

Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano

ESTEPA, V.; RÓDENAS, S.; MARTÍN M.C.

Sección Departamental de Química Analítica

*Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040. Madrid
(España)*

RESUMEN

Como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que generalmente son eliminados por receptores endógenos pero también pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Dada la naturaleza inestable de los productos de la peroxidación lipídica resulta dificultoso determinar la magnitud de dicha peroxidación. Es, sin embargo, más accesible determinar los productos de su degradación metabólica, constituidos fundamentalmente por aldehídos de alta capacidad reactiva, siendo el más significativo el malondialdehído (MDA).

Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar el daño oxidativo de los lípidos, el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría.

En el presente trabajo, para la determinación de lipoperóxidos en suero humano se ha empleado una técnica colorimétrica basada en la reacción del TBA descrita por ASAKAWA y MATSUSHITA. Para la optimización de esta técnica fueron cuidadosamente analizadas las condiciones de reacción establecidas por estos autores

introduciéndose modificaciones que afectan principalmente al tiempo de reacción y al método de extracción de los lipoperóxidos.

Palabras clave: Aductos MDA-TBA.- Peroxidación lipídica.- Reacción del TBA.

SUMMARY

A optimized method for the analysis of the lipidic peroxidation in human serum

A variety of free radicals are produced in human organism as a consequence of normal cell metabolism. These free radicals are generally removed by endogenous scavengers but also can interact with plasma and tisular lipids causing its peroxidation.

It is very difficult to determine the magnitude of the peroxidation and also the first lipidic peroxidation products due to their very short half-life. However the evaluation of the secondary lipidic peroxidation products can be quantitatively determined as well as their degradation products such as aldehydes with high reactivity among them malondialdehyde (MDA) is the most relevant.

Among the variety of assays developed to estimate the magnitude of oxidative damage in humans, the most commonly employed is based on the reaction of endogenous malondialdehyde (MDA) with 2-thiobarbituric acid (TBA). This reaction yields very stable cromogenic and fluorogenic MDA-TBA adducts, that are detectable by UV spectrophotometry and fluorimetry.

In the present study, a colorimetric method described by ASAKAWA and MATSUSHITA, was optimized to determine the human serum lipoperoxides based on the TBA reaction. The reaction conditions established by these authors were rigorously investigated in order to optimize this procedure. Mainly, changes were introduced relating to the reaction time and the lipoperoxides extraction method.

Key words: MDA-TBA aducts.- Lipidic peroxidation.- TBA reaction.

INTRODUCCIÓN

En el organismo humano, como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que generalmente son eliminados por receptores endógenos pero también pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. La peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis y gravedad de diversas enfermedades.

La determinación de la magnitud de la peroxidación lipídica es dificultosa debido a que los productos de la misma son muy reactivos y de corta vida. Por ello se determinan los productos de la degradación metabólica de los lipoperóxidos, como los isoprostanos y los isómeros de la prostaglandina producidos a partir del ácido araquidónico a través de una vía metabólica catalizada por radicales libres y que se eliminan por orina (1). Pero son, fundamentalmente, los diferentes aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos presentes en el suero los que son objeto de cuantificación. El malondialdehído (MDA) es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación y también el más cuantificado (2, 3, 4).

Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar el malondialdehído endógeno el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del mismo con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (5, 6, 7). El MDA, en condiciones de bajo pH y alta temperatura, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar a un aducto MDA-TBA cromógeno o pigmento rojo que es detectable por espectrofotometría o por fluorimetría.

Ciertos autores enfatizan que el ensayo del TBA no es útil para la determinación de la peroxidación lipídica en el suero humano por falta de especificidad. El MDA que se forma in vivo tiene una vida media muy corta, pues reacciona rápidamente con grupos amino libres procedentes de los fosfolípidos, aminoácidos y proteínas presentes en el suero, dando productos fluorescentes. Estos grupos amino libres también compiten con el MDA por su capacidad de unirse al TBA. Por otro lado, existen fuentes no lipídicas en el suero como los carbohidratos y las glicoproteínas que producen aductos MDA-TBA durante la reacción colorimétrica. Además, el TBA también reacciona con varios compuestos presentes en el suero (pirimidinas, hemoglobina y bilirrubina) y con sus productos de oxidación para formar compuestos que interfieren en los ensayos fluorimétricos y espectrofotométricos. Sin embargo, aunque poco específica, la reacción del TBA se considera un método muy sensible para la determinación de la peroxidación lipídica en tejidos animales (8, 9) y con tal finalidad se utiliza con frecuencia. Distintos autores han empleado esta reacción para

analizar la peroxidación lipídica en muestras de suero o plasma humano (9, 10, 11, 12).

