cada malalt.
- Valors analítics: LDH (U/L) i B2M (mg/dL).
- Determinació de la puntuació diagnòstica per immunofenotip, CD38 i ZAP-70 per mitjà de citometria de fluxe (realitzada de rutina en l'estudi diagnòstic de l'LLC a l'Hospital de Bellvitge, centre de referència de l'HTVC). Els punts de tall de positivitat per aquests paràmetres foren els establerts a l'anomenat centre de referència.
- Realització del cariotip per citogenètica convencional i FISH amb sondes d'estudi d'LLC, realitzades de rutina en l'estudi diagnòstic de l'LLC a l'Hospital Trias i Pujol, centre de referència de l'HTVC.
- Determinació de la presència d'adenopaties i/o megàlies abdominals per TC toraco-abdomino-pèlvic. Es realitzà al Servei de Radiodiagnòstic de l'HTVC com a estudi de rutina al diagnòstic de l'LLC.
- Determinació de la morfologia limfocitària per estudi microscòpic de la sang perifèrica de cada pacient.

La taula 24 proporciona un resum dels mètodes analítics utilitzats per determinar aquestes variables.

La valoració del *distrès oxidatiu* en els estadis inicials de l'LLC s'ha realitzat amb les mostres de sang dels 37 malalts hematològics, els quals no van rebre tractament citostàtic de cap mena ni amb eritropoetina ni altres factors estimulants hematopoètics. Aquest grup estava format per 17 homes i 20 dones. La mitjana d'edat era de 73 anys \pm 7,38 amb un rang que comprenia des dels 54 als 89 anys.

La taula 25 proporciona un resum dels mètodes analítics utilitzats per determinar els biomarcadors de *distrès oxidatiu*. Més endavant es detalla la metodologia emprada.

Taula 24. Característiques principals de les tècniques utilitzades per determinar els factors pronòstics d'LLC

BIOMARCADORS	RANG ANÀLISI	VALORS DE NORMALITAT	PRINCIPI DEL MÈTODE	TIPUS DE REACCIÓ	ANALIZADOR	LLOC DE DETERMINACIÓ
Factor pronòstic						
TDL	Sense rang	Inferior a 12 mesos	Recompte de la xifra limfocitària en dues determinacions i mesura del temps, en mesos, en què un valor s'ha doblat respecte de l'anterior			Consulta d'Hematologia HTVC
LDH	< 500 UI/L	266-500 UI/L	Mètode cinètic enzimàtic	Reacció de L-Lactat i NAD a Piruvat a NADH+ H ⁺	Beckman-Coulter Unicel DXC 800®	Laboratori de Bioquímica HTVC
B2M	< 2,4 mg/L	1,1-2,4 mg/L	Immunoassaig turbidimètic	Nefelometria	Beckman-Coulter Image®	Laboratori de Bioquímica HTVC
Immunofenotip	Positivitat si > 20%		Citometria de fluxe			Laboratori d'Hematologia Hospital de Bellvitge
Cariotip a sang perifèrica			Cultiu de 24 hores de cèl·lules procedents de sang perifèrica. Estudi cromosòmi de bandes G	Citogenètica convencional		Laboratori d'Hematologia Hospital Trias i Pujol
Morfologia limfocitària			Inspecció per microscòpia òptica d'extensió de sang perifèrica tenyida amb May-Grünwald-Giemsa			Laboratori d'Hematologia HTVC

TDL: Temps de duplicació limfocitària; LDH: Lactat deshidrogenada; B2M: beta-2 microglobulina; HTVC: Hospital de Tortosa verge de la Cinta.

Taula 25. Característiques principals de les tècniques utilitzades per determinar el distrès oxidatiu

BIOMARCADORS	RANG ANÀLISI	PRINCIPI DEL MÈTODE	TIPUS DE REACCIÓ	ANALIZADOR	LLOC DE DETERMINACIÓ
Dany oxidatiu lípids					
TBARS	13-82 nM	Reacció fluorimètrica, susceptibilitat de la mostra a reaccionar enfront substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric	Punt final	Perkin Elmer LS50B	Laboratori Farmacologia FMCS-URV
Capacitat antioxidant					
ORAC		Reacció fluorimètrica, la capacitat antioxidant d'atrapar radicals peroxil induïts pel dihidroclorur de 2,2 azobis(2-amidinopropà)	Cinètica	Fluoroscan Ascent	Laboratori de Farmacologia FMCS-URV
Glutatió					
GSH GSSG	0,01-2 µM	Reacció fluorimètrica d'aquests compostos amb el o-phthalaldeid a pH 12 i 8, respectivament	Punt final	Perkin Elmer LS50B	Laboratori de Farmacologia FMCS-URV
Antioxidants enzimàtics					
SOD		Reacció espectrofotomètrica. Els superòxids formats oxiden l'epinefrina i formen l'adenocrom. La SOD evita la formació de l'adenocrom	Cinètica	Perkin Elmer Lambda 2	Laboratori de Farmacologia URV
GPx		Reacció espectrofotomètrica a 340 nm, el consum de NADPH a partir de la reducció del hidroperòxid de t-butil	Cinètica	Autoanalitzador Cobas Mira	Laboratori de Farmacologia URV
GR		Reacció espectrofotomètrica a 340 nm, el consum de NADPH a partir de la reducció del hidroperòxid de t-butil	Cinètica	Autoanalitzador Cobas Mira	Laboratori de Farmacologia URV
CAT		Reacció espectrofotomètrica, descomposició del H ₂ O ₂ en oxigen i aigua	Cinètica	Perkin Elmer Lambda 2	Laboratori de Farmacologia FMCS-URV

TBARS: substàncies reactives de l'àcid tiobarbitúric; ORAC: capacitat d'absorbir radicals lliures; GSH: glutatió reduït; GSSG: glutatió oxidat; SOD: superòxid-dismutasa; GPx: glutatió-peroxidasa; GR: glutatió-reductasa; CAT: catalasa (CAT).

1.2. CONTROLS SANS

Per dur a terme l'estudi del distrès oxidatiu s'ha utilitzat sang humana d'un total de 37 persones sanes (17 homes i 20 dones). Les mostres s'han obtingut del Servei d'Endocrinologia de l'Institut Universitari Dexeus i de voluntaris sans que van acudir a la Unitat de Farmacologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut (URV).

La mitjana d'edat va ser de 71,8 anys \pm 7,18. Els 37 participants en l'estudi no tenien cap patologia ni rebien cap medicació rellevant, per exemple antioxidants, en el moment de l'anàlisi de sang. L'administració d'antioxidants podria alterar els paràmetres relacionats amb el distrès oxidatiu que s'estudien en el nostre treball, ja que comporten una aportació extra de protecció davant els radicals lliures.

2. OBTENCIÓ, PREPARACIÓ I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES

Per a la determinació dels diferents paràmetres de distrès oxidatiu analitzats en el treball ha estat necessària l'extracció de 10 mL de sang en total de cada individu. L'extracció s'ha realitzat mitjançant punció venosa. El total de mostra s'ha repartit en dos tubs amb anticoagulants diferents (un amb heparina-liti i l'altre amb EDTA). Els biomarcadors analitzats són els següents: glutatió oxidat i reduït, i ràtio, tant en eritròcit com en plasma (GSSG/GSH), TBARS en eritròcit i plasma, catalasa, glutatió-peroxidasa, glutatió-reductasa i superòxid-dismutasa en eritròcit i ORAC en plasma. La metodologia, l'aliquotatge i l'anàlisi es detallen més endavant en aquest apartat de material i mètodes.

2.1. TUB D'HEPARINA-LITI

El plasma i els eritròcits es van separar centrifugant durant 15 minuts a 850 xg i a 4 °C. El plasma sobrenedant es va extreure tenint en compte de no aspirar la fina capa de leucòcits que la separa dels eritròcits. Els leucòcits es van descartar. Els eritròcits es van rentar dues vegades amb sèrum fisiològic centrifugant 5 minuts a 1.300 xg i a 4 °C.

Es van precipitar dos mL de plasma amb TCA (àcid tricloracètic Panreac ref. 131067) al 70 % i fred, en una concentració final del 10%, per tal d'extreure les proteïnes de la mostra i conservar-les en un medi àcid i evitar l'oxidació. La barreja es va agitar i es va guardar a 4 °C durant uns 20 minuts. Passat aquest

temps es va separar el precipitat centrifugant a 850 xg 10 minuts a 4 °C. El sobrenedant es va al·liquotar en tubs de microcentrifugació tipus tub d'Eppendorf i es va guardar al congelador (-20 °C) per determinar el glutatió reduït i oxidat posteriorment.

Els eritròcits rentats es van lisar amb 20 volums de tampó fosfat Na 10 mM (Na_2HPO_4 Panreac ref. 131679 – NaH_2PO_4 Panreac ref. 131677) pH 6,25 EDTA 1 mM. La preparació hemolisada va servir per obtenir les mostres i poder determinar el glutatió reduït i oxidat i les TBARS. El processament de la mostra va ser el següent: 3 ml es van precipitar amb TCA al 70 % en fred a una concentració final del 10%, la barreja es va agitar enèrgicament i es va deixar 20 minuts a la nevera (4° C). Després es va centrifugar a 850 xg a 4 °C durant 10 minuts. El sobrenedant es va dividir en dues parts, 2 mL en un tub per determinar les TBARS i la resta en un tub de centrifugació tipus tub d'Eppendorf per determinar el GSH i GSSG de la fracció eritrocitària de la sang. Ambdues al·líquotes es van guardar a -20 °C mentre se n'esperava la determinació.

La sang total d'aquest tub es va utilitzar per determinar l'hematòcrit i l'hemoglobina.

2.2. TUB D'EDTA

El plasma i els eritròcits es van separar amb el mateix procediment que en el tub d'heparina-liti.

Es van aliquotar 80 μL de plasma en un tub de centrifugadora tipus el tub d'Eppendorf per determinar posteriorment els productes de la peroxidació (TBARS).

Els eritròcits es van rentar de la mateixa manera que s'ha descrit a l'altre tub.

Les cèl·lules vermelles es van sotmetre a dos processaments diferents. En primer lloc, 500 μL es van dipositar en un tub que es va congelar i descongelar dues vegades a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i s'hi van afegir 5 volums d'aigua destil·lada freda per acabar de lisar els eritròcits. Es va extreure l'hemoglobina amb una solució d'etanol: cloroform (6,25:3,75). Després d'agitar la barreja enèrgicament i centrifugar-la 5 minuts a 1.900 xg a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, la SOD es trobava en la fase del sobrenedant i es va aliquotar en un tub de centrifugadora tipus el tub d'Eppendorf que es va guardar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. En segon lloc, 250 μL dels eritròcits rentats es van diluir 1:20 amb aigua bidestil·lada per obtenir el producte hemolisat que conté els enzims CAT, GPx i GR. D'aquest producte se'n van separar 100 μL per determinar la CAT, i la resta per determinar la GR i la GPx. Les dues mostres es van congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de ser processades.

3. MÈTODES UTILITZATS

3.1. DETERMINACIÓ DE FACTORS PRONÒSTICS

3.1.1. DETERMINACIONS ANALÍTIQUES

En tots els casos, s'utilitzaren com a valors de normalitat per a cada paràmetre els que hi ha indicats com a referència en el Laboratori d'Hematologia i Anàlisis Clíniques de l'HTVC (vegeu taules 22 i 23).

Els valors d'*hemoglobina*, *hematòcrit*, *xifra de leucòcits* i *plaquetes* es determinaren per processament de 5 mL de sang total en tub d'EDTA a través de l'autoanalitzador Beckman-Coulter LH Series 750®. Totes les mostres complien els criteris d'inclusió indicats per aquests paràmetres (estadis inicials d'LLC, Hb superior a 10g/dL, hematòcrit superior a 30% i plaquetes superiors a $100 \times 10^9/L$).

El *TDL* es va calcular per revisió d'analítiques en la història clínica de cada pacient.

Els valors de *creatinina*, *glucosa*, *GOT* i *GPT*, es determinaren a partir de 10 mL de sang total en tub sec, per mitjà de l'autoanalitzador Beckman-Coulter Unicel DXC 800®. Totes les mostres complien els criteris d'inclusió indicats per

aquests paràmetres (creatinina inferior a 1,4 mg/dL, glucosa inferior a 140 mg/dL, GOT/GPT inferiors a 37/40 mg/dL).

La determinació d'*LDH* es realitzà a partir de 10 mL de sang total en tub sec, per mitjà de l'autoanalitzador Beckman-Coulter Unicel DXC 800® i el punt de tall de normalitat es marcà a 500 U/L.

La determinació de *B2M* es realitzà a partir de 10 mL de sang total en tub sec, per mitjà del nefelòmetre Beckman-Coulter Image® i el punt de tall de normalitat es marcà a 2,4 mg/L.

3.1.2.DETERMINACIONS RADIOLÒGIQUES

Es va realitzar TC toraco-abdomino-pèlvic a tots el pacients en el Servei de Radiodiagnòstic de l'HTVC, i es va valorar la presència d'afectació ganglionar i la presència de megàlies abdominals (hepatomegàlia i esplenomegàlia). Segons la classificació de Rai i Binet, en els estadis inicials d'LLC cap malalt presenta megàlies radiològiques i el nombre d'àrees ganglionars afectades és inferior o igual a 2.

3.1.3.DETERMINACIÓ DE LA MORFOLOGIA LIMFOCITÀRIA

Es determinà la *morfologia limfocitària* amb observació a microscopi òptic d'una extensió de sang perifèrica tenyida amb tinció panòptica de May-

Grünwald-Giemsa, segons les tècniques habituals del Laboratori d'Hematologia de l'HTVC.

Es considerà de mal pronòstic la presència en percentatge elevat (superior al 55% dels limfòcits totals) de limfòcits atípics i/o prolimfòcits.

3.1.4.DETERMINACIONS D'IMMUNOFENOTIP

Es van necessitar 5 mL de sang total en tub d'EDTA per determinar el sistema de puntuació diagnòstica, el CD38 i el ZAP-70. Aquest processament es va realitzar en el Servei d'Hematologia de l'Hospital de Bellvitge de Barcelona, per mitjà de citòmetre de flux.

Per a la valoració del sistema de puntuació diagnòstica es van tenir en compte els marcadors immunofenotípics següents amb les característiques típiques de l'LLC següents:

Taula 26. Sistema de puntuació diagnòstica

MARCADOR	CRITERI		
	Positiu	Positiu dèbil	Negatiu
CD5	+	-	-
CD23	+	-	-
FMC7	-	-	+
slg	-	+	-
CD22	-	+	-

Extret de Moreau i col.l., 1997.

Cada valor positiu puntua 1 punt en el sistema. En individus que obtenen puntuacions superiors a 3, aquest sistema de puntuació confereix un alt valor diagnòstic i pronòstic en l'LLC.

Els punts de tall de positivitat foren donats pel centre de referència que considera que un marcador és positiu si es presenta en més d'un 20% de la cel·lularitat limfocitària.

El punt de tall de positivitat de CD38 va ser el donat pel centre de referència. El resultat era positiu si hi havia presència d'aquesta molècula en més del 20% dels limfòcits.

La valoració de la positivitat de ZAP-70 va ser el donat pel centre de referència. El resultat era positiu si hi havia presència d'aquesta molècula en més del 20% dels limfòcits.

3.1.5.DETERMINACIONS CITOGENÈTIQUES I FISH

Les determinacions citogenètiques i FISH es van realitzar per processament de 5 mL de sang total en tub d'heparina-liti en el Servei d'Hematologia de l'Hospital de Trias i Pujol de Badalona. Les sondes utilitzades per dur a terme les tècniques de citogenètica i FISH van ser les següents:

- *LSI D13S319*: corresponent a deleció 13q14.

- *13q42; CEP12; LSI ATM*: per a la detecció de trisomia del cromosoma 12.
- *p53 Probe*: relacionada amb delecions dels cromosomes 11 i 17.

A la taula següent es detallen els valors pronòstics que es van assignar a cada una de les troballes al cariotip o presència de positivitat a la sonda d'hibridació corresponent a cada alteració:

Taula 27. Valors pronòstics assignats als pacients amb LLC segons troballes al cariotip

TROBALLA	CRITERI
del 13	Bon pronòstic
Cariotip normal	Bon pronòstic
+12	Pronòstic intermedi
del 11	Mal pronòstic
del 17	Mal pronòstic

Extret de Pangalis i col 1., 1999.

3.2. DETERMINACIÓ D'ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR

3.2.1. GLUTATIÓ OXIDAT/REDUÏT

L'equilibri GSSG/GSH es va mesurar per fluorimetria amb el mètode d'Hissin i Hilf (1976) amb l'ajuda d'un espectrofluorímetre (Perkin Elmer LS 50B) a una longitud d'ona d'excitació de 350 nm i 420 nm de longitud d'ona d'emissió.

El *glutatió reduït* reacciona amb O-phtalaldehid (OPT Merck ref. 11452) a un pH de 8. La mostra, que es tenia congelada en un medi àcid, es va diluir 1:10 amb un tampó fosfat sòdic (Na_2HPO_4 Panreac ref. 131679 - NaH_2PO_4 Panreac ref. 131677) pH 8 100 mM i EDTA 5 mM. Es va fer una segona dilució, en aquest cas 1:20, a la cubeta de reacció amb mostra (100 μL) i tampó fosfat sòdic (1,8 μL). S'hi van barrejar 100 μL d'OPT i després d'una incubació de 15 minuts es va fer la lectura al fluorímetre amb les condicions especificades a l'inici d'aquest apartat.

El *glutatió oxidat* també reacciona amb l'OPT i dona fluorescència, però a pH 12. A pH 8, com ja s'ha comentat, el GSH reacciona amb l'OPT; ara bé, per sobre d'aquest pH, el GSH s'oxida i això ens faria augmentar el valor del GSSG. Per tant, el primer que es va fer per determinar el glutatió oxidat va ser incubar la mostra amb N-etil-maleïmida (NEM Merck ref. 1308) durant 25 minuts, la qual

cosa en va impedir l'oxidació. Després es va diluir 1:10 amb el tampó NaOH0,1N que ens va aportar el pH bàsic desitjat.

La mostra es va tornar a diluir, aquest cop 1:20, a la cubeta, s'hi va afegir l'OPT i, després d'una incubació de 15 minuts, es va fer la lectura al fluorímetre amb les condicions ja descrites.

És important, en cada sessió, afegir un estàndard o una recta estàndard si els tampons són nous, que ens validi els resultats obtinguts per poder determinar la concentració de la mostra. Els resultats es van expressar en $\mu\text{mols/g Hb}$ i nmols/mL plasma , i la relació entre tots dos paràmetres es calcula mitjançant el quocient entre el valor del GSSG i el del GSH. També cal tenir la precaució de posar un duplicat per a cada mostra sempre que sigui possible, en totes les determinacions.

3.3. DETERMINACIÓ D'ENZIMS ANTIOXIDANTS

3.3.1. SUPERÒXID-DISMUTASA

L'activitat enzimàtica es va mesurar mitjançant el mètode de Misra i Fridovich (1972) basat en l'autooxidació de l'epinefrina.

Els superòxids formats oxiden l'epinefrina i formen l'adenocrom. Això es pot seguir espectrofotomètricament a 480 nm. La SOD transforma els superòxids fins a peròxid d'hidrogen i oxigen, i així evita la formació d'adenocrom.

El primer pas és avaluar la corba d'autooxidació de l'epinefrina. Per això es van barrejar 2,5 mL del tampó Na_2CO_3 (Merck ref. 6392) - NaHCO_3 (Probus ref. 2030) 50 mM pH 10,2 EDTA (Titriplex[®]III Merck ref.8418.0100) 0,1 mM amb 300 μL d'aigua bidestil·lada i 200 μL d'epinefrina 6 mM (Sigma ref. E-4375) en HCl 1 mM. La lectura es va fer cada 40 segons i durant 23 minuts a 30 °C en un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2) a 480 nm. Seguidament, es van fer les dilucions apropiades de la mostra per tal de trobar la concentració que inhibeix el 50 % de la formació de l'adenocrom (I_{50}). A la cubeta es van barrejar 2,5 mL de tampó, 300 μL de les dilucions corresponents i 200 μL d'epinefrina, i la lectura es va realitzar a l'espectrofotòmetre com s'ha descrit anteriorment.

El resultat es va expressar en unitats/g Hb, on una unitat és la quantitat de mostra que inhibeix en un 50% la transformació de l'epinefrina en adenocrom a pH alcalí.

3.3.2. GLUTATIÓ-PEROXIDASA

A partir de la preparació hemolítica 1:20 es van fer les determinacions dels enzims GPx, GR i CAT. Tant la GPx com la GR es van determinar seguint el mètode descrit per Wheeler i col·l. (1990), que valora el nivell de desaparició del NADPH o NADP⁺.

En una cubeta de 3 mL es van barrejar 1,8 mL de tampó fosfat potàssic (KH₂PO₄ Panreac ref. 131509 - K₂HPO₄ Probus ref. 1461) 100 mM pH 7,5 EDTA 0,5 mM amb 120 µL de l'hemolisat 1:20.

Tot seguit, s'hi van afegir 30 µL de NADPH (Sigma ref. N-7505) 20 mM, 100 µL de GSH 60 mM i 4 µL de glutatió-reductasa (GR Fluka ref. 49755) que aporten 1 U de glutatió-reductasa per cubeta. La barreja es va incubar 5 minuts a 37 °C, després s'hi van afegir 100 µL d'hidroperòxid de Cumè (Sigma ref. B-2633) 36 mM. La lectura es va fer a 340 nm en un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2) cada minut durant 5 minuts; això ens va permetre veure la desaparició del NADPH (coeficient d'extinció molar 6,22 mM⁻¹cm⁻¹).

Es va calcular el decrement/minut i els resultats es van expressar en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb}$ (μmols de NADPH transformats).

3.3.3. CATALASA

El mètode de Cohen i col·l. (1970) és el que es va utilitzar per determinar la catalasa.

Amb els 100 μL d'hemolisat 1:20 que s'havien guardat al congelador es va fer una dilució 1:5 addicional amb aigua destil·lada.

En una cubeta de quars de 3 mL es van barrejar 2,980 mL de H_2O_2 (solució de peròxid d'hidrogen Merck ref.8599) 19 mM (amb tampó fosfat potàssic 100 mM (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) pH 7,5) amb 20 μL de la mostra. El que interessa és veure el grau de desaparició del peròxid d'hidrogen en els primers 30 segons. Per fer-ho, es va utilitzar un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2) amb lectura a 240 nm.

Es va calcular el decrement/minut i els resultats es van expressar en $\text{mmol}/\text{min}/\text{g Hb}$ (fa referència a mmol de H_2O_2 transformats).

3.3.4. GLUTATIÓ-REDUCTASA

En una cubeta de 3 mL es van barrejar 1,8 mL de tampó fosfat potàssic (descriu ja en el mètode de la GPx), 120 μ L de l'hemolisat 1:20 i 100 μ L de glutatió oxidat 75 mM. Després d'incubar durant 5 minuts a 37 °C, s'hi van afegir 30 μ L de NADPH i es va llegir immediatament a l'espectrofotòmetre en les mateixes condicions que en la determinació de la GPx. El que veiem ara, però, és la generació de NADP⁺ a partir del NADPH durant la reducció del GSSG (Goldberg, 1983).

Es va calcular l'increment/minut i els resultats es van expressar en μ mol/min/g Hb (μ mols de NADP⁺ generats).

3.4. DETERMINACIÓ DE PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA (TBARS)

Les TBARS es van determinar amb el mètode de Buege i Aust (1978) però mesurant la fluorescència amb un espectrofluorímetre Perkin Elmer LS 50B a 515 nm de longitud d'ona d'excitació i 548 nm de longitud d'ona d'emissió, tal com descriuen Richard i col·l. (1992).

Primer de tot, es van diluir les mostres amb sèrum fisiològic. En el cas dels eritròcits es va fer una dilució 1:2 i per al plasma se'n va fer una de 1:50. Seguidament, es va barrejar 1 mL de la mostra diluïda amb 2 mL d'una solució TCA-TBA-HCl: àcid tricloracètic al 15%, àcid tiobarbitúric al 0,375% (Merck ref. 8180) i àcid clorhídric 0,25 N (Probus ref. 17750 35%). Aquesta barreja es va posar 15 minuts a ebullició (100 °C) i es va refredar amb gel. Després es va centrifugar a 1.900 xg durant 10 minuts a 4 °C. Finalment, es va recollir el sobrenedant que es va llegir al fluorímetre.

L'estàndard utilitzat va ser el bis-dietilacetal malonaldehid (d = 0,92 kg/L) en diferents concentracions. La recta obtinguda va servir per determinar la concentració de la mostra. Els resultats es van expressar en nmols/g Hb i nmol/mL plasma.

3.5. DETERMINACIÓ DE LA CAPACITAT ANTIOXIDANT (ORAC)

La tècnica de l'ORAC va ser desenvolupada per Cao i col·l. (1998). Es mesura la capacitat antioxidant per atrapar radicals peroxil induïda per 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride a 37 °C. Inicialment es feia servir B-phycoeytrín com proteïna que rebia el dany oxidatiu dels peroxils i es marcava amb fluorescència. El mètode s'ha modificat (Ou i col·l., 2001), donada la inestabilitat de la fluorescència d'aquesta proteïna, amb un altre marcador de fluorescència com és la fluoresceïna.

S'usen els reactius següents: tampó fosfat potàsic 75 mM pH 7,4, fluoresceïn sodium salt (FL) 48 nM, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride 0,64 M i 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic àcid (trolox) 1 µM final, amb els que es mesura, per reacció fluorimètrica, la capacitat antioxidant d'atrapar radicals peroxil induïda pel dihidroclorur de 2,2'-azobis(2-amidinopropà) gràcies a l'analitzador Fluoroscán Ascent.

El valor d'ORAC final s'obté per mitjà dels càlculs següents:

1. Àrea sota la corba:

$$AUC = 1 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_{35}/f_0$$

2. Càlcul d'ORAC

$$ORAC = [(AUC_{mostr} - AUC_{blanc}) / (AUC_{trolox} - AUC_{blanc})] \times (\text{molaritat de trolox/molaritat de la muestra})$$

4. PUNTUACIÓ GLOBAL DEL DISTRÈS OXIDATIU

Per valorar la puntuació global del distrès oxidatiu es va utilitzar el mètode descrit per Romeu i col·l (2010). En aquest mètode, per poder determinar el nivell de distrès oxidatiu de cada individu, cada biomarcador estudiat va rebre un valor numèric [0, +1 o -1 punts], depenent del valor del resultat en relació amb límits de normalitat de la població control i amb els criteris següents:

- Si el valor del paràmetre es trobava dins del rang de normalitat de la població control, s'assignaven 0 punts [0].
- Si el valor del paràmetre, per damunt o per sota dels rangs de normalitat, era indicatiu de distrès oxidatiu s'assignava un punt positiu [+1].
- Si el valor del paràmetre, per damunt o per sota dels rangs de normalitat, era indicatiu d'estat antioxidant s'assignava un punt negatiu [-1].

La suma dels valors obtinguts en cada un dels biomarcadors dóna com a resultat una puntuació per a cada individu.

En el model de puntuació del distrès oxidatiu (PDO) aplicat també es tenen en compte les relacions que hi pot haver entre alguns d'aquests paràmetres. L'assignació de la puntuació es va basar en criteris estadístics i bibliogràfics.

Tal com descriu la bibliografia, els biomarcadors que valoren el distrès oxidatiu estan molt correlacionats entre si (Halliwell, 1989; Harman, 1994; Herrera i col·l., 2001; Cerne, 2006; Giustarini 2009), per aquest motiu cal una clara descripció de la puntuació assignada en cada un dels biomarcadors.

El nostre treball ha intentat fer una adaptació del sistema de puntuació descrit per Romeu i col·l., (2006) utilitzant els mateixos criteris però adaptats als biomarcadors que hem inclòs en l'anàlisi dels pacients amb LLC i dels controls sans. Els detalls de la puntuació es descriuen a continuació.

4.1. PUNTUACIÓ DELS ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR

4.1.1. PUNTUACIÓ DEL GLUTATIÓ OXIDAT/REDUÏT

El sistema del glutatió en plasma no es puntua, ja que el nivell de glutatió plasmàtic no prové només de l'interior de l'eritròcit sinó que també pot contenir l'excés del glutatió d'altres teixits. Això dificulta la interpretació dels resultats.

El glutatió existeix en dues formes: reduït (GSH) i oxidat (GSSG), que en condicions normals es troben en equilibri. El GSH és fàcilment oxidat, per això, l'acetilació del grup tiol estableix la molècula i n'augmenta la seva biodisponibilitat in vivo. Aquesta biodisponibilitat és la que marca el grau de distrès oxidatiu, és a dir, molt de glutatió oxidat i poc de reduït indica distrès oxidatiu. De la mateixa manera, si es dona el cas contrari, la protecció davant dels radicals lliures està augmentada.

□ *GSH eritròcit*

Un resultat per sobre del nivell superior rep un punt d'estat antioxidant, mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'aplica un punt positiu.

□ *GSSG eritròcit*

Un resultat per sobre del nivell superior rep un punt positiu, mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'aplica un punt d'estat antioxidant.

□ *GSSG/GSH eritròcit*

Un resultat per sobre del nivell superior rep un punt de distrès oxidatiu, mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'aplica un punt d'estat antioxidant.

4.2. PUNTUACIÓ DELS ENZIMS ANTIOXIDANTS

4.2.1. PUNTUACIÓ DE LA SUPERÒXID-DISMUTASA

La SOD té un paper específic de protecció de les cèl·lules, per eliminació catalítica de l'ió superòxid. Si aquests mecanismes no funcionen adequadament, els radicals lliures poden iniciar la peroxidació lipídica i obtenir un producte final com les TBARS, que reflecteixen el dany cel·lular per radicals lliures. Un nivell alt de SOD és indicador de distrès oxidatiu i no només com a resposta a l'increment de producció dels superòxids, sinó també arran de la producció del H_2O_2 , que és una molècula prooxidant.

Un nivell baix ens indica un estat de normalitat o de repòs oxidatiu, sempre que aquest valor no vagi acompanyat d'altres indicadors de distrès oxidatiu com alts nivells de glutatió oxidat o productes de la peroxidació lipídica per sobre de la normalitat, en aquests últims supòsits es considera que no hi ha prou activitat de la SOD i, per això, hi ha altres signes de distrès oxidatiu.

▫ SOD

Un resultat per sobre del nivell superior rep un punt positiu, si el valor és menor al límit inferior la puntuació és zero, excepte si es troba acompanyat de valor de TBARS alt i/o del GSSG eritrocitari alt, en aquest cas la puntuació rebuda és d'un punt de distrès oxidatiu.

4.2.2. PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ-PEROXIDASA

La glutatió-peroxidasa és un altre dels sistemes defensius de l'organisme davant dels radicals lliures. És un enzim que conté seleni i que descompon el peròxid d'hidrogen, igual que la catalasa, en aigua i oxigen. En l'eritròcit, la GPx actua davant el H_2O_2 si la CAT no pot neutralitzar-lo (Junod, 1989). Per tant, nivells alts d'aquest enzim indiquen un distrès oxidatiu, mentre que si es troba en nivells baixos, és indicador d'un estat antioxidant, sempre que aquest valor no vagi acompanyat d'altres indicadors de distrès oxidatiu com alts nivells de GSSG/GSH eritrocitari o productes de la peroxidació lipídica per sobre de la normalitat.

- GPx

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt positiu, mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt d'estat antioxidant, excepte quan el valor de TBARS és alt i/o el valor de GSSG/GSH eritrocitari també és alt, en aquest cas la puntuació rebuda és d'un punt de distrès oxidatiu.

4.2.3. PUNTUACIÓ DE LA CATALASA

La catalasa és un altre dels sistemes defensius de l'organisme davant dels radicals lliures. El peròxid d'hidrogen es forma com un dels productes finals del metabolisme oxidatiu aeròbic dels hidrats de carboni. Si es deixa acumular, el

peròxid d'hidrogen és letal per a les cèl·lules. La catalasa, doncs, descompon el peròxid d'hidrogen en oxigen i aigua. Per tant, nivells alts d'aquest enzim indiquen un estat antioxidant, excepte quan hi ha biomarcadors distrès oxidatiu, com quan hi ha més producció de peròxid d'hidrogen per una SOD augmentada, o hi ha una GPx alta com a resposta d'una major producció de H_2O_2 i un GSH eritrocitari baix. En aquestes situacions es considera que la CAT està augmentada com a resposta a un estat de distrès oxidatiu. Quan es troba en nivells baixos, és indicador de distrès oxidatiu.

Tant la SOD com la catalasa són sistemes defensius davant els radicals lliures. No obstant això, nivells alts de SOD reben un punt de distrès oxidatiu i nivells alts de catalasa reben un punt negatiu. Aquesta puntuació aparentment contradictòria s'explica pel fet que la SOD detoxifica un radical lliure i en forma un altre, el peròxid d'hidrogen; per tant, la SOD perd la seva característica detoxificadora si no va acompanyada d'altres sistemes que eliminen el peròxid que forma. En canvi, la catalasa elimina el peròxid d'hidrogen i forma productes que no tenen característiques de radicals lliures.

▫ CAT

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt negatiu excepte quan es troba acompanyada d'una SOD amb un punt de distrès oxidatiu i/o una GPx alta i/o un GSH eritrocitari baix. En aquest cas, la puntuació rebuda és d'un punt de distrès oxidatiu. Si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt positiu.

4.2.4. PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ-REDUCTASA

L'organisme manté nivells adequats de GSH per l'acció de la glutatió-reductasa, a partir del glutatió oxidat, amb el NADPH. Una GR augmentada és indicadora d'estat antioxidant sempre que no hi hagi un nivell alt en el quocient GSSG/GSH, ja que llavors considerem que hi ha un distrès oxidatiu i la GR augmenta per restablir l'equilibri entre GSSG i GSH. En canvi, si els nivells de GR són baixos es considera que no hi ha mecanismes de defensa suficients i, per tant que hi ha un distrès oxidatiu.

- GR

El valor alt de GR rep una puntuació d'un punt negatiu sempre que no vagi acompanyat d'un GSSG/GSH alt. En aquest cas rep un punt d'estrès oxidatiu, tant si el resultat sobrepassa el límit superior com si no arriba al límit inferior.

4.3. PUNTUACIÓ DELS PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA

La peroxidació lipídica es mesura amb la determinació de les TBARS; per tant, si es troba en nivells elevats, indica que hi ha dany cel·lular.

▫ *TBARS en plasma*

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt positiu, mentre que si el valor és inferior al límit més baix els punts rebuts són zero.

▫ *TBARS en eritròcits*

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt de distrès oxidatiu, mentre que si el valor és inferior al límit més baix els punts rebuts són zero.

L'assignació de punts de cada paràmetre en cada individu i la suma total per individu es realitza mitjançant fórmules complexes lligades al full de càlcul d'Excell (*Microsoft Excell, MS Office 2000*), on tenim els resultats de totes les analítiques realitzades. Les fórmules permeten puntuar cada paràmetre, segons els requeriments que s'han detallat en aquest apartat, i estan sempre referides als rangs de normalitat obtinguts de la població control de l'estudi (95 % de la població, límit inferior i superior, taula 28).

El resultat final d'aquest càlcul és una nova variable per afegir als diferents paràmetres d'estudi del nostre treball i l'anomenem: *puntuació de distrès oxidatiu* (PDO).

5. ESTUDI ESTADÍSTIC

Els resultats s'han tractat estadísticament amb el programa SPSS v.13 (*Statistical Package for the Social Sciences*) per a Windows. S'han fet les anàlisis següents:

- Descriptius: n de la mostra, valors màxims, valors mínims, mitjana de la població, desviació estàndard, interval de confiança del 95% (rang de valors on es troben representats el 95% dels individus de la població).
- Prova de Kolmogorov-Smirnov: S'ha usat aquesta prova estadística per contrastar la hipòtesi de distribució normal de cada variable. El nivell de significació ha estat $p = 0,05$.
- Prova F de Fisher-Snedecor: S'ha usat per comprovar l'homogeneïtat de variàncies.
- Prova t de Student-Fisher per a dues mostres independents: S'ha utilitzat com a mètode de comparació de mitjanes de dos grups, el nivell de significació s'ha establert en 0,05.
- ANOVA d'un factor (anàlisi de la variància): Procediment estadístic utilitzat per a la comparació de mitjanes de més de dos grups, el nivell de

significació s'ha mantingut en 0,05 i s'ha aplicat el mètode de Scheffé per calcular la significació de totes les parelles de grups.

- En els paràmetres que no segueixen una distribució normal, s'han aplicat les tècniques no paramètriques corresponents: U de Mann-Whitney per a la comparació de dos grups i Kruskal-Wallis quan comparem més de dos grups. El nivell de significació també ha estat situat a 0,05.
- Prova *t* de Student-Fisher per a dues mostres aparellades: S'ha utilitzat com a mètode de comparació de mitjanes de dues situacions diferents en un mateix grup d'individus, el nivell de significació s'ha establert en 0,05.
- ANOVA de mesures repetides dins el model lineal general: Procediment estadístic utilitzat per a la comparació de mitjanes de més de dues situacions diferents en un mateix grup d'individus, el nivell de significació s'ha mantingut en 0,05 i s'ha aplicat el mètode de contrast simple i repetit per a les comparacions múltiples.
- En els paràmetres que no segueixen una distribució normal, s'han aplicat les tècniques no paramètriques corresponents: Test de Wilcoxon per a la comparació de dos grups relacionats i de Friedman quan comparem més de dos grups relacionats entre si. El nivell de significació també ha estat situat a 0,05.

- Correlacions bivariades: Les correlacions mesuren la relació entre variables, el test ens dóna el coeficient de correlació de Pearson que mesura l'associació lineal entre dues variables. La prova de significació ha estat bilateral, ja que no es coneixia prèviament la direcció de l'associació entre variables.

- Anàlisi de freqüències: S'han obtingut estadístics i representacions gràfiques que resulten útils per descriure algunes variables. S'ha utilitzat per descriure, amb percentatges, les freqüències de variables categòriques.

RESULTATS

1. DISTRÈS OXIDATIU EN CONTROLS SANS

1.1. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU

Com s'ha comentat en l'apartat d'introducció del nostre treball, en els últims anys s'ha intentat buscar un biomarcador de distrès oxidatiu universal, és a dir, que es pugui utilitzar en qualsevol context, que sigui comparable entre individus i que informi del seu estat fisiopatològic. No obstant això, cada cop pren més força la creença que no és possible mesurar l'estat d'oxidació general si no es fa amb múltiples biomarcadors lligats entre si per mitjà d'una equació que ofereixi un valor global del grau de distrès oxidatiu. A aquest valor l'anomenarem *puntuació de distrès oxidatiu (PDO)*.

Per això, s'han d'escollir un conjunt de biomarcadors que representin d'una manera àmplia l'estat de la balança prooxidant-antioxidant. L'analítica d'aquests paràmetres hauria de ser, a més, assequible, tant temporalment com econòmica, perquè pugui ser aplicada com a tècnica de rutina per a la població en general.

Un cop definits aquests marcadors, i analitzats els seus paràmetres, l'establiment d'un score en funció d'aquests valors és de gran utilitat per a la valoració conjunta del distrès oxidatiu i per facilitar-ne la seva interpretació, tal com es fa de manera habitual en la valoració pronòstica de diferents entitats

en funció d'scores establerts (p. ex. l'APACHE II per la sèpsia o l'score immunofenotípic per a LLC).

En el nostre treball no s'ha inclòs cap dels promotors del distrès oxidatiu en la valoració global, ja que, tal com s'ha comentat a la introducció, les tècniques que quantifiquen els RLLO i les ERO són complicades i costoses.

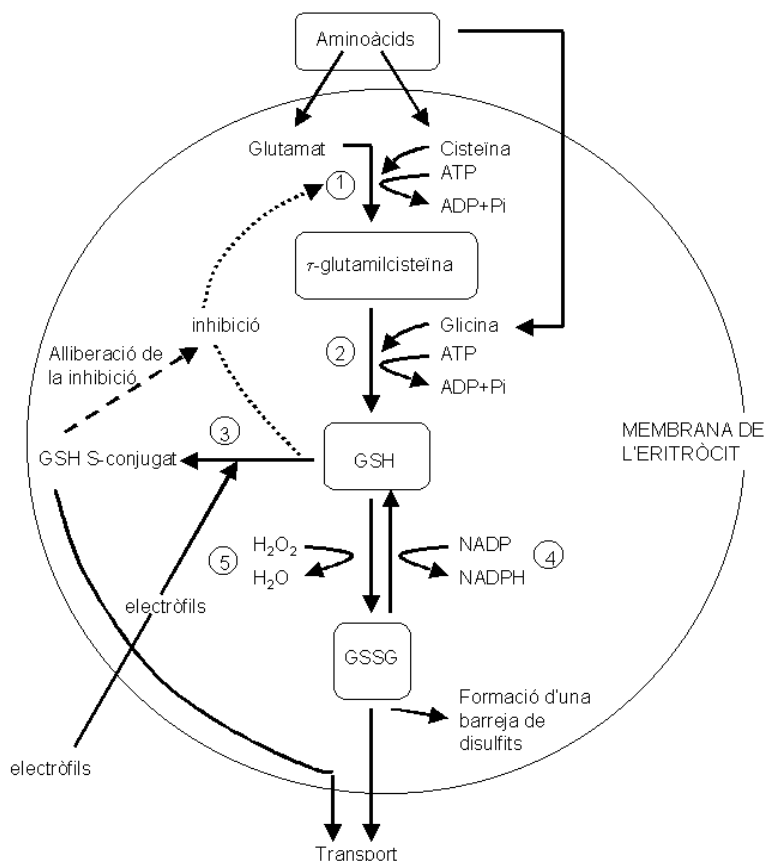
El grup de biomarcadors que s'han utilitzat en el càlcul de la PDO es detalla a continuació:

- *Inhibidors del dany oxidatiu*, que són els antioxidants de baix pes molecular: S'ha introduït el glutatió eritrocitari com a biomarcador, ja que és un dels antioxidants endògens més importants. La figura 13 representa la síntesi del glutatió a l'eritròcit i el seu pas al plasma. El glutatió plasmàtic no s'ha inclòs en la PDO.

- *Enzims inhibidors del distrès oxidatiu*: Han entrat dins la valoració global del distrès oxidatiu la SOD, la CAT, la GR i la GPx. Tots aquests enzims actuen a diferents nivells en l'escala de detoxificació radicalària tal com es pot apreciar a la figura 14. La informació que ens donen aquests enzims no és repetitiva i, a més, tal com s'ha vist en treballs previs, tots estan relacionats entre si. Variacions en l'activitat d'algun d'aquests, ocasionarà la variació en l'activitat dels altres per tal de compensar-ho. Això podrà ser expressat en forma de mesura de ràtio d'activitat

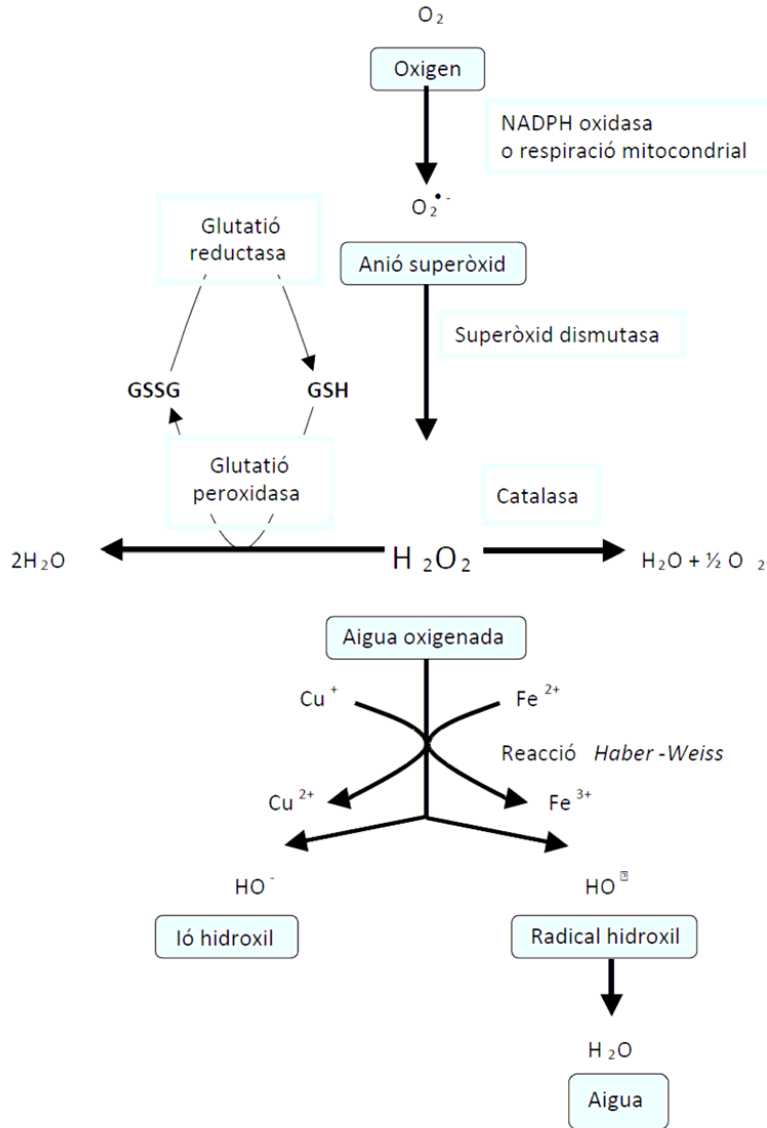
d'aquests enzims (Muchova i col.l., 2001). La introducció de tots aquests en la PDO ens dóna una idea molt més acurada de l'estat de tot el sistema defensiu.