El objetivo de este estudio ha sido determinar las condiciones experimentales óptimas para la determinación de los lipoperóxidos en suero mediante la reacción con TBA, con el fin de establecer una pauta de trabajo que permita el análisis rutinario y la obtención de resultados reproducibles. El método empleado ha sido desarrollado siguiendo el método de ASAKAWA y MATSUSHITA (11), autores que proponen una técnica aplicable a la microdeterminación de lipoperóxidos en suero o plasma humano. Hemos estudiado rigurosamente las condiciones de reacción propuestas por estos autores y hemos introducido algunas modificaciones, que afectan principalmente al tiempo de reacción y al método empleado para la extracción de los lipoperóxidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Reactivo cromógeno de ácido tiobarbitúrico (TBA):** disolución de 5 g/L de ácido tiobarbitúrico (4,6-dihidroxipirimidina-2-tiol) en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,3% (V/V) en agua destilada.
- **Reactivo antioxidante:** disolución de 2,2 g/L de butil-hidroxi-tolueno (BHT) en etanol.
- **Disolución tampón de HCl-glicocola a pH=3,5:** disolver 75,05 g de glicocola y 58,44 g de NaCl en 900 mL de agua destilada, ajustar a pH 3,5 con hidróxido de sodio 0,1 M y completar a 1000 mL con agua destilada.
- **Reactivo catalizador:** disolución de 2,7 g/L de tricloruro de hierro (III) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, en agua destilada.
- **Disolución patrón de malondialdehído:** disolución al 20% (V/V) de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en disolución tampón a pH = 3,5, con la adición de 400 μL de HCl 1N con el fin de favorecer la hidrólisis del producto.

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción, previo ayuno de 12 a 14 horas. Paralelamente se distribuyeron alicuotas de sangre en tubos sin anticoagulante y en tubos con EDTA disódico como anticoagulante. Se centrifugaron a 2.500 g, a temperatura ambiente y en el suero o plasma resultante se analizaron inmediatamente los peróxidos lipídicos o bien, en los casos en que no fue posible el análisis inmediato, se conservaron a - 20° C un máximo de 30 días en tubos de ensayo exentos de elementos traza con el fin de mantener la estabilidad de las muestras y para prevenir la autoxidación.

Las determinaciones espectrofotométricas de absorción en la región del visible, se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz Uvikon-810 de la casa KONTRON-INSTRUMENTS, programable y con registro automático.

La precisión se determinó a partir de los coeficientes de variación intra e Inter.-día. La comprobación de la normalidad de la distribución se realizó por medio del test de Kolmogorov. La comparación de las poblaciones por el test de Student. Los coeficientes de correlación se obtuvieron a partir de la r de Pearson.

PROCEDIMIENTO DE OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE LA REACCIÓN TBARS

Los parámetros analizados en esta optimización fueron:

- 1- Análisis del tipo de muestra
- 2- Calibración de la reacción del TBA
- 3- Reactivos y condiciones de reacción
- 4- Método de extracción
- 5- Detección y cuantificación

1.- Análisis del tipo de muestra

Este método es aplicable tanto a suero como a plasma (11), como se pudo comprobar en la determinación puntual de lipoperóxidos en ambos tipos de muestra. No se han encontrado variaciones estadísticamente significativas en los resultados obtenidos con muestras de plasma y con muestras de suero. No obstante, se estandariza el método eligiendo el suero como muestra para la determinación de la peroxidación lipídica.

Se comprobó que es necesario proceder al análisis en suero obtenido inmediatamente a partir de sangre recién extraída, para obtener resultados más exactos y reproducibles. De no ser posible el procesamiento inmediato, se puede conservar la muestra a -20°C hasta el momento de la determinación con el fin de evitar el fenómeno de lipoperoxidación in vitro.

Aunque HOVING y col. (12) proponen realizar la extracción previa de los lípidos en el plasma y trabajar sobre el extracto lipídico desecado, para prevenir reacciones de liberación de MDA de aquellos compuestos no lipídicos que contengan grupos amino libre, no se consideró necesario realizar un método tan complejo al comprobar que hay una alta correlación ($r = 0,98$) entre los resultados obtenidos utilizando este método de extracción y los obtenidos directamente en suero.