Figura 13. Relacions metabòliques relacionades amb la síntesi del glutatió en eritròcits humans



Adaptat de Kondo i col.l., 1984. (1) Glutamilcisteïna-sintetasa; (2) Glutatió-sintetasa; (3) Glutatió S-transferasa; (4) Glutatió-reductasa; (5) Glutatió-peroxidasa.

Figura 14. Principals etapes de formació-eliminació de les ERO



Extret d'Urban i col.l., 1995.

- *Productes del distrès oxidatiu:* Les ERO poden afectar les cèl·lules a tots els nivells i, tal com ja s'ha comentat a la introducció els lípids, les proteïnes i el DNA poden ser alterats per aquestes substàncies. Per això, hi ha índexs que avaluen els productes de la peroxidació i ens informen sobre el dany que han provocat les ERO. En el nostre treball, s'ha inclòs la peroxidació lipídica (mitjançant la quantificació de les TBARS) en el grup de biomarcadors per a la PDO. La quantificació dels productes resultants de la peroxidació de lípids, fruit d'un distrès oxidatiu, ha estat relacionat àmpliament amb moltes malalties (figura 12) i, més concretament, amb les oncohematològiques. Recentment, s'ha demostrat un augment en els nivells sèrics de les TBARS en pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda (Battisti i col·l., 2008) i així s'ha reforçat la idea que la mesura de les TBARS s'ha d'incloure en una valoració global del distrès oxidatiu. La metodologia que hi ha al voltant de l'oxidació de lípids és molt extensa (LDL oxidada, malondialdehid, hidroxinonenals...). Tot i això, el mètode TBARS ens dóna una idea general d'aquest tipus d'oxidació, ja que inclou la detecció de molts productes de la peroxidació i no només una molècula concreta (Banni i col·l., 1996).

Malgrat que alguns autors destaquen el GSSG com a bon marcador de dany proteic (Dotan i col·l., 2004, Griffiths i col·l., 2002) i que nosaltres també l'hem inclòs en l'anàlisi, seria important en el futur incloure també la *peroxidació proteica*, mesurada amb la quantitat de proteïnes carbonilades, en la mesura de la PDO, ja que, en algunes situacions, el dany oxidatiu se centra en les proteïnes o n'és una conseqüència molt important (figura 12).

En el nostre treball tampoc s'ha inclòs l'oxidació *del DNA* dins dels biomarcadors de distrès oxidatiu. L'indicador de residus de 8-OHdG sembla que és l'índex més fiable i assequible per valorar el dany oxidatiu als nucleòtids. Tot i això, la majoria de treballs analitzen el contingut d'aquesta molècula en orina (Wu, 2004) i són molt pocs els que ho fan en plasma. Segons Halliwell i col·l. (1989), els resultats d'aquestes determinacions urinàries de 8-OHdG s'han d'interpretar amb cautela ja que, tot i ser el mètode més utilitzat en humans reflecteix, una part minoritària del dany oxidatiu al DNA. A més, els diferents problemes metodològics que suposa la seva determinació, formació d'artefactes en el procés d'aïllament, hidròlisi i anàlisi fan que, juntament amb la complexitat i cost de la tècnica, no s'hagin valorat en el nostre treball.

En moltes de les tècniques bioquímiques emprades, el principal problema és la sensibilitat del mètode. Hi ha tècniques d'espectrometria de masses que permeten determinar amb molta més sensibilitat les molècules que pretenem estudiar i que estan relacionades amb el distrès oxidatiu. No obstant això, el cost d'aquest tipus d'assaigs i la seva complexitat fan que l'aplicabilitat clínica es redueixi molt. Des del nostre punt de vista, hem triat paràmetres estudiats amb profunditat i metodologia d'alta sensibilitat en l'àmbit de la recerca bàsica, i que han estat clarament relacionats amb el distrès oxidatiu. Aquests biomarcadors, un cop escollits acuradament, poden ser analitzats amb tècniques més rutinàries, ràpides i econòmiques, per fer possible la seva aplicació a la pràctica clínica.

Així doncs, el sistema de puntuació proposat s'ha determinat amb els biomarcadors següents:

- GSH, GSSG i ràtio GSSG/GSH en eritròcits.
- TBARS en eritròcits i plasma.
- Els enzims CAT, SOD, GR i GPx en eritròcits.

En la taula 28 es mostren els resultats dels individus del grup control pel que fa a la puntuació obtinguda, segons els criteris definits en l'apartat de material i mètodes, i la distribució de freqüències dels punts obtinguts. Els valors del grup control del present treball són molt similars als obtinguts en poblacions més grans d'individus control, en els quals també s'ha aplicat la puntuació PDO (Romeu i col·l., 2010).

Taula 28. Puntuació PDO de la mostra de controls

		Freqüència	Percentatge	Mitjana	DS	Mínim	Màxim
PUNTUACIÓ	-1,00	4	10,81				
	0,00	30	81,08				
	1,00	2	5,40				
	2,00	1	2,70				
	Total	37	100	0,000	0,535	-1	2

Mitjanes, desviacions estàndards (DS) i distribució de freqüències de la puntuació PDO en el grup control sa.

1.2. RANGS DE NORMALITAT

Per valorar el pes del distrès oxidatiu en determinades situacions fisiopatològiques necessitem, en primer lloc, establir els valors de normalitat basats en els resultats en població general de cada un dels biomarcadors que considerem que hi estan implicats.

A la taula 29 es descriuen els valors mitjans i els rangs de normalitat de cada un dels biomarcadors escollits. Aquests valors ens seran d'utilitat per diferenciar una situació patològica, o de no-normalitat, d'una situació normal. Podrem, doncs, detectar quan un individu presenta valors fora dels rangs de referència i així donar la possibilitat d'actuar clínicament per restablir la normalitat.

L'extracció de la mostra de sang i la seva preparació per valorar els biomarcadors s'ha fet de manera homogènia i seguint els mateixos protocols, i, en general, s'han procurat minimitzar les variacions intraindividuals dels paràmetres, que puguin ser degudes a la manipulació de la mostra. No obstant això, es fa necessari millorar els factors que fan possible l'estandardització dels rangs de normalitat dels paràmetres estudiats de manera que, finalment, aquests rangs puguin ser utilitzats com a referència de valors normals en sang en molts altres estudis.

Per exemple, el moment de l'extracció és molt important, com es demostra en el treball de Singh i col·l., on a en estudiar els ritmes circadians dels enzims

antioxidants SOD, CAT, GR i GPx van trobar valors diferents depenent del moment en què es va realitzar l'extracció (Singh i col·l., 2005).

Altres paràmetres com ara l'estil de vida, el sexe i l'edat també tenen importància en el context del distrès oxidatiu (Moller i col·l., 1996; Ortin i col·l., 1996; Alberg, 2002) i haurien de controlar-se de manera estricta, en una base de dades, per construir uns rangs de normalitat d'aplicació com més general millor. La dificultat que això suposa es dona per la variabilitat entre els diferents laboratoris, tant en relació amb tècniques emprades, aparells usats, etc.

Tot i aquestes dificultats, el grup control utilitzat en aquest treball és representatiu de la població general de la nostra zona geogràfica i, per tant, és un grup vàlid per ser comparat amb els individus amb LLC.

Com ja s'ha comentat en l'apartat de material i mètodes, el grup d'individus control el formaven 37 persones sanes (20 dones i 17 homes). L'edat mitjana de la mostra fou, en el moment de realitzar l'estudi estadístic en el que també es va valorar retrospectivament la possibilitat de progressió de la malaltia des del moment de la recollida de la mostra, de 71,8 anys, amb uns marges compresos entre els 49 i els 81 anys.

**Taula 29. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup control.
Rangs de normalitat**

BIOMARCADORS	MITJANA \pm DE (n = 37)	LÍMIT SUPERIOR-LÍMIT INFERIOR
<i>Eritròcits</i>		
GSH ($\mu\text{mol/g Hb}$)	4,93 \pm 1,5	5,4-4,4
GSSG ($\mu\text{mol/g Hb}$)	0,84 \pm 0,37	0,96-0,72
GSSG/GSH	0,19 \pm 0,11	0,22-0,15
TBARS (nmol/g Hb)	0,61 \pm 1,914	4,67-3,44
CAT (mmol/min/g Hb)	216,51 \pm 38,5	228,92-204,11
GPx (mmol/min/g Hb)	27,03 \pm 7,91	29,57-24,48
GR (mmol/min/g Hb)	3,56 \pm 1,31	3,98-3,14
SOD (U/ g Hb)	1739,54 \pm 459,74	1887,68-1591,41
<i>Plasma</i>		
GSH ($\mu\text{mol/mL}$)	21,54 \pm 12,39	25,54-17,54
GSSG ($\mu\text{mol/mL}$)	25,58 \pm 6,66	27,73-23,43
GSSG/GSH	1,88 \pm 1,61	2,4-1,36
TBARS (nmol/mL)	2,03 \pm 1,13	2,4-1,67

Mitjanes, desviacions estàndards i valors de referència dels biomarcadors en el grup control sa. La n és el nombre d'individus. El límit inferior i superior corresponen a l'interval de confiança 95%.

2. VALORACIÓ DELS FACTORS DE RISC EN L'LLC

2.1. PARÀMETRES DEMOGRÀFICS DE LA MOSTRA

Es recullen dades d'un total de 37 pacients prèviament diagnosticats d'LLC en estadis inicials, segons els criteris clàssics de Binet i col·l. (1981) i Rai i col·l. (1975). Aquests criteris d'inclusió i exclusió es troben descrits en l'apartat de la introducció i material i mètodes.

No s'inclou cap pacient que no compleixi aquests criteris i, per tant, no hi ha, en el moment de recollir la mostra i realitzar l'estudi analític, anèmia o plaquetopènia. Tampoc hi ha més de dues àrees ganglionars palpables, ni hepatomegàlia o esplenomegàlia. La xifra total de leucòcits o limfòcits no va ser limitació per entrar en l'estudi, ja que aquests valors no s'han establert com a factors per a l'estadiatge de la malaltia.

L'edat mitjana de la mostra (20 dones i 17 homes) fou de 75 anys, en el moment de realitzar l'estudi estadístic, amb uns marges compresos entre els 54 i els 90 anys.

Dels 1.390 pacients vistos en consultes externes durant el període de l'estudi, 110 van ser diagnosticats d'LLC, dels quals, finalment, es van incloure 37 pacients amb LLC que complien els criteris d'inclusió i estaven en estadis

inicials de la malaltia (figura 15). Des del diagnòstic inicial, fins al moment de realitzar el nostre estudi, els pacients es van mantenir en estadis inicials d'LLC. No es va evidenciar tampoc progressió de la malaltia des del moment de realitzar l'estudi analític, fins a la realització de l'estudi estadístic (20 mesos de diferència, període de temps en el que es va desenvolupar l'estudi), independentment del nivell de distrès oxidatiu o la presència de factors de risc desfavorables. De manera global, el període mitjà de temps sense progressió de la malaltia en els 37 pacients analitzats fou de 76 mesos, amb uns extrems de 20 i 271 mesos.

S'elimina doncs el possible factor de progressió de la malaltia durant el seguiment com a possible causa justificant d'augment de distrès oxidatiu de la mostra analitzada.

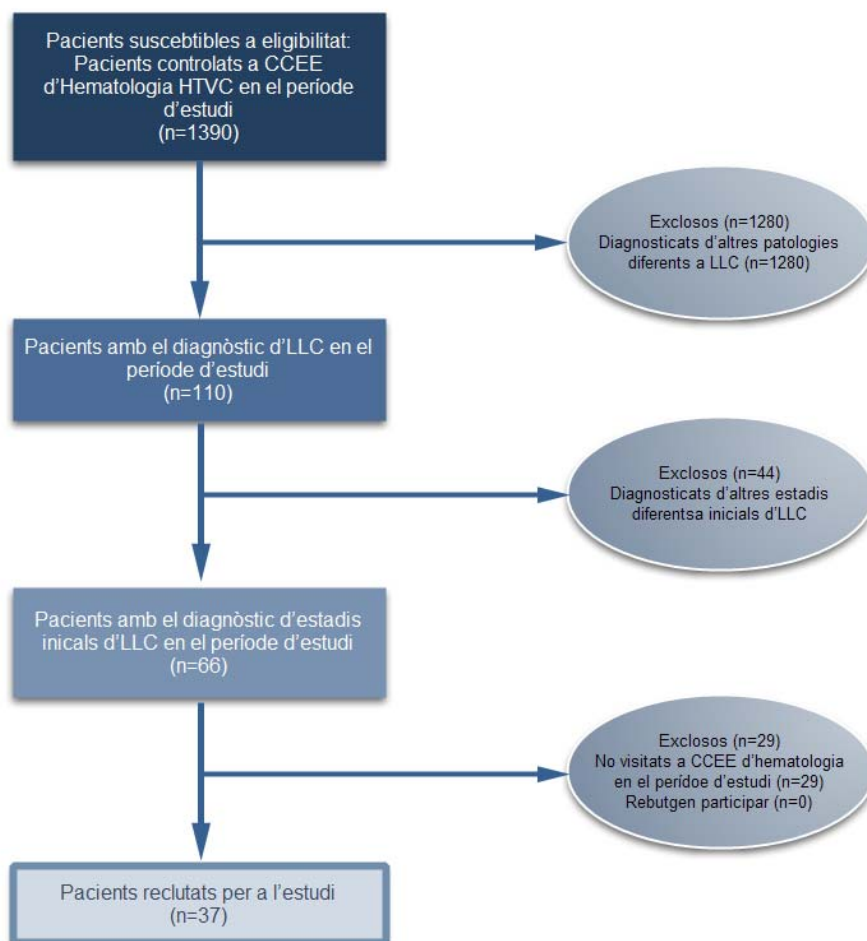
Figura 15. Diagrama de flux de l'estudi amb pacients d'LLC

Diagrama de fluxe per al reclutament de pacients d'estudi diagnosticats d'estadis inicials d'LLC. Adaptat de les guies elaborades per l'estament CONSORT (Boutron i col.l., 2008).

2.2. DADES ANALÍTIQUES DE LA MOSTRA

En el nostre treball, s'han valorat diferents paràmetres analítics (taula 30). Des del punt de vista de l'hemograma es controlaren tan l'hemoglobina com la xifra de plaquetes, valors bàsics a l'hora d'estratificar per estadis als pacients amb LLC. Es va determinar també la xifra de leucòcits. Des del punt de vista bioquímic, es varen controlar valors de glucosa, creatinina i transaminases per descartar presència de diabetis, malaltia renal o hepàtica i excloure de la mostra de l'estudi aquests casos. Altres valors bioquímics analitzats foren l'LDH i la B2M, que foren considerats com a marcadors pronòstics.

Per tal de complir els criteris d'estadis inicials d'LLC, els valors d'*hemoglobina* en tots els casos foren superiors a 11 g/dL, a excepció d'un únic cas amb hemoglobina 9,4 g/dL en el moment de processament de la mostra, i no atribuïble a la malaltia. La xifra de *plaquetes* en tots els casos va ser superior a $100 \times 10^9/L$.

La xifra mitjana de *leucòcits* dels pacients fou de $26,14 \times 10^9/L$, amb valors extrems de 4,5 i $218 \times 10^9/L$, sense que aquest valor fos criteri diagnòstic ni pronòstic de la malaltia.

Atès que, com ja hem comentat en l'apartat d'introducció, hi ha situació de distrès oxidatiu en processos patològics com la diabetis, la insuficiència renal o l'hepatopatia, en tots els casos, i per tal de no interferir en els resultats de

distrès oxidatiu, cap pacient patia insuficiència renal (xifres de *creatinina* inferiors a 1,4 mg/dL en tots les casos). Cap pacient tenia antecedents de diabetis, malgrat que en el moment de la recollida de la mostra podien presentar valors elevats de *glicèmia* (aquest fet és atribuïble a què no s'exigia el dejuni prèviament a la recollida de la mostra de sang) i cap pacient tenia indicis analítics d'hepatopatia. Així, els valors de *transaminases* (GOT i GPT) es trobaven dintre del rang de normalitat establert pel laboratori de l'HTVC.

Els resultats de les dades demogràfiques, de seguiment i analítiques de la mostra de pacients amb LLC es troben a la taula 30.

Taula 30. Dades demogràfiques, de seguiment i analítiques de la mostra de pacients

BIOMARCADOR	MITJANA \pm DE (n = 37)	LÍMIT SUPERIOR-LÍMIT INFERIOR
Edat (anys)	75 \pm 9,78	78,1-71,9
Seguiment (mesos)	78 \pm 6,1	98,2-57,18
Hemoglobina (g/dL)	13,8 \pm 1,64	14,32-12,68
Hematòcrit (%)	41,05 \pm 4,61	42,51-39,59
Leucòcits ($\times 10^9$ /L)	26,14 \pm 36,25	37,66-14,62
Plaquetes ($\times 10^9$ /L)	191,14 \pm 50,39	207,86-175,82
Creatinina (mg/dL)	0,95 \pm 0,19	1,01-0,89
Glucosa (mg/dL)	123,07 \pm 39,77	135,71-110,93
LDH (UI/L)	423,39 \pm 78,86	448,4-397,9
B2M(mg/L)	2,87 \pm 0,91	3,17-2,56

Mitjanes i desviacions estàndards i valors de referència dels biomarcadors en el grup de pacients amb estadis inicials d'LLC. Els límits inferior i superior corresponen a l'interval de confiança 95%.

2.3. FACTORS PRONÒSTICS

Es varen valorar diferents factors pronòstics en els pacients de la mostra. Es tingueren en compte tant els coneguts clàssicament, com d'altres de nous i de valor recentment acceptat. La seva significació pronòstica es troba reflectida a la taula 31.

Actualment no hi ha cap treball en el que es relacioni la presència d'un determinat factor pronòstic d'LLC amb el nivell de distrès oxidatiu. No obstant això, s'ha vist, per estudi de *microarray*, que una sobreexpressió de determinats gens relacionats amb l'expressió de diferents paràmetres de distrès oxidatiu, pot associar-se a un major risc de la malaltia per conferir-li resistència a tractaments (Carlucci i col·l., 2009). També, en altres entitats com la leucèmia limfoblàstica en nens, s'ha associat una major presència de biomarcadors de distrès oxidatiu amb altres factors de risc de la malaltia (Caron i col·l., 2009).

Taula 31. Paràmetres valorats a l'estudi i significació pronòstica

CRITERI	INDICADOR PRONÒSTIC	SIGNIFICACIÓ
TDL	> 12 mesos	Bon pronòstic
Score immunofenotípic	Puntuació superior a 4 sobre 5	Bon pronòstic
LDH	< 500 UI/L	Bon pronòstic
B2M	< 2,4 mg/L	Bon pronòstic
CD 38	Negatiu	Bon pronòstic
ZAP-70	Negatiu	Bon pronòstic
Megàlies abdominals per TC	Absència	Bon pronòstic
> 2 àrees ganglionars per TC	Absència	Bon pronòstic
Cariotip	del 13, +12, cariotip normal	Bon pronòstic
	del 11, del 17	Mal pronòstic
Morfologia limfocitària	Atípica	Mal pronòstic

La distribució de malalts en funció del nombre de factors de risc que van presentar, va ser la següent:

- En el conjunt de la mostra va haver-hi un total de 7 malalts que no van presentar cap factor pronòstic negatiu dels avaluats.
- El nombre de malalts que presentaven 1 o 2 factors pronòstics adversos va ser de 24.

- 6 malalts van presentar 3 o 4 factors pronòstics adversos, 4 era el màxim nombre de factors pronòstics adversos negatius en un mateix malalt, fet que es va detectar en un total de 2 malalts.

Tot seguit es detallaran els resultats obtinguts per a cada un dels diferents factors pronòstics analitzats. Val a dir però que, com s'ha comentat a la introducció, la presència de diferents factors de risc es pot agrupar per formar grups pronòstics. Aquesta valoració, en conjunt, sembla que és de més utilitat que el possible potencial pronòstic d'un únic factor en comparació a un altre (Molica i col·l., 2010).

2.3.1. FACTORS PRONÒSTICS CLÀSSICS

El model d'infiltració limfocitària medul·lar obtingut per mitjà de *biòpsia òssia*, malgrat que està considerat com a marcador pronòstic segons el model d'infiltració medul·lar en què es presenti la malaltia, no va ser valorat al nostre treball perquè aquesta prova no està inclosa en el protocol d'estudi inicial dels pacients afectes d'LLC en estadis inicials del Servei d'Hematologia de l'Hospital Verge de la Cinta, ja que es tracta d'una prova cruenta i invasiva.

Del total de 37 pacients analitzats en l'estudi, cap d'ells va presentar un *temps de duplicació limfocitària* inferior als 12 mesos i no és, doncs, marcador de mal pronòstic en cap dels individus de la mostra.

La *morfologia limfocitària*, valorada per microscòpia òptica, d'extensió de sang perifèrica tenyida amb tinció de May-Grünwald-Giemsa, va presentar característiques atípiques i, per tant, es va considerar com a marcador de mal pronòstic (presència de limfòcits d'aspecte estimulat i prolimfòcits amb xifra superior al 15% del total), en un total de 7 pacients dels 37 de la mostra.

El valor de l'*LDH* va ser superior al rang superior de normalitat en 6 dels pacients analitzats.

2.3.2. NOUS FACTORS PRONÒSTICS

Es va analitzar el valor de la *B2M* en 34 pacients de la mostra. En la resta no es va poder determinar aquest paràmetre.

10 malalts presentaren valors superiors als considerats normals pel nostre laboratori (superior a 2,4 mg/L). Atès que cap pacient de la mostra presentava patologia greu concomitant, incloent insuficiència renal (patologia reconeguda com causant d'elevació de la *B2M*), s'ha d'atribuir aquesta elevació a la mateixa LLC.

Es va realitzar l'*estudi immunofenotípic* a sang perifèrica de 34 pacients de la mostra i es van valorar 5 dels marcadors de l'*score* pronòstic per LLC (positivitat per CD5 i CD23, positivitat dèbil per immunoglobulines de superfície i CD22, i negativitat per FMC7).

Aquest estudi va mostrar que 5 dels pacients presentaren score diagnòstic inferior a 4 (és a dir que sols complien 3 o menys dels 5 marcadors d'aquest score diagnòstic d'LLC). Aquest fet es considera com a marcador pronòstic negatiu, donada la falta de concordança que suposa amb el diagnòstic d'LLC.

Amb el mateix estudi immunofenotípic es va valorar la positivitat de CD38 i de la proteïna ZAP-70 en 32 i 27 pacients de la mostra, respectivament. CD38 va ser positiu en 7 d'aquests pacients, mentre que ZAP-70 ho va ser en un únic malalt, que a la vegada presentava positivitat per CD38.

Amb referència a l'*estudi citogenètic* realitzat en 30 dels 37 pacients, cap d'ells presentava deleció dels cromosomes 11 o 17 (alteracions citogenètiques que confereixen pronòstic advers a la malaltia). 2 pacients presentaven alteracions citogenètiques diferents a les més freqüents en l'LLC, sense tenir aquestes significació pronòstica reconeguda.

El desglossament dels resultats obtinguts amb referència a l'anàlisi citogenètica del grup de pacients amb LLC es troben a la taula següent (taula 32):

Taula 32. Troballes de l'anàlisi citogenètica de la mostra

ALTERACIO GENÈTICA	NOMBRE DE PACIENTS
<i>Cariotip normal</i>	20
<i>Alteracions de bon pronòstic</i>	
del13(q14)	4
+12	4
<i>Alteracions de mal pronòstic</i>	0
Altres alteracions	2

En l'estudi per imatge amb *tomografia computeritzada* dels 37 pacients de la mostra no es varen detectar megàlies abdominals ni afectació de cap àrea ganglionar, a excepció de dos casos en els quals es va evidenciar presència d'hepatomegalia sense esplenomegàlia i un únic pacient amb presència de més de dos àrees ganglionars. Malgrat això, aquests tres pacients es van incloure en l'estudi perquè no tenien cap altra dada més que no els considerés com a estadis inicials d'LLC.

3. DISTRÈS OXIDATIU EN ELS ESTADIS INICIALS D'LLC

3.1. VALORACIÓ GLOBAL DEL DISTRÈS OXIDATIU

S'han realitzat diferents treballs en els quals es mesura el nivell de determinades ERO, així com d'enzims antioxidants en el context de pacients afectes d'LLC i que han rebut tractament o no per aquesta. De manera conjunta, les dades més significatives que ofereixen aquests treballs és la detecció que les cèl·lules d'LLC mostren increment substancial en els nivells de distrès oxidatiu respecte dels limfòcits normals.

Els malalts que han rebut algun tipus de quimioteràpia prèvia exhibeixen nivells més alts d'ERO que els pacients que no han rebut tractament. A més, l'activitat d'enzims antioxidants, principalment intracel·lulars, juga un paper primordial en la carcinogènesi. Es veu augment d'enzims antioxidants en diferents neoplàsies, i es creu que és un mecanisme compensatori a l'elevació del distrès oxidatiu en aquest tipus de malalties, i també en LLC (Zhou i col·l., 2003; Gundogdu i col·l., 2007; Trachootham i col·l., 2008).

Els individus del nostre estudi no presentaven patologies associades, fora de la mateixa LLC, que poguessin fer suposar un major distrès oxidatiu. Els resultats obtinguts en els diferents paràmetres analitzats de distrès oxidatiu en el grup de malalts es mostra a la taula 33.

3.2. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU

El grup de malalts de l'estudi es pot considerar com a homogeni ja que tots els pacients inclosos es trobaven en estadis inicials de la seva malaltia, és a dir, no presentaven ni anèmia (a excepció d'un malalt que tenia valor d'hemoglobina inferior a 10 g/dL) ni trombopènia. No presentaven afectació de més de dues àrees ganglionars (a excepció d'un malalt que tenia afectació de cinc àrees ganglionars) i no presentaven megàlies abdominals.

Els malalts que de manera estricta no complien criteris d'estadis inicials van ser inclosos dintre l'estudi ja que mantenien estables la resta de criteris i no mostraven clínica de malaltia progressiva. Aquests dos malalts no presentaven diferències significatives respecte el nivell de distrès oxidatiu en relació amb la resta de mostra de malalts.

Cap malalt presentava diabetis, tampoc presentaven hepatopatia o insuficiència renal, entitat relacionada àmpliament amb major presència de distrès oxidatiu (Romeu i col·l., 2010).

Els individus del nostre estudi no estaven sotmesos a cap tipus de tractament citostàtic per la seva LLC ni presentaven cap malaltia associada. No obstant això, van presentar un grau de distrès oxidatiu significativament més elevat que els controls en tots els paràmetres valorats en la PDO (taula 33).

Taula 33. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup control i de pacients d'LLC

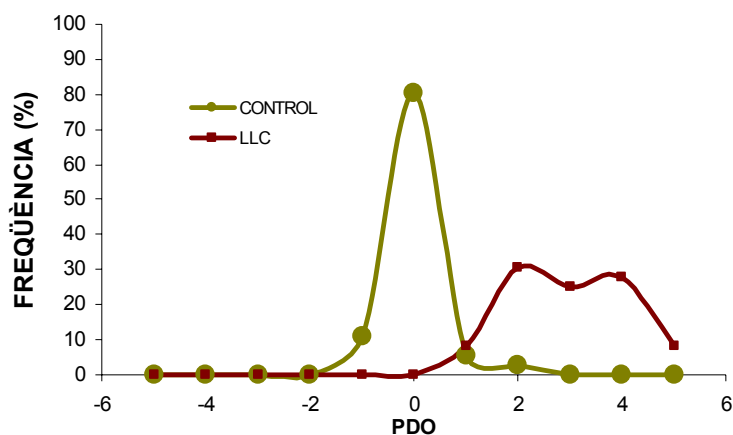
BIOMARCADORS	GRUP CONTROL MITJANA ± DE (n = 37)	GRUP LLC MITJANA ± DE (n = 37)
<i>Eritròcits</i>		
GSH (μmol/g Hb)	4,99 ± 1,57	1,68 ± 1,02 *
GSSG (μmol/g Hb)	0,82 ± 0,38	1,80 ± 0,90 *
GSSG/GSH	0,18 ± 0,11	1,36 ± 1,07 *
TBARSe (nmol/g Hb)	4,41 ± 2,44	3,62 ± 3,40 *
CAT (mmol/min/g Hb)	221,28 ± 38,45	169,39 ± 53,70 *
GPx (μmol/min/g Hb)	27,22 ± 7,93	19,18 ± 5,93 *
GR (μmol/min/g Hb)	3,74 ± 1,40	2,93 ± 2,42*
SOD (U/g Hb)	1739,56 ± 477,92	1030,31 ± 490,58*
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/mL)	21,26 ± 12,51	21,40 ± 15,16
GSSG (nmol/mL)	25,06 ± 6,11	31,93 ± 15,40
GSSG/GSH	1,90 ± 1,63	2,00 ± 1,62
TBARS (nmol/mL)	2,16 ± 1,22	3,32 ± 2,5
PDO	0,00 ± 0,53	2,97 ± 1,13 *
ORAC (μmolTE/mL pl)		31,82 ± 16,8

Mitjanes, desviacions estàndards dels biomarcadors en el grup control sa i de pacients amb estadis inicials d'LLC. La n és el nombre d'individus. * indica diferències significatives ($p < 0,05$) entre el grup control i el grup amb LLC.

3.2.1. VALORACIÓ DE LA PDO

La PDO de la població control presentava una distribució normal centrada en els zero punts (figura 16); en canvi, la distribució de freqüències de la PDO en els estadis inicials de leucèmia limfàtica crònica no seguia una distribució normal sinó que la puntuació es desplaçava molt més cap als valors positius, és a dir, distrès oxidatiu. En la figura següent es mostra gràficament la distribució de freqüències d'ambdós grups.

Figura 16. Distribució de freqüències de PDO



Tots els biomarcadors eritrocitaris van resultar significativament diferents en el grup control i amb LLC. Aquestes diferències es van veure reflectides en una PDO molt superior en els individus amb LLC amb gairebé tres punts més de

distrès oxidatiu. La puntuació global de distrès oxidatiu (PDO) va ser de $0 \pm 0,53$ punts en el grup control i de $2,97 \pm 1,13$ punts en el grup d'LLC.

3.2.2. VALORACIÓ DE LA CAPACITAT ANTIOXIDANT

La capacitat antioxidant mesura la resposta dels sistemes antioxidants, enzimàtics i no enzimàtics, enfront un augment de les ERO (en el nostre cas de radicals peroxils), mitjançant la tècnica de l'ORAC.

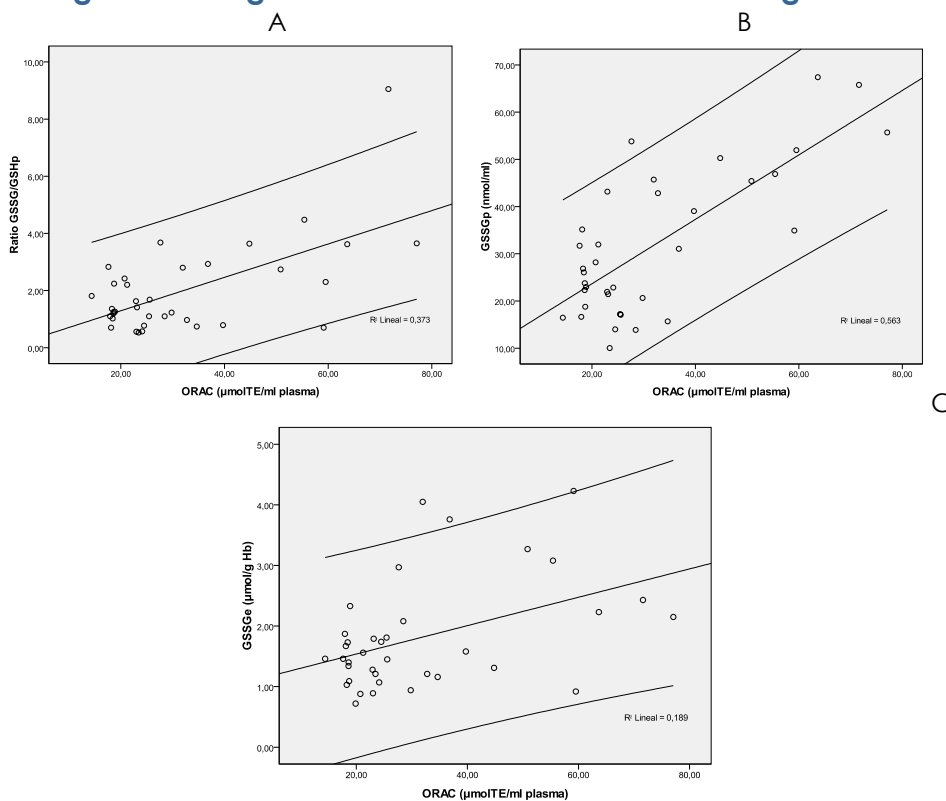
L'ORAC no s'ha inclòs com a biomarcador dins del sistema de valoració global del distrès oxidatiu, ja que es tracta d'un paràmetre de mesura global. En tot cas, l'ORAC podria ser un segon candidat, després de la PDO, a ser utilitzat com a factor pronòstic en l'LLC. Per aquest motiu, i encara que no disposem de valors d'ORAC en el grup control sa, s'han correlacionat els valors d'ORAC amb els biomarcadors de distrès oxidatiu i també amb la PDO dins el grup amb LLC.

Es varen realitzar correlacions entre l'ORAC i la resta de biomarcadors i, de manera significativa, es van evidenciar que:

- Hi ha correlacions positives entre l'ORAC i el valor de TBARS, tant a nivell eritrocitari com a nivell plasmàtic. Per tant, a major concentració de productes de peroxidació lipídica, major resposta de l'organisme de capacitat antioxidant.

- L'ORAC augmenta quan augmenta el GSSG, tant eritrocitari com plasmàtic, i amb la ràtio GSSG/GSH a nivell plasmàtic. La presència majoritària de glutatió en forma oxidada indica estat de distrès oxidatiu, fet que mostra relació amb l'augment de manera paral·lela de l'ORAC com a mecanisme de compensació enfront l'atac radicalar (figura 17).

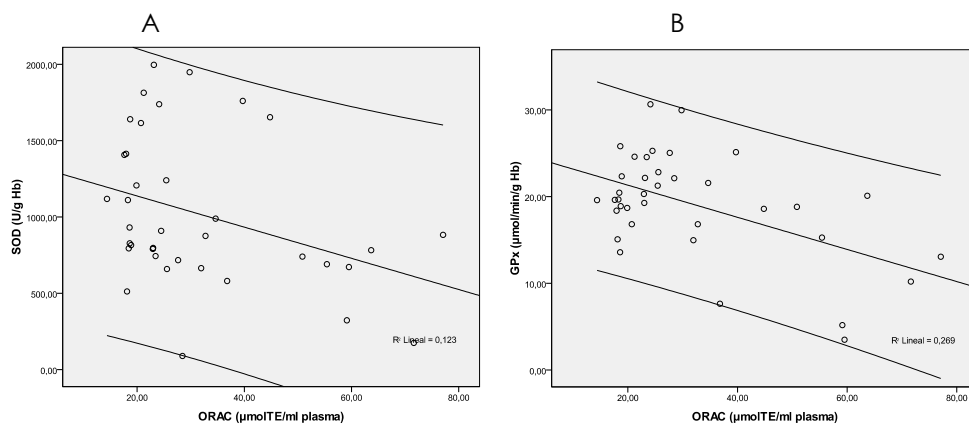
Figura 17. Diagrama de correlacions entre ORAC i glutatió



A. Diagrama de correlacions entre ORAC i ràtio GSSG/GSH plasmàtic;. B. Diagrama de correlacions entre ORAC i GSSG plasmàtic;. C. Diagrama de correlacions entre ORAC i GSSG eritrocitari .

- L'ORAC augmenta quan disminueixen els enzims antioxidants SOD i GPx. Aquest fet és indicatiu dels mateixos resultats anteriors. A major estat oxidatiu, amb disminució del mecanismes enzimàtics de defensa, major compensació de l'organisme en forma d'augment de la capacitat antioxidant (figura 18).

Figura 18. Diagrama de correlacions entre ORAC i SOD, i entre ORAC i GPx



A. Diagrama de correlacions entre ORAC i SOD; B. Diagrama de correlacions entre ORAC i GPx.

- Finalment, l'ORAC augmenta quan augmenta la PDO. Aquest fet reforça la possibilitat d'ús de l'ORAC com a biomarcador de l'estat de la balança prooxidant-antioxidant de l'organisme. Encara cal veure, però, com es comporta el paràmetre en altres situacions fisiològiques i patològiques, i quins són els seus valors en individus control sans.

3.2.3. VALORACIÓ CONJUNTA DELS BIOMARCADORS DE DISTRÈS OXIDATIU

Un cop valorat de manera general el distrès oxidatiu en els estadis inicials d'LLC, vàrem estudiar els paràmetres de manera individual per veure quins eren bons biomarcadors de distrès oxidatiu en aquesta malaltia (taula 33).

Considerats tots els biomarcadors de distrès oxidatiu de manera aïllada, s'evidencia un major estat oxidatiu en cada un dels paràmetres en els individus de la mostra de pacients respecte als individus de la mostra control (taula 33). En la revisió bibliogràfica realitzada en el nostre treball no hem trobat estudis previs que ens siguin d'utilitat per comparar els nostres resultats respecte treballs previs.

- En primer lloc, vàrem veure una alteració del sistema glutatió en eritròcits.

Vàrem observar un augment significatiu del GSSG i de la ràtio GSSG/GSH. A més, el GSH va mostrar una tendència a disminuir, fet que ens va fer pensar en el mal funcionament del sistema de recanvi del GSH en l'eritròcit.

Per tant, els canvis en les concentracions del glutatió reduït i oxidat en l'eritròcit respecte l'eritròcit del malalt amb estadis inicials d'LLC, indiquen que el sistema antioxidant està afectat i que, en conseqüència,

aquests biomarcadors serien bons per confirmar l'existència d'un distrès oxidatiu en malalts amb LLC.

- En el nostre treball, la SOD, la CAT, la GPx i la GR van disminuir significativament en el grup de malalts respecte al grup control.

Aquest fet pot indicar una disminució dels sistemes enzimàtics de defensa antioxidant davant un major distrès oxidatiu aparegut en presència de malaltia, malgrat que aquesta no es trobi en fase de progressió ni en estadis avançats.

- La *lipoperoxidació* és un biomarcador molt utilitzat en treballs que estudien altres patologies com, per exemple, la insuficiència renal. Els nostres resultats indiquen variació en les TBARS en eritròcit i en plasma.

Tot i que en el plasma es veu un cert augment d'aquests productes de la lipoperoxidació, aquest augment no és significatiu ($p = 0,18$). Sorprenentment, l'eritròcit dels pacients amb LLC mostra una disminució significativa de les TBARS (taula 33).

Nourooz-Zadeh (1999) va estudiar el distrès oxidatiu en malalts sotmesos a hemodiàlisi i no sotmesos a hemodiàlisi utilitzant dos biomarcadors, un d'aquests eren les TBARS. Aquests autors no van trobar diferències significatives en aquest indicador entre controls i malalts no sotmesos a hemodiàlisi, ni entre controls i pacients sotmesos a diàlisi. En canvi, un

estudi de Vaziri i col·l. (2003) fet en rates amb IR induïda mostrava un increment significatiu de la lipoperoxidació.

Banni i col·l., (1996) van explicar, en un dels seus treballs, que les tècniques més utilitzades per determinar la lipoperoxidació, les TBARS i els diens conjugats eren els responsables d'aquesta contradicció. Les TBARS mesuren el malondialdehid, però, quan es mesuren en fluids biològics, es poden produir artefactes que ens alterin els resultats, ja que hi ha moltes molècules que també reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric com són els sucres, aminoàcids, prostaglandines, tromboxans, fàrmacs, hemoglobina i la urea. Els diens conjugats tampoc serien uns bons indicadors perquè, segons Banni i col·l., (1996) també poden provenir de la dieta.

Per tant, les TBARS no són un bon biomarcador de distrès oxidatiu per a aquesta malaltia. No hem trobat treballs comparables per a l'LLC als esmentats per a insuficiència renal.

La validesa de les TBARS com a biomarcador ha estat criticada (Lykkesfeldt i col·l., 2007). En aquest sentit, la presència de TBARS en plasma pot ser modificada a conseqüència de la manipulació de la mostra, per exemple, amb l'oxidació d'algunes molècules per part d'enzims endògens presents al plasma. Per aquesta raó, tot i que s'han extremat les precaucions de manipulació i conservació de les mostres,

aquest biomarcador hauria de ser substituït per un altre en la puntuació del distrès oxidatiu.

Possibles candidats a aquesta substitució podrien ser els diens conjugats, l'MDA o els isoprostans. No obstant això, per eliminar completament els artefactes que freqüentment distorsionen els resultats d'aquests biomarcadors, l'anàlisi mitjançant el tàndem cromatografia de gasos i espectrometria de masses (GC/MS) podria ser la solució.

Aquestes tècniques, però, requereixen més temps i recursos a l'hora de dur-les a terme, fet que es contradiu amb l'objectiu d'aquesta tesi, que busca marcadors pronòstic ràpids i fàcilment reproduïbles per a la pràctica clínica.

3.3. DISTRÈS OXIDATIU I FACTORS PRONÒSTICS

Posteriorment es varen buscar correlacions entre els diferents biomarcadors de distrès oxidatiu i els diferents marcadors pronòstics analitzats, per tal de poder pensar si algun d'aquests biomarcadors es podria també incloure com a marcador pronòstic de progressió de malaltia en estadis inicials d'LLC.

3.3.1. PUNTUACIÓ DIAGNÒSTICA D'LLC

En relació amb els grups de puntuació diagnòstica d'LLC per citometria de flux es van dividir els individus de la mostra de malalts en dos grups: per una banda, aquells individus que presentaven un score diagnòstic de 5 sobre 5; i, per l'altra banda, aquells individus amb score diagnòstic inferior a 5. Els resultats dels biomarcadors d'ambdós grups es troben a la taula 34.

No hi ha diferències significatives entre els dos grups d'score i el valor de diferents biomarcadors que indiquen presència de major distrès oxidatiu, però sí que hi ha una tendència a major nivell de TBARS tant eritrocitari com plasmàtic, i disminució del nivell enzimàtic de SOD i GR en el grup de mal pronòstic, és a dir, score < 5.

L'obtenció de tan sols una tendència, sense haver-hi diferències significatives, i el fet que no tots els biomarcadors ens indiquen un major distrès oxidatiu, es

pot deure en gran part al volum reduït d'individus en els dos grups de malalts (score < 5, score = 5).