2.- Calibración

Los precursores de malondialdehído más utilizados son el 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) y el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). El espectro de absorción obtenido con el TMP fue muy similar al obtenido con el TEP, como también corroboran otros autores (9, 13). Ambos precursores se hidrolizan en medio ácido, aunque más fácilmente el TMP que el TEP, proceso que se favorece con la adición de $400\ \mu\text{L}$ de HCl 1 N a la disolución madre, por lo que se pueden utilizar indistintamente ambos compuestos como patrón externo.

En este estudio se utilizó como patrón externo el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Se preparó una disolución de MDA diluyendo

20 μL de TEP en 100 mL de disolución amortiguadora de $\text{pH} = 3,5$. Con una posterior dilución al 1:10 se obtuvo una disolución con una concentración de $83,5 \mu\text{mol/L}$. A partir de esta disolución patrón se prepararon los patrones de concentraciones 0,42, 0,83, 1,67, 2,50, 4,17, 8,3 y $16,7 \mu\text{mol/L}$, con los que se realizó la calibración.

3.- Reactivos y condiciones de reacción

La mayoría de los métodos descritos se aplican a la determinación de estos productos en homogenados de tejidos. Nuestro estudio parte del método descrito por ASAKAWA y MATSUSHITA (11) en suero o plasma. La concentración de los reactivos utilizados varía de unos métodos a otros, según el tipo de muestra analizada, aunque todos coinciden en llevar a cabo la reacción en medio ácido y a alta temperatura. Si bien los reactivos empleados en el método finalmente adoptado fueron los mismos que emplea el método original de Asakawa y Matsushita, modificamos algunas condiciones de reacción.

La adición de iones Fe (III) se utiliza para optimizar la descomposición de los lipoperóxidos a MDA. Entre las sales de hierro, el $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ es eficaz a distintos pH s, en presencia de ácidos débiles y en medios alcalinos, y se comporta como catalizador de una reacción parcialmente inhibida por el BHT. La reacción de descomposición de hidroperóxidos a MDA es una reacción de radicales libres. Cuando coexisten ácidos grasos no oxidados en el medio de reacción tiene lugar una autooxidación. Para evitar la misma se añade el butil-hidroxi-tolueno (BHT) (11).

Tanto la sal de Fe (III) como el antioxidante son necesarios en la reacción del TBA cuando se prevee la existencia de ácidos grasos poliinsaturados.

La mayoría de autores enfatizan que el pH del medio es el factor más importante que afecta a la reactividad de los peróxidos de ácidos grasos con el TBA. Las condiciones de pH óptimas pueden ser determinadas en función de dos factores, la formación de productos

secundarios procedentes de la descomposición de hidroperóxidos, y la reacción de estos productos con el TBA.

Utilizamos el tampón HCl-glicocola a pH = 3,5 para crear las condiciones óptimas de pH. Este tampón es propuesto por ASAKAWA y MATSUSHITA (11), autores que apoyan su utilización, a partir de un estudio pormenorizado de varias disoluciones tampón. En su estudio lleva a cabo la reacción a varios pHs, y bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo, con la adición de tricloruro de Fe (III). Las intensidades de color más altas se obtuvieron con tres tampones: glicocola-HCl, glicocola-OHNa y acetato, siendo más nítido el color obtenido con el tampón glicocola-HCl a pH = 3,5.

Respecto al método original se ha variado el tiempo de reacción de 15 a 60 minutos a una temperatura de 95° C, para alcanzar una máxima coloración tanto en las muestras como en el TEP que se utilizó como patrón externo. Además se ha introducido un paso previo, manteniendo la mezcla de reacción a una temperatura de 5° C durante 60 minutos en la oscuridad. Este sistema de reacción conduce a resultados más reproducibles que si se procede a llevar a ebullición directamente como pudimos constatar experimentalmente (%CV = 8,3 vs. %CV = 18,6). Otros autores también proponen una etapa previa de reacción antes de llevar la mezcla de reacción hasta el punto de ebullición (14, 15), dada la mayor reproducibilidad de la técnica.

4.- Método de extracción

Para determinar el sistema de extracción idóneo probamos dos mezclas de reactivos:

MEZCLA (A): 1 mL de ácido acético conc. + 2 mL de cloroformo conc., según el método de ASAKAWA y MATSUSHITA (11).