Taula 34. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons subgrups d'score diagnòstic

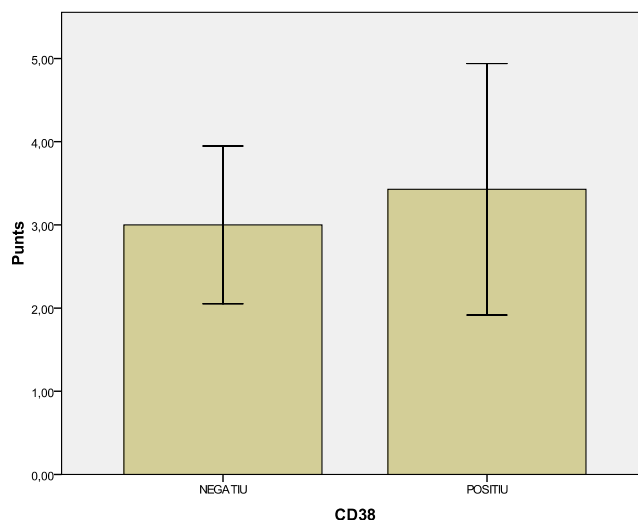
BIOMARCADORS	GRUPS SCORE LLC	
	SCORE LLC < 5 MITJANA ± DE (n = 7)	SCORE LLC = 5 MITJANA ± DE (n = 27)
<i>Eritròcits</i>		
GSH (µmol/g Hb)	1,52 ± 0,47	1,49 ± 0,88
GSSG (µmol/g Hb)	1,40 ± 0,31	1,80 ± 0,93
GSSG/GSH	1,03 ± 0,47	1,51 ± 1,21
TBARS (nmol/g Hb)	3,66 ± 3,47	3,39 ± 3,33
CAT (mmol/min/g Hb)	169,56 ± 73,48	166,16 ± 47,69
GPx (µmol/min/g Hb)	19,38 ± 7,50	19,38 ± 5,69
GR (µmol/min/g Hb)	2,46 ± 1,00	2,94 ± 2,79
SOD (U/g Hb)	1099,54 ± 347,87	1106,17 ± 484,44
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	17,40 ± 4,06	24,09 ± 17,35
GSSG (nmol/ml)	29,23 ± 16,09	32,10 ± 14,16
GSSG/GSH	1,80 ± 1,13	1,79 ± 1,15
TBARS (nmol/ml)	3,42 ± 2,58	3,13 ± 2,43
PDO	2,43 ± 0,53	3,16 ± 1,21
ORAC (µmolTE/mL)	32,16 ± 15,35	30,56 ± 16,85

Mitjanes, desviacions estàndards dels biomarcadors en el grup pacients amb estadis inicials d'LLC dividits segons puntuació score diagnòstic. La n és el nombre d'individus.

3.3.2. CD38

Es va dividir el grup de malalts en funció de si presentaven positivitat o no per CD38. No es varen observar diferències significatives respecte als diferents biomarcadors de distrès oxidatiu, ni tan sols una major tendència a presentar major distrès. De manera puntual sol es va detectar un augment de 0,43 punts en la PDO dels pacients amb CD38 positiu, respecte als pacients amb negativitat per CD38 (figura 19). La baixa mida mostral podria relacionar-se amb la falta d'obtenció de resultats significatius.

Figura 19. PDO dels subgrups d'LLC CD38 negatiu i positiu



Mitjana i desviació estàndard dels valors de PDO en els subgrups d'LLC CD38 negatiu i positiu.

3.3.3.ZAP-70

Igualment, es va separar la mostra de malalts en dos grups, en funció de si presentaven positivitat o no per a ZAP-70. Tan sols un pacient mostrava presència de ZAP-70. Així doncs, els resultats han de ser interpretats amb cautela.

Per veure quines eren les modificacions presents en aquest malalt respecte als altres en els biomarcadors de distrès oxidatiu, es va mesurar el coeficient de variació dels diferents paràmetres d'aquest pacient en relació amb la resta de malalts de la mostra. Els resultats per a aquest factor pronòstic es troben a la taula 35. Veiem que:

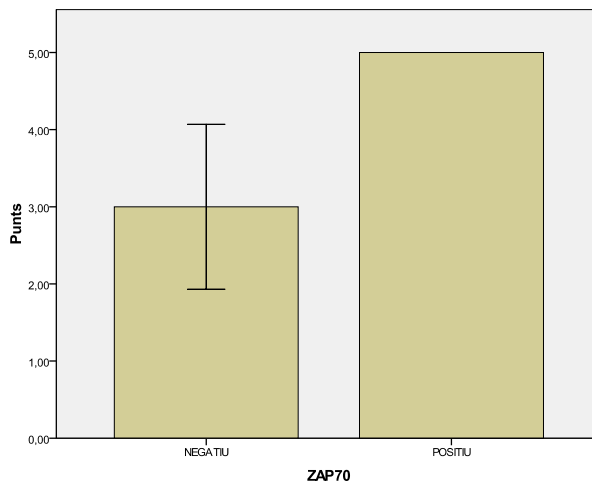
- Molts paràmetres de distrès oxidatiu es troben augmentats (TBARS plasmàtiques, TBARS eritrocitàries, GSSG eritrocitari, ràtio GSSG/GSH eritrocitària, GSSG plasmàtic), així com la PDO global (figura 20).
- Els antioxidants (GSH eritrocitari, SOD, CAT, GR i GPx) es troben disminuïts.
- Contràriament al que s'esperava, el GSH plasmàtic augmenta i la ràtio disminueix.
- L'ORAC augmenta, fet que es troba en consonància amb la correlació positiva trobada entre els punts de distrès oxidatiu i la capacitat antioxidant.

Taula 35. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons subgrups amb ZAP70 negatiu i ZAP70 positiu

BIOMARCADORS	GRUPS ZAP70		% variació
	NEGATIU MITJANA ± DE (n = 24)	POSITIU MITJANA (n = 1)	
<i>Eritròcits</i>			
GSH (µmol/g Hb)	1,36 ± 0,64	0,8	-66,06
GSSG (µmol/g Hb)	1,56 ± 0,76	4,23	63,07
GSSG/GSH	1,45 ± 0,97	5,18	71,96
TBARS (nmol/g Hb)	3,41 ± 3,36	8,1	57,85
CAT (mmol/min/g Hb)	165,17 ± 49,36	69,25	138,52
GPx (µmol/min/g Hb)	19,34 ± 5,57	5,18	-273,37
GR (µmol/min/g Hb)	2,56 ± 1,93	0,48	-434,20
SOD (U/g Hb)	1074,87 ± 404,43	322,98	-232,80
<i>Plasma</i>			
GSH (nmol/mL)	24,08 ± 17,41	49,55	51,40
GSSG (nmol/mL)	32,10 ± 15,32	34,92	8,09
GSSG/GSH	1,79 ± 1,20	0,70	-156,10
TBARS (nmol/mL)	3,09 ± 2,36	7,32	57,84
PDO	3,00 ± 1,07	5,00	40,00
ORAC (µmolTE/mL)	29,52 ± 14,28	59,13	50,08

Mitjanes, desviacions estàndards dels biomarcadors en el grup pacients amb estadis inicials d'LLC dividits segons positivitats o negativitats per a ZAP70. Coeficient de variació de les mitjanes entre els dos grups. La n és el nombre d'individus.

Figura 20. PDO dels subgrups d'LLC ZAP-70 negatiu i positiu



Mitjana i desviació estàndard dels valors de PDO en els subgrups d'LLC ZAP-70 negatiu i positiu.

3.3.4. ALTERACIONS CITOGÈNIQUES

Es va separar el grup de pacients en funció de si presentaven alteracions citogènètiques o no. Es van separar els pacients segons si presentaven un cariotip normal, alteracions citogènètiques de bon pronòstic o alteracions citogènètiques de mal pronòstic, seguint els criteris anomenats en l'apartat de material i mètodes (malgrat que presentar un cariotip normal es considera com a marcador de bon pronòstic en LLC). Tal com era d'esperar, no es van veure diferències significatives ni tendències entre el grup amb cariotip normal i el grup amb alteracions citogènètiques de bon pronòstic (taula 36).

Taula 36. Biomarcadors de distrès oxidatiu en el grup de pacients segons cariotip

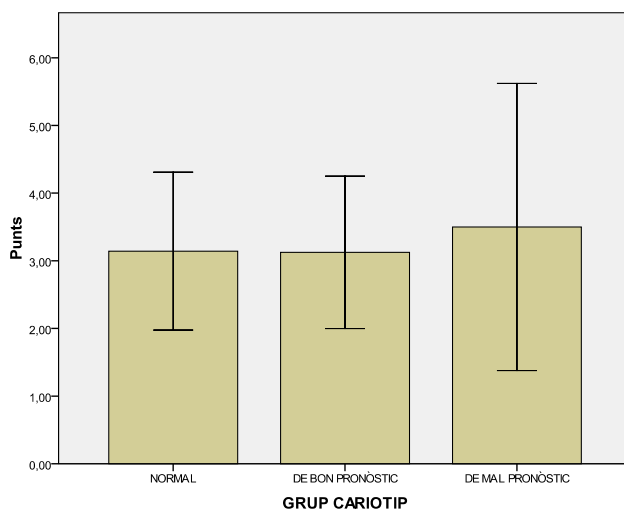
BIOMARCADORS	GRUPS CARIOTIP		
	CARIOTIP NORMAL MITJANA ± DE (n = 15)	CARIOTIP BON PRONÒSTIC MITJANA ± DE (n = 8)	CARIOTIP MAL PRONÒSTIC MITJANA ± DE (n = 2)
Eritròcits			
GSH (µmol/g Hb)	1,62 ± 0,88	1,38 ± 0,63	2,37 ± 0,08
GSSG (µmol/g Hb)	2,00 ± 1,09	1,70 ± 0,56	1,54 ± 0,87
GSSG/GSH	1,59 ± 1,33	1,60 ± 1,04	0,66 ± 0,39
TBARS (nmol/g Hb)	3,92±3,75	3,51±3,22	8,31 ± 0,75
CAT (mmol/min/g Hb)	176,61 ± 53,89	176,56 ± 38,39	73,30 ± 79,15
GPx (µmol/min/g Hb)	18,92 ± 6,04	20,58 ± 4,20	8,29 ± 6,77
GR (µmol/min/g Hb)	3,55 ± 3,32	3,07 ± 1,97	1,89 ± 1,89
SOD (U/g Hb)	963,11± 440,79	1039,34 ± 400,45	777,34 ± 148,91
Plasma			
GSH (nmol/mL)	23,80 ± 19,31	23,31 ± 15,02	18,95 ± 5,20
GSSG (nmol/mL)	30,54 ± 15,29	33,53 ± 14,86	53,82 ± 2,64
GSSG/GSH	1,79 ± 1,22	1,87 ± 1,29	2,98 ± 0,95
TBARS (nmol/mL)	3,53 ± 2,66	3,02 ± 2,47	7,26 ± 0,02
PDO	3,14 ± 1,17	3,13±1,13	3,50±2,12
ORAC (µmolTE/mL plasma)	33,16 ± 16,22	25,25 ± 9,65	68,30 ± 12,42

Mitjanes, desviacions estàndards dels biomarcadors en el grup pacients amb estadis inicials d'LLC dividits segons cariotip (normal, de bon pronòstic o mal pronòstic). La n és el nombre d'individus.

Sols es van trobar alteracions citogenètiques de mal pronòstic en dos pacients i, probablement, per aquest motiu, no es van trobar diferències significatives en els altres dos grups.

Hi ha una lleugera tendència a presentar major grau distrès oxidatiu en els pacients amb cariotip advers respecte als pacients amb cariotip normal o de pronòstic favorable, tal i com podem observar a la figura 21 amb la PDO.

Figura 21. PDO dels subgrups d'LLC segons cariotip



Mitjana i desviació estàndard dels valors de PDO en els subgrups d'LLC segons cariotip.

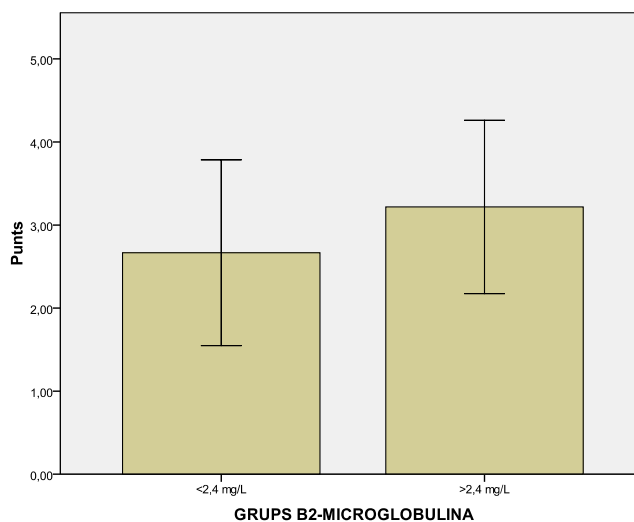
3.3.5.LDH i B2M

Finalment, es varen fer grups amb les variables contínues LDH i B2M. Els resultats dels biomarcadors de distrès oxidatiu en els diferents grups segons l'estat d'LDH i B2M es troben a les taules 37 i 38, respectivament.

Respecte a l'LDH, es varen obtenir resultats contradictoris. Els individus amb mal pronòstic segons l'LDH (valor d'LDH > 500 U/L) presentaven menor puntuació.

Respecte a la B2M, el GSSG eritrocitari era més alt de manera significativa en els pacients amb valors elevats de B2M. La puntuació també tenia tendència a ser més alta en el grup de mal pronòstic en relació amb la B2M, encara que no ho era de manera significativa (figura 22).

Figura 22. PDO dels subgrups d'LLC segons beta-2 microglobulina



Mitjana i desviació estàndard dels valors de PDO en els subgrups d'LLC segons B2M.

Taula 37. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons LDH

BIOMARCADORS	GRUPS LDH	
	LDH < 500 U/L MITJANA ± DE (n = 33)	LDH > 500 U/L MITJANA ± DE (n = 6)
<i>Eritròcits</i>		
GSH (µmol/g Hb)	1,69 ± 1,07	1,64 ± 0,81
GSSG (µmol/g Hb)	1,87 ± 0,94	1,39 ± 0,49
GSSG/GSH	1,39 ± 1,08	1,20 ± 1,06
TBARS (nmol/g Hb)	3,7 ± 3,52	3,12 ± 2,90
CAT (mmol/min/g Hb)	171,24 ± 50,25	159,50 ± 74,44
GPx (µmol/min/g Hb)	19,30 ± 5,59	18,53 ± 8,14
GR (µmol/min/g Hb)	3,06 ± 2,58	2,21 ± 1,06
SOD (U/g Hb)	1055,94 ± 483,87	839,57 ± 550,19
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/mL)	22,34 ± 16,40	16,70 ± 4,26
GSSG (nmol/mL)	33,50 ± 15,21	24,08 ± 15,17
GSSG/GSH	2,11 ± 1,73	1,45 ± 0,75
TBARS (nmol/mL)	3,44 ± 2,55	2,67 ± 2,28
PDO	3,10 ± 1,12	2,33 ± 1,03
ORAC (µmolTE/mL)	32,54 ± 17,16	28,12 ± 15,85

Mitjanes, desviacions estàndards dels biomarcadors en el grup pacients amb estadis inicials d'LLC dividits segons valor d'LDH (U/L). La n és el nombre d'individus.

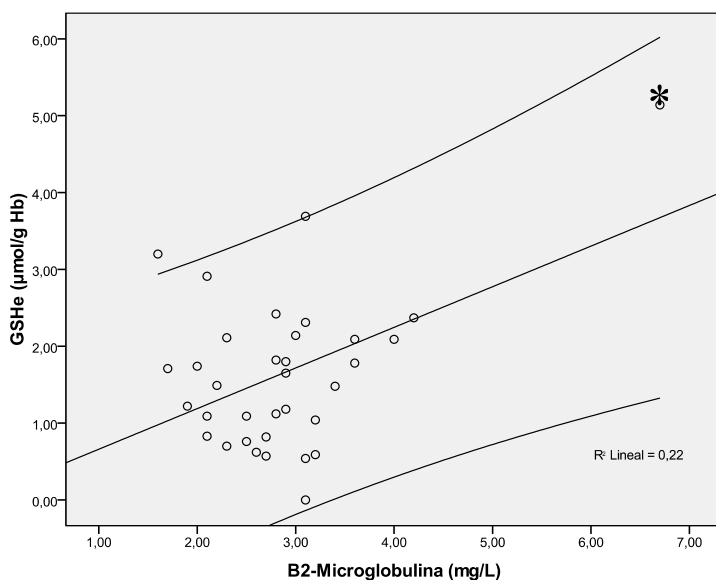
Taula 38. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons B2M

BIOMARCADORS	GRUPS B2M	
	< 2,4 mg/L MITJANA ± DE (n = 10)	> 2,4 mg/L MITJANA ± DE (n = 6)
<i>Eritròcits</i>		
GSH (µmol/g Hb)	1,70 ± 0,84	1,63 ± 1,11
GSSG (µmol/g Hb)	1,59 ± 1,07	1,97 ± 0,86
GSSG/GSH	0,97 ± 0,39	1,56 ± 1,21
TBARS (nmol/g Hb)	3,22 ± 2,98	3,71 ± 3,72
CAT (mmol/min/g Hb)	180,56 ± 50,26	161,53 ± 57,41
GPx (µmol/min/g Hb)	20,42 ± 3,44	17,96 ± 6,58
GR (µmol/min/g Hb)	3,02 ± 2,07	2,99 ± 2,72
SOD (U/g Hb)	990,61 ± 373,26	1004,41 ± 521,34
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/mL)	21,31 ± 21,31	21,88 ± 13,99
GSSG (nmol/mL)	29,80 ± 14,10	33,67 ± 15,98
GSSG/GSH	1,89 ± 1,00	2,11 ± 1,87
TBARS (nmol/mL)	2,78 ± 2,26	3,53 ± 2,66
<i>Punts</i>		
ORAC (µmolTE/mL)	24,37 ± 5,56	35,53 ± 19,79

Mitjanes, desviacions estàndards dels biomarcadors en el grup pacients amb estadis inicials d'LLC dividits segons valor de B2M (mg/L). La n és el nombre d'individus.

També es va veure una correlació positiva entre la B2M i el GSH eritrocitari. La interpretació d'aquest resultat no és del tot clara, ja que s'hauria d'esperar que un augment en els valors de B2M foren acompanyats de presència de marcadors de major estat prooxidant i no a la inversa, com indica el nostre resultat. La presència d'aquesta correlació positiva, es pot deure a la existència d'un individu en la mostra de malalts amb un valor extrem de GSH eritrocitari en comparació a la resta d'individus malalts (figura 23). No obstant això, no hem trobat cap característica diferent en aquest individu que el pogués fer diferent a la resta, i així poder fer una interpretació d'aquestes variacions.

Figura 23. Diagrama de correlacions entre GSH eritrocitari i beta-2 microglobulina



* Valor extrem.

3.3.6. DISTRÈS OXIDATIU I FACTORS DE MAL PRONÒSTIC

En els anteriors apartats, s'ha pogut comprovar que hi ha un grau d'estrès oxidatiu important en els pacients amb LLC. Així, tant els valors de PDO com de la majoria dels biomarcadors analitzats en aquest treball, es troben alterats en l'LLC. Al mateix temps, s'han valorat els diferents factors de mal pronòstic (TDL, morfologia limfocitària, score immunofenotípic, LDH, B2M, CD38, ZAP70, megàlies abdominals, àrees ganglionars afectades per TC i cariotip) en relació amb els biomarcadors de distrès oxidatiu i també amb la PDO.

Per valorar de manera conjunta els factors pronòstic s'ha creat una nova variable que els agrupa i és el *nombre de factors de mal pronòstic* (NFMP) que intenta valorar globalment el mal pronòstic dels pacients amb LLC. Els grups establerts inclouen un grup de pacients sense factors de mal pronòstic, d'1 o 2 factors i de 3 o 4 factors de mal pronòstic. A la taula 39 es descriu, mitjançant freqüències, la relació entre la PDO i l'NFMP.

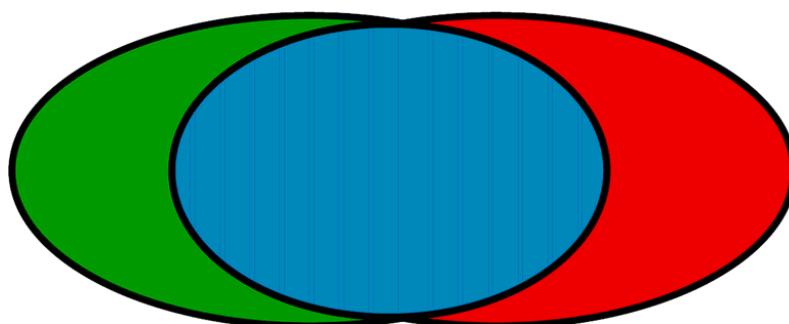
Taula 39. Freqüències d'NFMP en cada una de les PDO obtingudes en els pacients amb LLC

		PDO				
		1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
NFMP	Cap factor de mal pronòstic	66,7		11,1	40	
	1-2 factors de mal pronòstic	33,3	72,7	66,7	60	
	3-4 factors de mal pronòstic		27,3	22,2		100

Percentatges d'individus amb factors de mal pronòstic de cada una de les puntuacions obtingudes.

La distribució de freqüències dels pacients amb LLC insinua una certa tendència a la classificació dels individus en tres grups: un primer grup que inclou individus sense factors de mal pronòstic d'LLC i que tenen puntuacions baixes de distrès oxidatiu, un segon grup amb l'NFMP i la PDO màxims, i un grup intermedi tan pel que fa a l'NFMP com a la PDO. Aquesta distribució dels pacients i la distribució de freqüències de la PDO (figura 16), ens ha portat a pensar en una proposta de model que es representa a la figura següent:

Figura 24. Proposta d'un model d'incorporació de la PDO en els factors pronòstics de l'LLC



- MALALTS AMB BON PRONÒSTIC
PDO 1
- MALALTS AMB PRONÒSTIC INCERT
PDO 2-4
- MALALTS AMB MAL PRONÒSTIC
PDO 5

Com podem observar a la taula 39, tots els pacients que tenen qualificació de PDO màxima, tenen també el màxim nombre de factors de mal pronòstic. Aquest grup amb PDO de 5 punts correspon a tres pacients, i els biomarcadors que contribueixen a la PDO són el GSH, GSSG, GSSG/GSH eritrocitari i la CAT en tots ells, i els TBARS plasmàtiques i la GR en dos dels tres individus.

El nivell de distrès oxidatiu de cada un dels grups que genera la variable NFMP es resumeix a la taula 40. Com podem observar, la majoria dels biomarcadors de distrès oxidatiu, i també la PDO, tenen valors indicatius de major distrès oxidatiu en el grup de 3-4 factors de mal pronòstic. Es desmarquen d'aquesta tendència els glutatons a nivell plasmàtic, que tenen un comportament contrari a l'esperat, tal com ja hem comentat amb anterioritat.