MEZCLA (B): 0,5 mL de agua + n-butanol-piridina 15:1 (V/V) 2,5 mL, según el método de OHKAWA y col. (9).

Utilizando una mezcla de sueros como muestra control, se analizaron por duplicado diez alícuotas de la mezcla de sueros utilizando el reactivo de extracción (A) y, también por duplicado, diez alícuotas

utilizando el reactivo de extracción (B) (6,4% para la mezcla B vs. 11,87 % para la mezcla (A)), probablemente porque la mezcla cloroformo-ácido acético es más volátil, variando arbitrariamente el volumen final en el que se leen las absorbancias.

La mezcla n-butanol-piridina es propuesta también por PLACER y col (16) para incrementar la sensibilidad. OHKAWA y col. (9), aunque adoptan este medio de extracción, cuestionan la influencia de la adición de piridina sobre el espectro de absorción. Se pudo constatar un ligero incremento en la absorbancia al añadir piridina al n-butanol, por lo que concluimos que esta mezcla de disolventes orgánicos es la idónea para la extracción de los lipoperóxidos lipídicos; además el cromógeno extraído en este disolvente fue estable al menos 2 horas a temperatura ambiente.

5.- Detección y cuantificación

Para la detección y cuantificación se compararon dos métodos: espectrofotométrico, con lectura a una longitud de onda de 532 nm, y fluorimétrico, con ajuste de las longitudes de onda de excitación y emisión siguiente: $\lambda_{exc} = 515$ nm y $\lambda_{em} = 553$ nm (10). Se analizaron en ambos casos 10 muestras por duplicado. No se halló una diferencia estadísticamente significativa al comparar los resultados obtenidos por ambos métodos.

Elegimos, como la mayoría de los autores, y debido a su sencillez la determinación espectrofotométrica, aunque distintos autores proponen la cuantificación fluorimétrica en homogenados de tejidos para evitar interferencias

MÉTODO DE ANÁLISIS DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN SUERO

El método colorimétrico de TBARS propuesto por ASAKAWA y MATSUSHITA (11), modificado y optimizado en nuestro laboratorio se concreta del siguiente modo:

En tubos de ensayo de 10 mL de capacidad, se añaden respectivamente 100 μ L de suero (muestras problema), 100 μ L de H₂O destilada (muestra blanco), 100 μ L de disolución patrón (muestras patrón) o 100 μ L de disolución control (muestra control) y a continuación los siguientes reactivos en el orden que se describe:

- 1) 0,1 mL de reactivo antioxidante
- 2) 0,1 mL de reactivo catalizador
- 3) 1,5 mL de disolución tampón

Esta mezcla de reacción se mantiene 60 minutos a 5° C. Transcurrido este tiempo, se lleva a ebullición en un baño de agua a una temperatura entre 95° C y 100° C durante 60 minutos, para desarrollar la máxima coloración en todas las muestras y patrones. Los tubos se tapan con bolas de cristal como condensadores para evitar pérdidas de líquido por evaporación.

Una vez verificada la reacción, se procede a la extracción de los aductos con una disolución mezcla de 2,5 mL de una disolución de n-butanol-piridina (15:1 V/V) y 0,5 mL de agua destilada (9), enfriando previamente los tubos en un baño de hielo.

Tras mezclar y centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, las capas superiores o sobrenadantes se recogen en un tubo limpio y se procede a la lectura de las absorbancias a 532 nm, frente a un blanco de reactivos.

Tanto las muestras de suero, como las disoluciones patrones, control y blanco de reactivos, se procesan de la misma manera.

La técnica empleada se resume en la tabla siguiente:

RESUMEN DEL MÉTODO UTILIZADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIOPERÓXIDOS EN SUERO HUMANO

MUESTRA: 100 µL de suero recién obtenido

PATRON EXTERNO: hidrólisis en medio ácido

1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) → → → → Malondialdehído (MDA)

(disolución patrón de 83,5 µmol/L, de la que se obtienen los patrones de distinta concentración para la calibración)

REACTIVOS:

- 0,1 mL de disolución de Butil-hidroxi-tolueno (BHT) como antioxidante
 - 0,1 mL de disolución de Fe₃Cl₆H₂O como catalizador
 - 1,5 mL de disolución tampón glicocola-HCl de pH = 3,5
 - 1,5 mL de disolución de ácido tiobarbitúrico, como reactivo cromógeno
-

CONDICIONES DE REACCIÓN:

1ª Fase: 60 min. a 5° C en la oscuridad

2ª Fase: 60 min. a 95° C - 100° C, en baño maría

EXTRACCIÓN ADUCTOS MDA-TBA:

1. MEDIO DE EXTRACCIÓN: 2,5 mL de disolución de n-butanol-piridina (15:1 V/V) y 0,5 mL de agua destilada
 2. Mezclar y centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 min
 3. Recoger la capa superior o sobrenadante (aprox. 3 mL) en un tubo limpio
-

CUANTIFICACIÓN:

Lectura espectrofotométrica a 532 nm

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de comprobar la utilidad clínica de este método en la prevención del desarrollo de aterosclerosis en pacientes diabéticos se realizó un estudio con 56 individuos que participaron en una Campaña de Prevención de la Diabetes realizada en la Escuela de Perfeccionamiento Profesional de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (17). Este grupo estaba constituido por personas de ambos sexos que no presentaban antecedentes clínicos de interés, con edades comprendidas entre 18-65 años, con un nivel socioeconómico medio y hábitos dietéticos similares. No consumían alcohol, ni eran fumadores y tampoco estaban sometidos a ninguna medicación.

Para controlar su estado de salud se determinaron los parámetros hematológicos y bioquímicos convencionales y se excluyeron los sujetos que presentaban alguna alteración.

Los datos obtenidos indicativos del valor promedio, desviación estándar y otros resultados estadísticos se reseñan en a siguiente tabla.

**PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA PERÓXIDACIÓN LIPÍDICA
(μ moles/L) EN UNA POBLACIÓN CONTROL**

Parámetro	Resultados
Número (N)	56
Media aritmética	2'35
Mediana	2'03
Moda	1'30
Valor máximo	6'50
Valor mínimo	0'20
Intervalo	6'20
Coef. Curtosis	1'84
Coef. Asimetría	1'25
Desviación típica	1'35
%Coef. Variación	57'41

Se observa en la población control una gran dispersión (%CV = 57). Esto puede ser indicativo del diferente contenido de sistemas antioxidantes en las muestras de suero analizadas. En la Figura (1) se observa el diagrama de frecuencias de esta población, que permite observar gráficamente la distribución de la población y su grado de

dispersión.

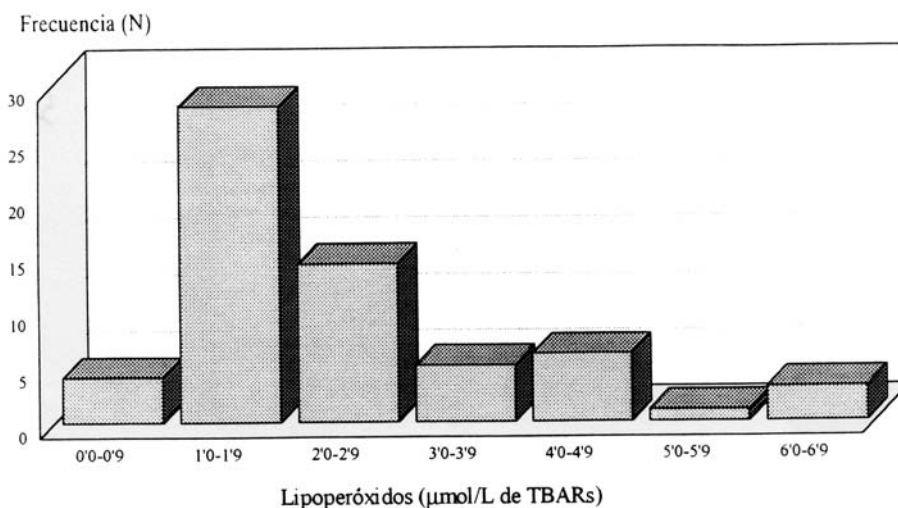


Figura 1.- Distribución de los lipoperóxidos en una población control

Teniendo en cuenta que la población control analizada por nosotros tiene una edad media de 34 ± 13 años, los resultados obtenidos ($2,35 \pm 1,35$) son inferiores a los indicados por YAGI (18) que establece una cantidad de TBARs de $3,41 \pm 0,50$ ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{moles/L}$ en individuos de edades entre 31-40 años.