Taula 40. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup de pacients segons NFMP

BIOMARCADORS	NFMP		
	CAP FMP MITJANA ± DE (n = 8)	1-2 FMP MITJANA ± DE (n = 22)	3-4 FMP MITJANA ± DE (n = 8)
<i>Eritròcits</i>			
GSH (µmol/g Hb)	1,85 ± 1,08	1,69 ± 1,12	1,48 ± 0,68
GSSG (µmol/g Hb)	1,78 ± 1,15	1,75 ± 0,80	1,96 ± 1
GSSG/GSH	1,21 ± 0,82	1,25 ± 0,92	1,81 ± 1,59
TBARS (nmol/g Hb)	3,44 ± 3,34	3,54 ± 3,51	4,02 ± 3,58
CAT (mmol/min/g Hb)	175,5 ± 50,22	176,7 ± 43,28	143,15 ± 78,11
GPx (µmol/min/g Hb)	21,39 ± 4,56	19,46 ± 5,02	16,21 ± 8,58
GR (µmol/min/g Hb)	2,91 ± 2,48	3,22 ± 2,73	2,14 ± 1,17
SOD (U/g Hb)	1052,6 ± 496,3	1141,31 ± 483,22	702,74 ± 404,17
<i>Plasma</i>			
GSH (nmol/mL)	15,01 ± 5,57	22,2 ± 16,88	24,86 ± 15,89
GSSG (nmol/mL)	29,15 ± 14,55	32,6 ± 16,23	32,63 ± 15,56
GSSG/GSH	2,04 ± 0,94	2,12 ± 1,96	1,66 ± 1,12
TBARS (nmol/mL)	3,16 ± 2,4	3,2 ± 2,49	3,81 ± 2,88
PDO	3 ± 1,41	2,81 ± 0,93	3,38 ± 1,41
ORAC (µmolTE/mL)	24,36 ± 5,19	32,35 ± 16,37	37,88 ± 23,59

Mitjanes, desviacions estàndards dels biomarcadors en el grup pacients amb estadis inicials d'LLC dividits segons NFMP (cap, 1-2 factors o 3-4 factors). La n és el nombre d'individus.

DISCUSSION

DISCUSSIÓ

L'LLC és el tipus de leucèmia amb major prevalença als països occidentals. Es presenta, generalment, en persones d'edat adulta i la seva incidència augmenta amb l'edat (5 casos per 100.000 en persones de més de 50 anys i 30 casos per 100.000 en persones de més de 80). La seva forma de presentació en la majoria dels casos, és per troballa analítica de rutina i, en aquell moment, la majoria de pacients es troben en estadis inicials de la malaltia en els quals no hi ha necessitat d'inici de tractament.

Hi ha factors pronòstics reconeguts, tant clàssics com nous, que intenten preveure el risc de mala progressió de la leucèmia limfàtica crònica i la necessitat futura de tractament. No obstant això, encara no hi ha evidències suficients per poder iniciar un tractament en estadis inicials que es basen en la presència de factors pronòstics adversos. Segons el protocol d'actuació en clínica, la presència de factors pronòstics negatius de forma aïllada no pot condicionar la decisió d'iniciar un tractament citostàtic per a la malaltia. Actualment però, sembla que s'intueix que la presentació de manera conjunta de diferents factors pronòstics adversos en estadis inicials de la malaltia deriva cap a una pitjor progressió del pacient (Gribben 2010). Per tant, aquest fet ens fa plantejar la necessitat d'anticipar-nos a la progressió de la malaltia i iniciar de manera precoç, el tractament més adient.

La incidència del distrès oxidatiu sobre la salut dels individus és indubtable i, per tant, és important disposar de tècniques de rutina per valorar directament o indirectament la quantitat d'ERO produïdes i determinar l'activitat, la disponibilitat i l'efectivitat dels sistemes protectors anti-ERO. La valoració puntual d'un biomarcador lligat al distrès oxidatiu resulta insuficient per determinar l'estat del balanç antioxidant-prooxidant en situació normal o patològica, i ens aporta molt poca informació d'on està localitzat el *desequilibri*. També cal considerar que hi ha una defensa primària i secundària enfront els radicals lliures. Aquest fet pot explicar que l'augment d'un enzim o sistema antioxidant impliqui, a vegades, una bona protecció, (*defensa primària*), i altres cops evidenciï un excés de radicals que es tradueix en una sobreproducció d'antioxidants, (*defensa secundària* o de resposta). De la mateixa manera, la disminució dels sistemes de protecció pot ser deguda al fet que no són necessaris, o a que els sistemes secundaris no s'activen, o a una disfunció en la seva producció, fet que conduiria a l'organisme a tenir estrès oxidatiu. D'una banda, si determinem només un biomarcador de distrès oxidatiu la interpretació dels resultats es faria molt difícil, i, de l'altra, la interpretació per part del clínic de múltiples biomarcadors resulta complexa. Un solució a aquest problema és simplificar la interpretació dels resultats mitjançant la utilització d'un sistema de puntuació que inclogui múltiples biomarcadors afegint objectivitat als resultats.

Aquest treball proposa la valoració precoç del distrès oxidatiu en els individus que es troben en estadis inicials d'LLC per intentar ampliar la informació que s'obté en aquell moment i ajudar, d'aquesta manera, a la decisió d'iniciar o no tractament citostàtic precoç per la malaltia, anticipant-se a la probabilitat de progressió de la mateixa.

D'entrada, vàrem definir les característiques de la població de pacients diagnosticats d'LLC en estadis inicials en el nostre àmbit i vàrem determinar-ne les característiques demogràfiques i la presència, en aquesta població, dels paràmetres pronòstics reconeguts per a la malaltia.

La mostra de pacients era representativa de la població amb LLC en estadis inicials, ja que presentava les característiques generals definides per aquesta població. Els pacients tenien una edat mitjana avançada, 75 anys (amb valors d'edat extrems compresos entre els 54 i 90 anys), i no hi havia un predomini clar de gènere (20 dones, 17 homes). Durant el seguiment realitzat (76 mesos de mitjana, incloent el període des del reclutament fins la redacció d'aquest treball) cap dels pacients va mostrar progressió de la malaltia a estadis més avançats.

Els factors pronòstics analitzats inicialment en la nostra mostra van ser: TDL, morfologia limfocitària, score immunofenotípic, LDH, B2M, CD38, ZAP-70, TC toraco-abdomino-pèlvic, i cariotip. Un cop analitzats els resultats vàrem concloure que el 18,91% dels malalts no presentaven cap factor pronòstic

advers, el 64,86% presentaven un o dos factors adversos i el 16,21% presentaven tres o quatre factors adversos, i quatre era el nombre màxim de factors pronòstics adversos detectats en un mateix pacient. En un treball recent del grup italià d'estudi de limfomes es va valorar la incidència dels factors pronòstics clàssics i nous i es van combinar per obtenir un nou índex pronòstic. A diferència de la nostra mostra, el 58% dels pacients presentaven entre tres i quatre factors pronòstics adversos (Molica i col·l., 2010). En el nostre estudi, tots els pacients que presenten la màxima puntuació de PDO pertanyen al grup de pacients amb la màxima presència de factors pronòstics adversos.

Per determinar el nivell de distrès oxidatiu de la mostra de pacients amb LLC i d'una mostra d'individus control sans amb característiques similars de nombre, edat i sexe, vàrem aplicar el mètode de puntuació del distrès oxidatiu (PDO) definit per Romeu i col·l. (2010). Els biomarcadors que s'inclouen a la PDO són: GSH i GSSG eritrocitari, TBARS eritrocitàries, CAT, GPx, GR i SOD. A més, es va valorar l'ORAC en els individus amb LLC. La PDO valora simultàniament diversos biomarcadors, fet que proporciona una valuosa informació sobre el balanç oxidatiu global de l'individu. Romeu i col·l., (2010) amb la determinació de la PDO, van obtenir una nova variable que dóna el grau de distrès oxidatiu i permet saber o entendre, d'una manera ràpida, quin és el pes del distrès oxidatiu en el grup de malalts estudiats sense necessitat de conèixer dades més complexes de tots els biomarcadors i el paper que juguen en la cèl·lula. La PDO és un paràmetre que es pot aplicar a la clínica, és fàcilment utilitzable i

compleix els principis per poder ser transferida de l'àmbit de la recerca bàsica a la clínica.

La PDO dels individus control va mostrar una distribució normal centrada en el punt zero, fet indicador d'una no-alteració del balanç antioxidant-prooxidant. Com s'observa en els resultats de la investigació, la població amb estadis inicials d'LLC mostrava un grau de distrès oxidatiu significativament superior a la població control.

La mitjana de la puntuació en pacients amb estadis inicials d'LLC és de 2,97 punts. No obstant això, no tots els malalts de la població mostraven el mateix perfil de distrès oxidatiu, igual que no tots els controls estaven situats a zero (figura 19). Aquesta variabilitat intraindividual posa en evidència, una vegada més, la complexitat de tot aquest sistema, que pot estar influenciat per multitud de factors genètics, metabòlics i ambientals (Giustarini i col·l., 2009; Stephensi col·l., 2009). Malgrat això, la valoració global del distrès oxidatiu que ens ofereix la PDO ha permès que puguem diferenciar de manera evident les dues poblacions en funció del nivell de distrès oxidatiu i això la fa vàlida per ser utilitzada en altres patologies, en tractaments farmacològics i situacions fisiològiques.

Els estudis que es basen amb un sol paràmetre no poden concretar la causa del desequilibri que ha provocat la situació final de distrès oxidatiu i, per tant, és més difícil determinar la manera de corregir el desequilibri. En el nostre

estudi, els resultats de la PDO en els estadis inicials d'LLC indicaven clarament la presència d'estrès oxidatiu, no obstant això, les TBARS en plasma augmentaven però no de forma significativa i les TBARS eritrocitàries fins i tot disminuïen en el grup de pacients. Per tant, si haguéssim valorat només aquest biomarcador, haguéssim arribat a unes conclusions errònies, o, si més no, diferents.

Els controls rutinaris dels individus diagnosticats d'LLC en estadis inicials inclouen un conjunt de dades clíniques (avaluació de l'estat general, febre, astènia, síndrome tòxica, creixement d'adenopaties) i analítiques (temps de duplicació limfocitària < 12 mesos, anemització i plaquetopènia, LDH i B2M). L'estudi conjunt d'aquestes dades determina si hi ha indicis de progressió en la malaltia. La dada analítica de la PDO només s'ha obtingut en un punt de mostreig, no obstant això, d'acord amb base els resultats obtinguts en aquest treball, la inclusió de la PDO dins el paquet de controls analítics rutinaris ens permetria veure la progressió del distrès oxidatiu en aquests malalts i determinar, amb major precisió, la progressió de la malaltia.

La prevalença estimada a partir del nostre treball d'LLC a les Terres de l'Ebre (comarques del Baix Ebre, del Montsià, de la Ribera d'Ebre i de la Terra Alta), partint d'una població aproximada de 172.000 habitants, és d'aproximadament uns 110 casos, que són els pacients controlats a les nostres consultes (encara que la incidència és més gran per no tenir en consideració en aquestes xifres pacients no controlats o controlats en altres centres).

Les dificultats per reclutar pacients en el nostre estudi ha fet que el nombre total d'individus analitzats no sigui gaire nombrós, aquest inconvenient origina que els tests estadístics aplicats perdin potència i, per tant, en molts casos no s'obtenen resultats amb marcada significació estadística. Proporcionalment, però, no sembla ser un nombre de pacients reclutats del tot reduït en comparació amb altres estudis amb una població més àmplia i un període de reclutament molt més llarg (Wierda i col·l., 2007; Molica i col·l., 2010).

De totes maneres, molts dels biomarcadors relacionats amb el distrès oxidatiu analitzats i la PDO han mostrat diferències significatives entre els individus sans i els pacients amb LLC. En el mateix sentit, també s'han observat tendències interessants en fer-se correlacions entre els diferents factors de mal pronòstic estudiats i els diferents marcadors de distrès oxidatiu. La interpretació d'aquestes tendències es podria resumir de manera que els diferents marcadors de distrès oxidatiu van en concordança amb la presència de marcadors de mal pronòstic de la malaltia.

Per poder incorporar la PDO com a factor pronòstic d'LLC caldria, en primer lloc, augmentar el nombre de malalts inclosos en l'estudi, i, en segon lloc, fer el seguiment dels malalts al llarg del temps. Aquest últim plantejament ens permetria veure quina és l'evolució real dels individus i comprobar si el "mal/bon pronòstic" en cada un dels malalts concorda amb el que ha succeït realment.

En el nostre treball, hem utilitzat l'NFMP com a variable que engloba tots els factors de mal pronòstic que s'utilitzen a la pràctica clínica actualment. Els avantatges de tenir només un valor són òbvies des del punt de vista de facilitar la interpretació dels resultats. És per això que altres autors (Molica i col·l., 2010) també proposen un índex pronòstic global per als pacients amb LLC en estadis inicials. L'avantatge de l'índex de Molica és que no és només la suma de l'aparició/no aparició de cada factor pronòstic, sinó que valora el pes de cada un dels factors pronòstic en una equació final. No obstant això, l'índex proposat per aquests autors no preveu, però, cap paràmetre relacionat amb el distrès oxidatiu.

Com ja hem dit, els pacients amb LLC van presentar un grau de distrès significativament més elevat que els controls en tots els paràmetres valorats en la puntuació de distrès, aquest fet es considera atribuïble únicament a la mateixa LLC, ja que cap dels individus presentava malaltia concomitant, i no havia rebut tractaments per a la malaltia que poguessin fer suposar un major distrès oxidatiu. Aquestes diferències es veuen reflectides en una PDO molt superior en els individus amb LLC, amb gairebé tres punts més de distrès oxidatiu.

Tal com han conclòs recentment Romeu i col·l., (2010) en el seu treball, quan es vulgui determinar la relació dels RLLO amb diferents situacions patològiques, o fins i tot fisiològiques com en l'envelliment, no ens podem quedar centrats en determinar només l'augment de la producció dels RLLO, o només la resposta

antioxidant, sinó que hem de valorar de manera global l'estat d'equilibri entre la formació de RLLO i els sistemes defensius, és a dir, el grau de distrès oxidatiu. L'obtenció de la PDO té un alt grau d'aplicabilitat clínica, ja que són proves que parteixen d'una mostra de sang venosa, de fàcil obtenció, i d'uns requeriments tècnics no molt sofisticats. No obstant això, pensem que s'hauria de definir clarament on?, quan?, què? i com?, fer els estudis de distrès oxidatiu per obtenir una valoració global com la nostra PDO.

En resum, l'estudi de la PDO pot ser útil en pacients amb estadis inicials d'LLC per les raons següents:

1. Per informar de l'estat de la balança prooxidant-antioxidant en qualsevol moment de la malaltia.
2. Com una nova variable d'informació de grau de distrès oxidatiu en els controls rutinaris d'LLC.
3. Per diferenciar poblacions segons presència de factors pronòstics o no.
4. Per poder donar informació sobre possibilitat de tractament citostàtic posterior, tenint en compte que algun d'aquests utilitzen la via dels radicals lliures com a mecanisme d'acció.

L'anàlisi dels biomarcadors de manera individual en la població d'estudi ens ha permès veure quins són els que aporten més informació. Hem estudiat biomarcadors de categories diferents segons Dotan i col·l., (2004):

determinació d'inhibidors (antioxidants de baix pes molecular, enzims i macromolècules) i determinació dels productes de la peroxidació.

Hi ha variacions en els malalts en LLC en el sistema glutatió eritrocitari, amb augment significatiu del GSSG i de la ràtio GSSG/GSH, i amb una tendència no significativa a la disminució de GSH. Aquests biomarcadors serien eficients per confirmar l'existència de distrès oxidatiu en malalts amb LLC en estadis inicials i que no han rebut tractament per a la seva malaltia. El GSH és un biomarcador important del distrès oxidatiu, i els seus resultats en plasma ens poden donar informació; tot i així, no creiem adient incloure'l en l'estudi de la PDO, ja que hem trobat molts resultats contradictoris en la bibliografia. Per això, com ja s'ha comentat anteriorment, el GSH, GSSG i GSSG/GSH en plasma no s'han tingut en compte a l'hora de puntuar el distrès oxidatiu. Per determinar la peroxidació proteica, el més correcte seria poder tenir un biomarcador específic. No obstant això, Dotan i col.l., (2004) presenten el GSSG com a biomarcador del dany oxidatiu a pèptids. El GSSG és un dels biomarcadors, juntament amb el GSSG/GSH, que més informació de l'estat de distrès oxidatiu ens ha proporcionat. A més, Griffiths i col.l. (2002), que estudien quins són els biomarcadors més recomanables per a l'estudi del di strès oxidatiu, presenten el GSSG com un bon biomarcador.

Dins els enzims i macromolècules inhibidors de l'oxidació, hem vist diferències significatives en tots els biomarcadors estudiats. Els enzims de defensa antioxidant -SOD, CAT, GPx i GR- es troben disminuïts en el grup de malalts.

En l'estudi dels productes de peroxidació, les TBARS només augmenten, i de manera no significativa, a nivell plasmàtic. A més, sorprenentment, hi ha una disminució significativa de les TBARS eritrocitàries. De totes maneres, en dividir la població de l'estudi segons si presenten marcadors de bon o mal pronòstic per als diferents factors estudiats, les TBARS mostren augment en els grups de pacients amb factors de pronòstic advers, com es veu en els dos individus que presenten cariotip de mal pronòstic (TBARS eritrocitàries de 8,31 nmol/gHb), enfront als individus amb cariotip de bon pronòstic i normal (TBARS 3,51 nmol/gHb i 3,92 nmol/gHb, respectivament). Es comporta de manera similar a nivell plasmàtic (taula 36). El mateix succeeix en el cas de ZAP-70 i B2M (taula 35 i taula 38).

L'estudi de la capacitat antioxidant mitjançant la tècnica de l'ORAC en els individus de la mostra de malalts evidencia que a major distrès oxidatiu l'organisme reacciona amb una major capacitat antioxidant. Aquest fet es veu reflectit amb l'evidència de les correlacions positives obtingudes entre ORAC i TBARS, ORAC i glutatió en forma oxidada i de les correlacions negatives entre ORAC i els enzims antioxidants SOD i GPx. Finalment, l'ORAC també presenta correlacions positives amb la PDO, fet que reforça la possibilitat d'ús de l'ORAC com a biomarcador de l'estat prooxidant-antioxidant de l'organisme.

En darrer lloc, varem estudiar la relació entre cada un dels biomarcadors de distrès oxidatiu i els diferents marcadors pronòstics d'LLC analitzats per valorar

si hi ha algun marcador pronòstic que es relacioni i sigui reflex del dany oxidatiu o de la capacitat antioxidant. Per dur a terme aquesta anàlisi, els individus amb LLC es van classificar en grups segons si tenia o no el marcador pronòstic estudiat alterat. No es van obtenir diferències estadísticament significatives, no obstant això, vàrem obtenir interessants tendències que donen suport a la idea que la presència d'un determinat factor pronòstic negatiu es relaciona amb major distrès oxidatiu:

- La falta de puntuació completa en l'score immunofenotípic diagnòstic es relaciona amb major nivell de TBARS i amb disminució del nivell enzimàtic de SOD i GR.
- Hi ha un augment de 0,43 punts en la PDO de malalts que presenten CD38 respecte a malalts que no tenen aquest marcador pronòstic, sense observar diferències significatives respecte als diferents marcadors de distrès oxidatiu.
- Sols hi havia un malalt amb positivitat per a ZAP-70, fet que no ha fet possible obtenir conclusions ni correlacions respecte a aquest marcador. Malgrat això, en el malalt amb ZAP-70 positiu, molts paràmetres de distrès oxidatiu es trobaven augmentats, així com la PDO global.
- D'acord amb la valoració de la PDO, hi ha una lleugera tendència a presentar major grau de distrès oxidatiu en els pacients amb cariotip advers respecte als pacients amb cariotip normal o favorable.
- Pel que fa a l'LDH, es varen obtenir resultats contradictoris. Els individus amb valors elevats d'LDH presentaven menor puntuació, mentre que pel

que fa a B2M, el GSSG eritrocitari era més alt de forma significativa en els pacients amb B2M elevada. La puntuació també tenia tendència a ser més elevada en el grup de mal pronòstic (encara que no de manera significativa).

En definitiva, els resultats del nostre treball no són suficientment robustos per a permetre proposar un determinat biomarcador de distrès oxidatiu com a factor pronòstic en pacients amb estadis inicials d'LLC. De la mateixa manera, no podem establir clarament la relació entre els diferents biomarcadors de distrès oxidatiu amb els factors pronòstics coneguts. Aquest fet es pot deure, en gran part, a que la mostra dels subgrups de malalts analitzats va ser molt petita i caldrà treballar en aquest sentit per obtenir un major nombre de casos en el futur. Els resultats de la PDO recolzen la hipòtesi plantejada en aquest treball; per tant, aquesta podria ser la futura línia d'investigació.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. S'han establert les determinacions de les variables demogràfiques i dels factors de risc pronòstic, tant clàssics com nous, en la població de pacients diagnosticats d'estadis inicials d'LLC de la zona geogràfica de l'estudi.
2. En els pacients amb estadis inicials d'LLC els biomarcadors que indiquen d'una manera més clara el distrès oxidatiu són els que es relacionen amb el sistema glutatió (GSH, GSSG, GSSG/GSH en eritròcits i plasma).
3. Els enzims antioxidants que més informació ens donen són la GR, la SOD i la CAT, que es troben disminuïts de manera significativa respecte de la població control.
4. Les TBARS ofereixen resultats contradictoris i no concloents quan s'estudien de manera conjunta en tota la població d'estudi, tot i que presenten tendència a augmentar quan s'estudien en relació amb el mal pronòstic dels diferents marcadors.
5. Els individus en estadis inicials d'LLC presenten major grau de distrès oxidatiu en tots els biomarcadors analitzats. No obstant

això, el grau de dispersió dels valors d'aquests biomarcadors és molt gran.

6. Hi ha una certa relació positiva entre els biomarcadors de distrès oxidatiu i la majoria de factors pronòstics reconeguts per l'LLC. La presència de factors pronòstics negatius confereix major distrès oxidatiu que la seva absència.
7. En individus control, la Puntuació del Distrès Oxidatiu (PDO) se situa al voltant de zero. Els pacients amb LLC en estadis inicials de la malaltia tenen valors de PDO situats d'entre 1 a 5 punts.
8. La informació obtinguda a partir de la PDO és més acurada que la que s'obté amb cada un dels biomarcadors estudiats de manera individual i representa amb més exactitud l'estat de la balança prooxidant-antioxidant de l'individu.
9. La PDO és un possible paràmetre clínic a tenir en compte a l'hora d'avaluar el distrès oxidatiu de manera rutinària i individual, i la seva aplicació és possible en el context de la malaltia de pacients en estadis inicials d'LLC. Si bé no hi ha prou dades com per considerar-la com a marcador pronòstic de la malaltia, si es veu relacionada amb la presència d'altres factors pronòstics negatius.

La informació que aporta el mètode obre la porta a una possible prescripció de teràpia antioxidant, ja sigui de tipus farmacològic o de tipus dietètic en pacients amb estadis inicials d'LLC que presentin marcadors pronòstics adversos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306(1-2):1-17.
- Alberg A. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology*. 2002; 180(2):121-37.
- Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(3):463-499.
- Anderson KM, Ells G, Bonomi P i col-l. Free radical spin traps as adjuncts for the prevention and treatment of disease. *Med Hypotheses* 1999; 52(1):53-57.
- Arguelles S, Garcia S, Maldonado M i col-l. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta* 2004; 1674(3):251-259.
- Axelrod M, Serafin D, Klizman B. Ultraviolet light and free radicals: an immunologic theory of epidermal carcinogenesis. *Plast Reconstr Surg* 1990; 86(3):582-593.
- Bakan N, Taysi S, Yilmaz O i col-l. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Chim Acta* 2003; 338(1-2):143-149.
- Bancos S, Bagloge C, Rhaman I i col-l. Induction oh heme oxygenase-1 in normal and malignant B lymphocytes by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 requires Nrf2. *Cel. Immunol* 2010 (262): 18-27.

- Barcellini W, Capalbo S, Mauro FR i col-l. Relationship between autoimmune phenomena and disease stage and therapy in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91(11):1689-1692.
- Battisti V, Maders LD, Bagatini MD i col-l. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem*. 2008; 41(7-8):511-518.
- Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 1993; 14(6):615-631.
- Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J. Oxidative stress peripheral parameters in Graves' disease: the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy. *Clin Biochem* 2005; 38(1):13-18.
- Bela P, Bahl R, Sane AS i col-l. Oxidative stress status: possible guideline for clinical management of critically ill patients. *Panminerva Med* 2001; 43(1):27-31.
- Benzie IF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 136(1):113-126.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G i col-l. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48:198-206.
- Bosch F, Villamor N. ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: a new parameter for an old disease. *Haematologica* 2003; 88(7):724-726.
- Boutron I, Moher D, Altman DG i col-l. Extending the CONSORT statement to randomized trials of

- nonpharmacologic treatment: explanation and elaboration. *Ann Intern Med* 2008; 148: 295-309.
- Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm* 2005; 46(1): 85-95.
- Bowen D, Call TG, Shanafelt TD i col-l. Treatment of autoimmune cytopenia complicating progressive chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone. *Lek Lymphoma* 2010; in press.
- Bruey JM, Katarjian H, Ma W i col-l. Circulating Ki-67 index in plasma as a biomarker and prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 2010; in press, doi:10.1016/j.leukres.2010.03.010.
- Brugiatelli M, Bandini G, Barosi G i col-l. Management of chronic lymphocytic leukemia: practice guidelines from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 2006; 91(11):1662-1673.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
- Buggins AGS, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia Research* 2010; 34(7): 837-842.
- Bureau A, Lahet JJ, Lenfant Fi col-l. Optimization of a model of red blood cells for the study of antioxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(7):341-344.

- Butler T, Gribben JG. Biologic and clinical significance of molecular profiling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood reviews* 2010; 24:135-141.
- Byrd JC, Lin TS, Dalton JT i col-l. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109(2):399-404.
- Cao G, Booth SL, Sadowski JA i col-l. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(5):1081-1087.
- Carew JS, Zhou Y, Albitar M i col-l. Mitochondrial DNA mutations in primary leukaemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. *Leukemia* 2003; 17: 1437-1447.
- Carew JS, Nawrocki ST, Xu RH i col-l. Increased mitochondrial biogenesis in primary leukemia cells: the role of endogenous nitric oxide and impact on sensitivity to fludarabina. *Leukemia* 2004; 18(12):1934-1940.
- Carlucci F, Marinello E, Tommassini V, i col-l. A 57-gene expression signature in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pharmacol* 2009; 63:663-71.
- Caron J, Krull K, Hockenberry M i col-l. Oxidative stress and executive functions in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53:551-556.
- Cathcart R, Schwiens E, Saul RL i col-l. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a

- possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(18):5633-5637.
- Catosvsky D, Richards S, Matutes E. i col-l. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with CLL (the LRF CLL4 Trial). *Lancet* 2007; 370(9583):230-239.
- Hillmen P. Early results from LRF CLL4: A UK multicenter randomized trial. Oral session, Abstract#716. *ASH 2005. Blood* 2005; 106 (11).
- Cerne D, Lukac-Bajalo J. Oxidative stress assays for disease risk stratification. *Acta Pharm.* 2006; 56:1-17.
- Chandra J, Hackbarth J, Le S i col-l. Involvement of reactive oxygen species in adaphostin-induced cytotoxicity in human leukemia cells. *Blood* 2003; 102(13): 4512-4519.
- Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res* 1979; 29:175-274.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49 (3): 481-493.
- Cheng Z, Yan G, Li Y i col-l. Determination of antioxidant activity of phenolic antioxidants in a Fenton-type reaction system by chemiluminescence assay. *Anal Bioanal Chem* 2003; 375(3):376-380.
- Chenson B, Bennett JM, Grever M i col-l. National Cancer Institute-Sponsored Working Group Guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and

- treatment. *Blood* 1996; 87(12): 4990-4997.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *NEJM* 2005; 352(8):804-815.
- Chiorazzi N, Ferrarini M. Evolving view of the *in-vivo* kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 512:273-278.
- Clements JE, Anderson BB. Glutathione reductase activity and pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase activity in the red cell. *Biochim Biophys Acta* 1980; 632(2):159-163.
- Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 1970; 34: 30-38.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329(1-2): 23-38.
- Dansen TB, Wirtz KW. The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 2001; 51 (4):223-230.
- Day BJ. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug Discov Today* 2004; 9(13):557-566.
- Deleve LD, Kaplowitz N. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin Liver Dis* 1990; 10 (4): 251-266.
- De Paulet AC. Free radicals and aging. *Ann Biol Clin* 1990; 48(5):323-330.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *NEJM* 2000; 343(26): 1910-1916.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be

- used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43(3):200-227.
- Elter T, Borcman P, Schulz H i col-l. Fludarabine in combination with alemtuzumab is effective and feasible in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II trial. *J Clin Oncol* 2005; 23(28):7024-7031.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H i col-l. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1989; 6(1):67-75.
- Exner R, Wessner B, Manhart N i col-l. Therapeutic potential of glutathione. *Wien Klin Wochenschr* 2000; 112(14):610-616.
- Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18(6):667-682.
- Fong D, Kaiser A, Spizzo G i col-l. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome in chronic lymphocytic leukaemia patients previously treated with fludarabine. *Br J Haematol* 2005; 129:199-205.
- Frias M, Iglesias D, Cosials A i col-l. Akt Inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2009; 94(12):1698-1707.
- Fulbert JC, Cals MJ. Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathol Biol (Paris)* 1992; 40(1):66-77.
- Gachard N, Salviat A, Boutet C i col-l. Multicenter study of ZAP-70 expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia using an optimized flow cytometry

- method. *Haematologica* 2008; 93(2):215-223.
- Giralt M, Cervello I, Nogues MR i col.l. Glutathione, glutathione S-transferase and reactive oxygen species of human scalp sebaceous glands in male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 1996; 107(2):154-158.
- Giustarini D, Dalle Donne I, Tsikas D i col.l. Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical reviews in clinical laboratory science* 2009; 46(5-6): 241-281.
- Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. En: Bergmeyer HU eds. *Methods of enzymatic analysis* 3rd ed. 1983:258-265.
- Goth L. A new type of inherited catalase deficiencies: its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27(2):512-517.
- Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* 2010; 115:187-97.
- Guerra LN, Moiguer S, Karner M i col.l. Antioxidants in the treatment of Graves disease. *IUBMB Life* 2001; 51(2):105-109.
- Gundogdu M, Kaya H, Gulcin I i col.l. Oxidasa activity of ceruloplasmin and some acute phase reactant and trace element concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Scottish Medical Journal* 2007; 52(1): 24-27.
- Hallek M. Diagnostic and prognostic markers for B-cell chronic lymphocytic leukemia: impact on current treatment strategies. *Hematology-EHA education program* 2005; 1(1):200-205.

- Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Path* 1989;70:737-757.
- Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 2000; 72(5): 1082-1087.
- Harman D. Free-Radical theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 717: 1-15.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebol J i col-l. World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *J.Clin Oncol* 1999; 17:3835-3849.
- Hernández JA, Rodríguez AE, González M i col-l. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 2009; 94(3): 364-71.
- Herrera J, Nava M, Romero F, Rodríguez-Iturbe B. Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. *Am J Kidney Dis* 2001; 37 (4): 750-757.
- Hseu YC, Chang WC, Yang HL. Inhibition of human plasmin activity using humic acids with arsenic. *Sci Total Environ* 2001; 12; 273(1-3):93-99.
- Jagłowski SM, Byrd JC. Rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2010; 47(2): 156-69.
- Jantus E, Reinoso C, García Ballesteros C i col-l. Cytochrome-1 expression: a new prognostic

- marker in B-cell chronic lymphocytic leucemia. *Haematologica* 2008; 94(2):280-284.
- Junod AF. Oxygen free radicals and lungs. *Intensive Care Med* 1989; 15: S21-S23.
- Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; 187(1):1-17.
- Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1987; 25:317-364.
- Kay NE, O'Brien SM, Pettitt AR i col-l. The role of prognostic factors in assessing 'high-risk' subgroups of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007; 21:1885-1891.
- Kienle D, Benner A, Läufler C i col-l. Gene expressions factors as predictors of genetic risk and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2010; 95(1): 102-9.
- Kiely M, Flynn A, Harrington KE i col-l. The efficacy and safety of nutritional supplement use in a representative sample of adults in the North/South Ireland Food Consumption Survey. *Public Health Nutr* 2001; 4(5A):1089-1097.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30(6):620-650.
- Lang CA, Mills BJ, Mastropaolo W i col-l. Blood glutathione decreases in chronic diseases. *J Lab Clin Med* 2000; 135(5):402-405.
- Leupin N, Shuller JC, Solenthaler M i col-l. Efficacy of rituximab and cladribine in patients with chronic lymphocytic leukemia and

- feasibility of stem cell mobilization. *Leuk & Lymphoma* 2010; 51(4):613-9
- Lewis GR. Should doctors discourage nutritional supplementation? A cardiovascular perspective. *Heart Lung Circ* 2004; 13(3):245-251.
- Lightfoot TJ, Skibola CF, Smith AG i col-l. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2006; 91(9):1222-1227.
- Liu FT, Giustiniani J, Farren T i col-l. CD160 signaling mediates PI3K-dependent survival and growth signals in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115(15):3070-3088.
- Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 2007; 381(1-2): 50-58.
- Mazor D, Abucoider A, Meyer N i col-l. Antioxidant status in pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) and solid tumors: The impact of oxidative stress. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51: 613-615.
- McArdle F, Rhodes LE, Parslew R i col-l. UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(10):1355-1362.
- Maddocks-Christianson K, Slager SL, Zent S i col-l. Risk factors for development of a second lymphoid malignancy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 139:398-404.
- Maffei Facino R, Carini M, Aldini G i col-l. Panax ginseng

- administration in the rat prevents myocardical ischemia-reperfusion damage induced by hyperbaric oxygen: evidence for an antioxidant intervention. *Planta Med* 1999; 65 (7): 614-619.
- Marx G, Chevion M. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper(II) and ascorbate. *Biochem J* 1986; 236:397-400.
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R i col-l. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 2004; 8: 1640-1645.
- Mauro FR, Foa R, Cerretti R i col-l. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000; 95(9): 2786-2792.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein. *J Biol Chem* 1969; 244:6049-6055.
- Meloni G, Mauro FR, Proia A i col-l. Chronic lymphocytic leukemia: from palliative therapy to curative intent. *Haematologica* 1998; 83: 660-662.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
- Molica S, Mauro FR, Callea V i col-l. The utility of a pronostic index for predicting time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia: the GIMEMA experience. *Haematologica* 2010; 95(3): 464-469.
- Molica S, Di Raimondo F, Cutrona G i col-l. Clinical categories identified

- by a new pronostic index reflect biological characteristics of patients in early chronic lymphocytic leukemia: THE Gruppo Italiano Studi Linfomi (GISEL). *Leukemia Research* 2010; *in press*.
- Moller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact* 1996; 102(1):17-36.
- Montserrat E, Villamor N, Reverter JC i col·l. Bone marrow assessment in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: aspirate or biopsy? A comparative study in 256 patients. *Br J Haematol* 1996; 93:111-116.
- Montserrat E. CLL therapy: progress at last!. *Blood* 2005; 105(1): 2-3.
- Montserrat E. Leucemia linfática crónica. A: Sans-Sabrafen J, Besses C, Vives JL. *Hematología Clínica*. Ed Edsevier 2006; 491-500.
- Montserrat E. New pronostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 512:279-284.
- Montserrat E, Moreno C, Esteve J i col·l. How i treat refractory CLL. *Blood* 2006; 107(4):1276-1283.
- Moreno C, Montserrat E. New pronostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2010; 95(1):12-15.
- Moreno C, Montserrat E. Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: whats's ready for prime time use?. *HaematBlood Reviews* 2008; 22: 211-219.
- Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004; 18(15):1791-800.
- Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP i col·l. Improvement of the CLL scoring system with the

- monoclonal antibody CD79b. *Am J Clin Pathol* 1997; 108:378-382.
- Muchova J, Sustrova M, Garaiva I i col-l. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radical Biol.* 2001; 31(4):499-508.
- Muntañola A, Bosch F, Arguis P i col-l. Abdominal computed tomography predicts progressions in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin Oncol* 2007; 25(12):1576-1580.
- Murrant CL, Reid MB. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 2001; 55(4):236-248.
- Nabhan C, Coutré S, Hillmen P. Minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia: is it ready for primetime? *Leukemia* 2006; 136:379-392.
- Nogues MR, Giralt M, Cervello I i col-l. Parameters related to oxygen free radicals in human skin: a study comparing healthy epidermis and skin cancer tissue. *J Invest Dermatol* 2002; 119(3):645-652.
- Nourooz-Zadeh J. Effect of dialysis on oxidative stress in uraemia. *Redox Rep.* 1999; 4(1-2):17-22.
- Okamura K, Doi T, Hamada K i col-l. Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine excretion in humans. *Free Radic Res* 1997; 26(6):507-514.
- Ortín F, Giralt M, Cervelló I i col-l. The kinetic characteristics of the erythrocyte glutathione S-transferase system as a function of sex and tobacco habit. *Med Clin.* 1996; 106(16): 607-10.

- Oscier DG, Gardier AC, Mould SJ i col-l. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100(4):1177-1184.
- Oscier D, Fegan C, Hillmen P i col-l. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2004; 125(3):294-317.
- Oscier DG, Wade R, Orchard J i col-l. Prognostic factors in the UK LRF CLL4 trial. *Oral session, Abstract #299. ASH 2006. Blood* 2006;108(1).
- Oscier DG, Wade R, Davis Z i col-l. Prognostic factors identify 3 risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica* 2010; *in press*.
- Ou B, Hampsch M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001; 49:4619-4626.
- Pangalis GA, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos TP i col-l. B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma and lymphoplasmacytic lymphoma including Waldenström's macroglobulinemia: a clinical, morphologic and biologic spectrum of similar disorders. *Semin Hematol* 1999; 36(2):104-114.
- Pré J. La lipoperoxydation. *Pathol Biol* 1991; 39(7):716-736.
- Prior RL, Hoang H, Gu L i col-l. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen

- radical absorbance capacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem* 2003; 51(11):3273-3279.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP i col·l. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-234.
- Reinoso C, Jantus E, García Ballesteros C i col·l. ZAP-70 mRNA expressions provides clinically valuable information in early-stage chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica* 2008; 93(9):1422-1424.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC i col·l. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34(2):237-256.
- Rodrigo R, Parra M, Bosco C i col·l. Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation with antioxidant vitamins. *Pharmacol Ther* 2005; 107(2):177-197.
- Romero D, Villalba MP, Mur M i col·l. The importance of anti-oxidants in human nutrition. *Med Clin* 1990; 94(2):69-75.
- Romeu M. Distrès oxidatiu en humans. Valoració en diferents situacions fisiològiques i patològiques. *Tesi Doctoral* 2006.
- Romeu M, Nogués R, Marcas L i col·l. Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with chronic renal failure: a case control study. *BMC Res Notes*. 2010; 3: 20.
- Rossi D, Berra E, Cerri M i col·l. Aberrant somatic hypermutations

- in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2006; 91(10): 1405-1427.
- Rossi D, Cerri M, Capello D i col-l. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008; 142: 202-15.
- Roué G, López-Guerra M, Milpied P. Bendamustine is effective in p53-deficient B-cell neoplasms and requires oxidative stress and caspase-independent signaling. *Clin Cancer Res* 2008; 14(21): 6907-6915.
- Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognostic at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; 103(4): 1202-1210.
- Shanafelt TD, Lee YK, Bone ND i col-l. Adaphostin-induced apoptosis in CLL B cells is associated with induction of oxidative stress and exhibits synergy with fludarabine. *Blood* 2005; 105(5): 2099-2106.
- Shanafelt TD, Bowen D, Venkat C i col-l. Quality of life in chronic lymphocytic leukemia: an international survey of 1482 patients. *Br J Haematol* 2007; 139: 255-264.
- Shanafelt TD and Kay NE. Comprehensive management of the CLL patient: a holistic approach. Hematology. *Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 324-331.
- Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM i col-l. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis* 2001; 22(1):67-72.

- Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 928:22-38.
- Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991; 266(4):2005-2008.
- Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009; 202: 321-329.
- Thannickal VJ. The paradox of reactive oxygen species: injury, signaling, or both?. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284(1):24-25.
- Thihofer I, Rubenzer G, Holler C i col-l. Expression levels of CD38 in T cells predict course of disease in male patients with B-Chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 108(9):2950-2956.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 2005; 39(2):99-104.
- Trachootham D, Zhang H, Zhang W, i col-l. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood* 2008; 112(5): 1912-1922.
- Ursini F, Maiorino M, Valente M, i col-l. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta* 1982; 710:197-211.

- Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Reviews* 2009; 23:25-47.
- Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2006; 5(2):145-152.
- Van Kujik FJ, Sevanian A, Handelman GJ, et al. A new role for phospholipase A₂: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends in Biochem Sci* 1987; 12(1):31-34.
- Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int* 2003; 63(1):179-185.
- Vaya J, Tamir S. The relation between the chemical structure of flavonoids and their estrogen-like activities. *Curr Med Chem*. 2004; 11(10):1333-1343.
- Walewski J. Diagnosis of CLL recommendations. *Euro CLL news* 2005; 1: 2-3.
- Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed Nm i col-l. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 1990; 184: 193-199.
- Wierda WG. Current and investigational therapies for patients with CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 512:285-294.
- Wierda WG, O'Brien S, Wang X i col-l. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic

- lymphocytic leukaemia. *Blood* 2007; 109(11):4679-4685.
- Woessner S, Florensa L. A: La citología óptica en el diagnóstico hematológico, 4ta ed. FEHH. 2000: 436-451.
- Wu RP, Hayashi T, Cottam H i col-l. Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia *PNAS* 2010: 1-6.
- Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29(Pt 2):358-362.
- Zhao H, Dugas N, Mathiot C i col-l. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functionals inductible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. *Blood* 1998; 92 (3):1031-1043.
- Zhou Y, Hileman EO, Plunkett W i col-l. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood* 2003; 101(10):4098-4104.
- Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA i col-l. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(5):321-329.
- Zhuang J, hawkins SF, Glenn MA i col-l. Akt is activated in chronic lymphocytic leukemia cells and delivers a pro-survival signal: the therapeutic potential of Akt inhibition. *Haematologica*; 2010: 95(1): 110-118.
- Zola H, Swart B, Nicholson I i col-l. CD molecules 2005: human cells differentiation molecules. *Blood*; 2005: 106(9):3123-3126.

PUBLICACIONS PRÒPIES

COMUNICACIONS A CONGRESSOS

Ortín X, Giralt M, Romeu M, Llorc MR, Sánchez-Martos V, Rodríguez-Luaces M, Font LL.

Measurement of oxidative stress (OS) in CLL patients with early stage.
XI iwCLL congress, Londres, setembre 2007.

Ortín X, Giralt M, Romeu M, Llorc MR, Sánchez-Martos V, Rodríguez-Luaces M, Font LL.

Medida del nivel de estrés oxidativo en pacientes en estadíos iniciales de leucemia linfática crónica.
XLIX Reunión Nacional AEHH – XXIII Congreso Nacional SETH. Pamplona, octubre 2007.

Ortín X, Giralt M, Romeu M, Llorc MR, Sánchez-Martos V, Rodríguez-Luaces M, Font LL.

Nivel de estrés oxidativo en pacientes en estadíos iniciales de leucemia linfática crónica.
L Reunión Nacional AEHH – XXIV Congreso Nacional SETH. Murcia, octubre 2008.

Ortín X, Giralt M, Romeu M, Llorc MR, Sánchez-Martos V, Rodríguez-Luaces M, Font LL.

Measurement of oxidative stress in CLL patients with early stage
XII iwCLL congress. Barcelona, octubre 2009.

ANNEXOS

1. CLASSIFICACIÓ DE L'OMS PER A NEOPLÀSIES LIMFOIDES DE CÈL·LULES B MADURES

Neoplàsies de cèl·lules B madures

Leucèmia limfàtica crònica/

limfoma limfocític de cèl·lula petita

Leucèmia prolimfocítica de cèl·lula B

Limfoma esplènic de cèl·lula B de la zona marginal

Tricoleucèmia

Leucèmia/limfoma esplènic de cèl·lula B inclassificable

Limfoma esplènic de polpa roja difús de cèl·lula B

Tricoleucèmia variant

Limfoma limfoplasmacític

Macroglobulinèmia de Waldenström

Malalties de cadenes pesades

Malaltia de cadenes pesades alfa

Malaltia de cadenes pesades gamma

Malaltia de cadenes pesades mu

Mieloma de cèl·lules plasmàtiques

Plasmocitoma ossi solitari

Plasmocitoma extraossi

Limfoma de la zona marginal extranodal associat a teixit limfoide de les mucoses (limfoma MALT)

Limfoma de la zona marginal nodal

Limfoma de la zona marginal nodal pediàtric

Limfoma fol·licular

Limfoma fol·licular pediàtric

Limfoma centrefol·licular primari cutani

Limfoma del mantell

Limfoma difús de cèl·lula gran B (LDCGB)

LDCGB ric en histiòcits/cèl·lules T

LDCGB primari de sistema nerviós central

LDCGB primari cutani leg type

LDCGB VEB positiu de l'ancià

LDCGB associat amb inflamació crònica

Granulomatosi limfomatoide

Limfoma de cèl·lula gran B mediastínic primari (tímic)

Limfoma de cèl·lula gran B intravascular

Limfoma de cèl·lula gran B ALK positiu

Limfoma plasmablàstic

Limfoma de cèl·lula gran B en HHV8 associat a malaltia de Castleman multicèntrica

Limfoma vessament primari

Limfoma de Burkitt

Limfoma de cèl·lula B, no classificable, amb característiques intermèdies entre LDCGB i limfoma de Burkitt

Limfoma de cèl·lula B, no classificable, amb característiques intermèdies entre LDCGB i limfoma de Hodgkin clàssic

Extret de "Who classification of tumours of haematopoetic and lymphoid tissues" 4a ed. Editat per Swerdlow i cols., IARC, 2008.

2. LIMFOPOESI

2.1. SISTEMA LIMFOIDE

El sistema limfoide normal està format pels òrgans limfoides primaris o centrals i els òrgans limfoide secundaris o perifèrics. En els adults, el moll de l'os i el timus desenvolupen la funció d'òrgans primaris. En aquests s'originen dels limfòcits B i T a partir de la cèl·lula mare hematopoètica pluripotent i, posteriorment, maduren sense requerir la presència d'antígens. Els limfòcits que maduren en el moll de l'os s'anomenen *limfòcits B*, i són els responsables de produir anticossos com a resposta a l'estímul antigènic. Els que maduren en el timus s'anomenen *limfòcits T* i són els responsables de les respostes immunes produïdes per les cèl·lules. Els òrgans limfoides secundaris engloben els ganglis limfàtics, la melsa i el teixit limfoide associat a les mucoses, pell i tub digestiu, on s'inicien les respostes immunes.

2.1.1. POBLACIONS LIMFOCITÀRIES I LA SEVA CARACTERITZACIÓ

Actualment, el limfòcit ocupa una posició d'elit dintre de la cel·lularitat hematopoètica, després de demostrar-se la seva gran capacitat immunogenètica. A la dècada dels seixanta es varen descobrir dos tipus limfocitaris: els limfòcits T, responsables de la immunitat cel·lular; i els limfòcits B, responsables de la immunitat humoral, els quals, a la seva vegada, consten de

diverses subpoblacions que poden diferenciar-se per mitjà de característiques immunològiques, enzimàtiques, morfològiques i funcionals. A més dels limfòcits T i B hi ha una tercera varietat: les cèl·lules NK o cèl·lules agressores naturals. La majoria dels limfòcits madurs tenen una vida llarga, i alguns persisteixen, com a cèl·lules de memòria, al llarg de diversos anys.

2.1.2. ONTOGÈNIA DELS LIMFÒCITS B

Els limfòcits B deriven de la cèl·lula germina limfoide pluripotent, i en l'ésser humà adquireixen la seva competència immunològica en el moll de l'os. A semblança del limfòcit T, els limfòcits B assoleixen la seva maduresa funcional amb l'expressió en la membrana dels receptors de reconeixement antigènic. En les cèl·lules B aquests receptors són les immunoglobulines de superfície. Durant la maduració del limfòcit B tenen lloc una seqüència de reordenaments dels gens de les immunoglobulines i canvis del fenotip. Les Ig tenen una unitat bàsica constituïda per dues cadenes lleugeres (κ i λ) i dues cadenes pesades unides per ponts disulfur. Les cadenes pesades difereixen segons el tipus d'Ig (G, M, A, D i E).

Abans d'arribar a l'estadi de cèl·lules pre-B, els precursors més immadurs de cèl·lules B (cèl·lules *pre-pre-B* o també *pro-B*) ja poden identificar-se fenotípicament per mitjà d'anticossos monoclonals. Expressen la molècula CD34, els antígens HLA-DR, CD10, CD19, CD24 i l'enzim TdT. No tenen immunoglobulines de superfície, però sí reordenament del gen de la cadena pesada, que representa la primera indicació de compromís amb la línia B. En

l'estadi de *limfòcit pre-B* hi ha encara TdT i els antígens CD10 i CD34. A més, expressen els antígens HLA-DR, CD19, CD 24, i apareix el CD20 i la molècula específica de línia CD22. En aquesta fase, s'expressa l'antigen leucocitari comú (CD45). La cèl·lula precursora B també expressa CD79a, molècula que s'associa amb les Ig de superfície, i està implicada en la transducció de senyals després de la seva unió amb l'antigen, a semblança del que succeeix amb el CD3 i la molècula del receptor T en la cèl·lula T. A mesura que progressa la maduració, es perd CD10 (que torna a expressar-se quan el limfòcit és estimulat per un antigen), es reordenen els gens de les cadenes lleugeres que es transcriuen i es sintetitzen a semblança amb les cadenes μ . La cèl·lula passa a expressar IgM de superfície i s'anomena *limfòcit B immadur*. Poc després passa a *limfòcit B madur*, que sintetitza, a més, IgD i segueix expressant antígens de membrana CD19 i CD24. També és positiu per als antígens CD20, CD22 i CD21.

Els limfòcits B madurs passen de moll d'os a la sang perifèrica, on constitueixen la minoria de la població limfocitària circulant (entre el 5% i el 15%). A la sang perifèrica hi ha una subpoblació de limfòcits B que es caracteritza per expressar la molècula CD5, que és atribut normal dels limfòcits T madurs, i constitueixen el 10-30% del limfòcits B de sang perifèrica. Amb l'edat aquesta població disminueix. Els limfòcits B es dirigeixen des de la sang perifèrica fins els òrgans limfoides perifèrics, i s'afinen a les zones immunològicament depenents B. A nivell ganglionar, quan els limfòcits B són activats pels antígens, poden madurar a cèl·lules formadores d'anticossos i a estadis

madurs de cèl·lula plasmàtica, o evolucionen a cèl·lules de memòria. Les cèl·lules B madures que no han rebut l'estímul antigènic, o cèl·lules verges, passen a formar part d'una petita fracció de cèl·lules B dels fol·licles limfoides primaris i de la zona del mantell. Són cèl·lules que tenen reordenats, però no mutats, els gens de les immunoglobulines, i que es troben en repòs fins que es trobin amb l'antigen. Cada cèl·lula B està compromesa a una cadena lleugera, kappa o lambda, i tota la seva progènie expressarà la mateixa cadena.

El *prolimfòcit* representa un estadi maduratiu més avançat que el limfòcit B, encara que el seu nom podria fer pensar que es tracta d'una cèl·lula precursora. El *limfòcit B petit* és de mida petita, amb un nucli arrodonit amb cromatina condensada, sense nuclèol aparent i escàs citoplasma. Constitueix la població majoritària dels fol·licles primaris i de la zona del mantell dels fol·licles secundaris. Expressa els antígens CD19, Cd20, Cd79a i la IgD de superfície. En l'adult, una petita proporció dels limfòcits petits B localitzats en el mantell fol·licular poden expressar també CD5. D'aquests limfòcits CD5 positius, sembla que hi ha dues poblacions, una CD23+ i un altra CD23- (Extret de "Hematologia Clínica " 5a ed. Sans i col·l. Ed. Elsevier).

3. MOLÈCULES CD

Cúmulo de diferenciación (de l'anglès *Cluster of differentiation*) abreujat com a CD, és el conjunt de molècules de superfície cel·lular, que reconeixen certs anticossos, usades per a la identificació del tipus cel·lular, estadi de diferenciació cel·lular i la seva activitat. Conformen un sistema d'antígens de superfície cel·lular dels leucòcits humans, que es caracteritzen per mitjà d'anticossos monoclonals, i permet la categorització leucocitària i altres cèl·lules hematopoètiques.

La nomenclatura CD va ser proposada i establerta en el 1r *International Workshop and Conference on Human Leukocyte differentiation Antigens (HLDA)*, celebrat a París l'any 1982. El sistema es va establir per a la classificació dels diferents anticossos monoclonals generats enfront epítops de superfície dels leucòcits. Des de llavors el seu ús s'ha estès a molts altres tipus cel·lulars i s'han identificat més de 320 CD clústers i subclústers. La molècula de superfície s'assigna a un número de CD un cop es demostra que dos anticossos monoclonals específics es lliguen a aquella molècula. Si la molècula no ha estat ben caracteritzada, o només es lliga a un anticòs monoclonal, generalment es dona l'indicador provisional "w" (p. ex., "CDw186").

Generalment el sistema CD s'usa com a marcador cel·lular, i permet a les cèl·lules definir-se basant-se amb les molècules que tenen presents a la seva

superfície. Aquests marcadors freqüentment s'associen a cèl·lules amb funcions immunes, però mentre que una sola molècula CD no defineix una població, la combinació de marcadors permet definir de forma molt específica poblacions cel·lulars dintre del sistema immune.

La detecció de molècules CD es realitza per diferents mètodes, incloent la citometria de flux. Les poblacions cel·lulars generalment es defineixen usant els símbols '+' o '-' per indicar si una certa fracció cel·lular expressa o manca d'una determinada molècula CD. La taula següent mostra, a mode d'exemple, els marcadors més específics de cada línia cel·lular hematopoètica:

Tipus cel·lular	Marcadors CD
Cèl·lula mare	CD34+, CD31-
Leucòcits	CD45+
Granulòcits	CD45+, CD15+
Monòcits	CD45+, CD14+
Limfòcits T	CD45+, CD3+
Limfòcits T col·laboradors	CD45+, CD3+, CD4+
Limfòcits T citotòxics	CD45+, CD3+, CD8+
Limfòcits B	CD45+, CD19+ o CD45+, CD20+
Trombòcits	CD45+, CD61+
Cèl·lules NK	CD16+, CD56+, CD3-

Al llarg de la seva maduració i diferenciació, els limfòcits van rebre en la seva superfície un seguit de receptors immunitaris que van apareixent de manera seqüencial a mesura que progressa la diferenciació limfocitària. Se'ls anomena *marcadors de diferenciació* ja que donen a la cèl·lula limfocítica components fenotípics únics segons l'estadi de diferenciació en què es trobin.

És important ressaltar que mentre que les molècules CD són de gran utilitat en la caracterització leucocitària, no són merament marcadors de superfície cel·lular. Així, mentre que sols una fracció de molècules CD conegudes han estat plenament caracteritzades, la majoria d'aquestes tenen, però, importants funcions. Per exemple, les molècules CD4 i CD8 són crucials en el reconeixement antigènic (Zola i col·l., 2005).

4. DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL DE LES SLPC-B

Diagnòstic diferencial de les SLPC-B amb expressió leucèmica: marcadors immunofenotípics i genètics

	IgS	CD5	CD10	CD23	Ciclina D1	Anomalies cromosòmiques
LLC	+/-	+	+	+	-/+	+12; 13q-, 11q-; 17p
LPC	+	-	-	-	-	14q+
TL	+	-	-	-	-/+	14q+
LF	+	-	-	-/+	-	t(14;18) BCL2
LM	+	+	+	-	+	t(11;14) BCL1
LELV	+	-	-	-	-	7q- +3/+3q

IgS: immunoglobulines de superfície; LPC: leucèmia prolimfocítica crònica; TL: trocoleucèmia; LF: limfoma fol·licular; LM: limfoma del mantell; LELV: limfoma esplènic de limfòcits vellosos circulants

Extret de Woessner i Florensa. "La citología óptica en el diagnóstico hematológico". 4a. edición. FEHH.

5. DOCUMENTS DE CONSENTIMENT I INFORMACIÓ LLIURATS ALS PARTICIPANTS DE L'ESTUDI

DOCUMENT DE CONSENTIMENT INFORMAT

.....
informa el/la
Sr./Sra.

Que hi ha un projecte d'investigació que porta per títol: "RELACIÓ ENTRE LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA (ESTADIS INICIALS) I NIVELL D'ANTIOXIDANTS.", i us demano la vostra participació.

He estat informat/ada:

- Que la meva participació és totalment voluntària.
- Que la meva participació consisteix a donar 10 ml de sang, juntament amb les meves dades clíniques.
- Que l'equip investigador garanteix la confidencialitat respecte a la identitat del pacient, i que la mostra i els resultats derivats de la investigació seran utilitzats per a la finalitat descrita i no per a altres.
- Que he pogut fer preguntes per aclarir els meus dubtes i, finalment, he pres lliurement la decisió de participar-hi.

I, perquè consti, signo aquest document:

_____, ____ d _____ de 200

El participant

El metge informant

FULL D'INFORMACIÓ PER AL PARTICIPANT

Naturalesa del projecte

El projecte d'investigació per al qual us demanem la vostra participació porta per títol: "RELACIÓ ENTRE LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA (ESTADIS INICIALS) I NIVELL D'ANTIOXIDANTS". Els objectius d'aquest projecte són determinar el grau de distrès oxidatiu en una població amb LLC, comparant aquesta població amb una població control sana, i determinar correlacions entre cada un dels paràmetres del distrès oxidatiu i els paràmetres clínics de la seva malaltia.

Per a aquest estudi es demana la col·laboració de pacients amb estadis inicials d'LLC del Servei d'Hematologia de l'Hospital de Tortosa Verge de la Cinta i de persones sanes que seran la població control.

Els investigadors responsables d'aquest estudi pertanyen a la Facultat de Medicina de Reus i al Servei d'Hematologia de l'Hospital de Tortosa Verge de la Cinta.

Procediment

La participació en aquest estudi consisteix en:

- Donació de 10 ml de sang, que us serà extreta pel personal del Laboratori d'Hematologia de l'Hospital de Tortosa Verge de la Cinta.

Totes les dades es guarden en fitxers informatitzats especialment dissenyats per a la investigació i no hi apareix el vostre nom ni cap dada que us pugui identificar.

Les mostres de sang són processades per separar el plasma dels eritròcits i es realitzen diverses anàlisis bioquímiques en les dues fraccions.

Beneficis i riscos

El benefici de l'estudi és conèixer, d'una banda, si els pacients amb estadis inicial d'LLC presenten un determinat grau de distrès oxidatiu i, de l'altra, validar un nou mètode de puntuació d'aquest *distress*, comparar-lo amb una població sana.

A curt termini, els resultats obtinguts de l'estudi poden beneficiar directament el participant si el seu metge considera que es pot tractar amb fàrmacs antioxidants per millorar el seu grau de distrès oxidatiu. A llarg termini, els resultats beneficiarien la població en general.

En cap cas, com a participant, rebreu cap recompensació econòmica.

L'estudi no suposa cap risc que no sigui el derivat de l'extracció de sang.

Confidencialitat

El Servei d'Hematologia de l'Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, així com els investigadors de la Facultat de Medicina de Reus, es responsabilitzen que en qualsevol moment es mantingui la privadesa i confidencialitat respecte la identificació i dades del participant. El nom i les dades que permeten identificar el participant només consten en la història clínica que roman al Servei d'Hematologia de l'Hospital de Tortosa Verge de la Cinta. Els investigadors utilitzen codis d'identificació, sense el nom de la persona, que són els que queden registrats a la base de dades. Els resultats que s'obtinguin d'aquest estudi es podran publicar a revistes, llibres o congressos, però en cap cas hi apareixeran les vostres dades personals.

Preguntes

Arribat aquest moment, us donem l'oportunitat que, si no ho heu fet abans, feu les preguntes que considereu i us les respondrem el millor que puguem.

ABREVIACIONES

%	Percentatge
°C	Grau centígrads
•OH	Radical hidroxil
µl	Microlitres
µmols	Micromols
¹ O ₂	Oxigen singulet
2-ME	2-metoxiestradiol
8-OH-dG	8-hidroxi-deoxi-guanosina
AAPH	2,2'-azobis-2-amidinopropà
AEHH	Asociación Española de Hematología y Hemoterapia
AHAI	Anèmia hemolítica autoimmune
ATP	Adenosintrifosfat
B2M	Beta-2 microglobulina
CAT	Catalasa
CD	Cúmulo de diferenciació
CDNB	1-clor-2,4-dinitrobenzè
Cl ⁻	Anió clorur
cm	Centímetres
Coef	Coeficient
CAP	Ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona
CHOP	Ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, prednisona
COP	Ciclofosfamida, vincristina, prednisona
Cp	Ceruloplasmina

Cu ⁺	Ió coure (I)
Cu ²⁺	Ió coure (II)
CuZn SOD	Superòxid-dismutasa coure-zinc
dL	Decilitre
D.O.	Densitat òptica
DNA	Àcid desoxirribonucleic
EC SOD	Superòxid-dismutasa extracel·lular
EDTA	Àcid etildiaminotetracètic
EPO	Eritropoetina
erit.	Eritròcit
ERO	Espècies reactives d'oxigen
ESR	Espectroscòpia de ressonància d'spin electrònic
Etc.	Etcètera
Ev	Endovenòs
F	Fludarabina
FC	Fludarabina, ciclofosfamida
FluCam	Fludarabina, alemtuzumab
FCR	Fludarabina, ciclofosfamida, rituximab
Fe SOD	Superòxid-dismutasa ferro
Fe ²⁺	Ió ferrós
Fe ³⁺	Ió fèrric
FISH	Fluorescència per hibridació in situ
FRAP	Capacitat antioxidant per reduir l'ió fèrric

g	Gram
G6PDH	Glucosa 6-fosfat-deshidrogenasa
GOT	Aspartat-aminotransferasa
GPT	Alanin-aminotransferasa
GPx	Glutatió-peroxidasa
GR	Glutatió-reductasa
GSH	Glutatió reduït
GSSG	Glutatió oxidat
GSSG/GSH	Ràtio entre el glutatió oxidat i el reduït
GST	Glutatió S-transferasa
H•	Àtom d'hidrogen
H ₂ O•	Radical perhidroxil
H ₂ O	Aigua
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
Hb	Hemoglobina
HCl	Àcid clorhídric
HE	Hemòlisi
HO ₂ •	Radical perhidroxil
HOCl	Àcid hipoclorós
HOONO	Peroxinitrit
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
HTVC	Hospital de Tortosa Verge de la Cinta
I ₅₀	Concentració inhibidora 50

IAM	Infart agut de miocardi
Ig	Immunoglobulines
IgV _H	Regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines
IR	Insuficiència renal
K ₂ HPO ₄	Fosfat àcid de potassi
KCl	Clorur de potassi
KD	Quilodaltos
Kg	Quilograms
KH ₂ PO ₄	Fosfat diàcid de potassi
L	Litre
LDCGB	Limfoma difús de cèl·lula gran B
LDH	Lactat-deshidrogenasa
LNH	Limfoma no hodgkinà
L-OH	Hidròxids fosfolipídics
LOO [•]	Alquilperoxil fosfolipídic, radical lipoperòxid
L-OOH	Hidroperòxid fosfolipídic, peròxid lipídic
LDCGB	Limfoma difús de cèl·lula gran B
LLC	Leucèmia limfàtica crònica
LLC/PL	Leucèmia limfàtica crònica atípica
LSN	Límit superior de normalitat
MDA	Malondialdehid
mDNA	DNA mitocondrial
mg	Miligrams

MH	Malaltia de Hodgkin
min	Minuts
mL	Mil·lilitre
mM	Mil·limolar
MMR	Malaltia mínima residual
mmol	Mil·limols
Mn SOD	Superòxid-dismutasa manganès
MO	Moll de l'os
MPO	Mieloperoxidasa
MPOC	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
N	Grandària de la població
Nre.	Nombre
Na ₂ CO ₃	Carbonat sòdic
Na ₂ HPO ₄	Fosfat àcid de sodi
NaCl	Clorur de sodi
NAD	Dinucleòtid d'adenina i de nicotinamida
NADP+	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina
NADPH	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït
NaH ₂ PO ₄	Fosfat diàcid de sodi
NaHCO ₃	Sodi hidrogen carbonat
NaOH	Hidròxid sòdic
NCI-WG	National Cancer Institute-Working Group
NEM	N-etil-maleïmida

NFMP	Nombre de factors de mal pronòstic
nm	Nanòmetre
nmol	Nanomol
NO	Monòxid de nitrogen
NO [•]	Radical de l'òxid nítric
NO ₂	Diòxid de nitrogen
NO _x	Molècula d'oxigen nitrogenada
NS	No significatiu
O ₂	Oxigen
O ₂ ^{•-}	Anió superòxid
OH ⁻	Anió hidroxil
OMS	Organització Mundial de la Salut
OONO ⁻	Anió peroxinitrit
OPT	O-phtalaldehid
OR	Resposta global
ORAC	Capacitat d'absorció dels radicals lliures
OS	Supervivència global
<i>p</i>	Nivell de significació
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDO	Puntuació de distrès oxidatiu
PEITC	β-feniletíl isotiocianat
PFS	Supervivència lliure de progressió

p. ex.	Per exemple
pH	Potencial hidrogen
pl.	Plasma
PM	Pes molecular
PNP	Purina-nucleòsid-fosforilasa
PQ ⁺	Forma radicalària catiònica de l'ió paraquat
PQ ⁺⁺	Ió paraquat
PTI	Púrpura trombocitopènica autoimmune
PUFA	Àcids grassos poliinsaturats
Quoc	Quocient
RC	Respostes complertes
RP	Respostes parcials
REDOX	Reducció oxidació
Ref.	Referència
R-GST	Glutatió S-transferasa residual
RLL	Radical lliure
RLLO	Radical lliure d'oxigen
RNA	Àcid ribonucleic
RO	Carbonil excitat
RO [•]	Radical alcoxi
RO*	= RO
ROH	Molècula d'hidròxid
ROH [•]	Radical hidroxilat

ROO•	Radical peroxil
ROOH	Molècula d'un peròxid
ROS	Espècie reactiva d'oxigen
RR	Risc relatiu
S	Significatiu
s	Segon
sbc	Subcutani
SLL	Limfoma limfocític de cèl·lula petita
SLPC	Síndrome limfoproliferativa crònica
SLPC-B	Síndrome limfoproliferativa crònica de cèl·lula B
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
-SH	Grup tiol
SIDA	Síndrome de la immunodeficiència adquirida
Sig	Immunoglobulines de superfície
SOD	Superòxid dismutasa
SR	Síndrome de Richter
TASP	Trasplantament autòleg de sang perifèrica
TBA	Àcid tiobarbitúric
TBARS	Substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric
TC	Tomografia computeritzada
TCA	Àcid tricloracètic
TDL	Temps de duplicació limfocitària
TEAC	Capacitat antioxidant equivalent al trolox

T-GST	Glutatió S-transferasa total
TK	Timidina-cinasa
TPH	Trasplantament de progenitors hematopoètics
TRAP	Capacitat antioxidant d'atrapament de radicals totals
TS-GST	Glutatió S-transferasa termoestable
TTP	Temps fins a la progressió
U	Unitat
UV	Ultraviolat
v.	Versió
vs.	Versus
ZAP-70	Proteïna 70 associada a zeta