HOVING y col. (12), refieren valores medios de $1,30 \pm 0,23$ $\mu\text{mol/L}$ de TBARs para una población de 24 individuos adultos sanos, con una edad media de 34 años dentro de un rango de 22-54 años. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en nuestra población ($2,35 \pm 1,35$ $\mu\text{mol/L}$) observamos que existe una diferencia estadísticamente significativa. Si seleccionamos en nuestra población el intervalo de edad estudiado por HOVING (12), es decir, individuos de edad comprendida entre 22-54 años, resulta un subgrupo de 47 individuos sanos con una cantidad media de TBARs de $1,99 \pm 0,89$ ($\bar{x} \pm s$)

$\mu\text{moles/L}$, más próxima al dato aportado por Hoving, pero que resulta todavía significativamente más alta. Esta divergencia en concreto, puede deberse a la utilización de diferentes derivados del TBA, los derivados 1,3-dietil y 1,3-difenil, en la estandarización del método de determinación de lipoperóxidos, y al empleo de extractos lipídicos en lugar de suero total. También los datos de peroxidación lipídica ($0,99 \pm 0,30 \mu\text{moles/L}$) aportados recientemente por PIECHOTA y col. (19), determinados mediante un método de cuantificación colorimétrica de MDA (malondialdehído) y 4-HNE (4-hidroxi-alquenos) comercializado por Bioxytech (19), son inferiores a los obtenidos en nuestro laboratorio. Este último método ha sido utilizado también por DIAZ (20) en la determinación en plasma de un grupo de 83 varones ($1,48 \pm 0,20 \mu\text{moles/L}$) y en un grupo de 87 mujeres ($1,33 \pm 0,21 \mu\text{moles/L}$); se obtiene una diferencia significativa entre los dos grupos de diferente sexo.

Los valores de referencia de malondialdehído obtenidos por LONDERO y col. (21) en muestras de plasma, por separación de los aductos MDA-TBA en una columna de HPLC en fase inversa C_{19} y detección espectrofluorimétrica son significativamente inferiores a los hallazgos por métodos colorimétricos ($0,85 \pm 0,25 \mu\text{moles/L}$), lo que es indicativo de la mayor especificidad de la técnica cromatográfica. Además estos autores realizan las determinaciones en plasma obtenido con EDTA como anticoagulante y ponen de manifiesto que los resultados son inferiores a los obtenidos cuando se utiliza suero o plasma heparinizado.

CONCLUSIONES

El método colorimétrico de determinación de lipoperóxidos séricos propuesta por ASAKAWA y MATSUSHITA (11) modificado y optimizado en nuestro laboratorio, permite disponer de un procedimiento analítico sencillo, rápido y fiable que se puede introducir dentro de la rutina de trabajo de un laboratorio de análisis clínicos. Los dos puntos fundamentales de optimización y de modificación del método han sido el

tiempo de reacción y el sistema de extracción de los adultos de malondialdehído y de ácido tiobarbitúrico.

Los intervalos de referencias obtenidos para una población de 34 ± 13 años son inferiores a los obtenidos en una población similar por otros autores (Yagi (18)) utilizando el método colorimétrico de ASAKAWA y MATSUSHITA ($2,35 \pm 1,35$ vs. $3,41 \pm 0,50$) lo que puede ser indicativo del incremento de especificidad obtenido al modificar el método en nuestro laboratorio.

Por otro lado, la variación interindividual en nuestra población es bastante manifiesta ($X_{\max} = 6,50$ y $X_{\min} = 0,20$). Una explicación general a la diferencia en los valores medios y a la alta dispersión de resultados es la variabilidad interindividual que ha sido hallada en diferentes trabajos (20, 22, 23) indicativa del diferente contenido en sistemas antioxidantes debido entre otros factores a la edad, sexo, dieta, estrés, herencia, hábito de fumar o no, etc., pero también a variables metodológicas, problemas relacionados con el muestreo y a las limitaciones propias de cada método. Es preciso, por tanto, considerar estos factores en el momento de establecer valores de referencia de lipoperóxidos (24, 25) y también se hace necesario proceder a la estandarización de los métodos utilizados en su determinación.

BIBLIOGRAFIA

- (1) PRATICO, D.; BARRY, O.P.; LAWSON, J.A.; ADIYAMAN, M. y col. (1998): *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (7) : 3449 – 3454.
- (2) PRYOR, W.A.; STANLEY, J.P. (1975): *Lipids* 11 : 370-379.
- (3) JANERO, D.R. (1990): *Free Radic. Biol. Med.* 9 : 515-540.
- (4) LAZZARINO, G.; TAVAZZI, B.; DI PERRO, D; VAGNOZZI, R.; PENCO, M.; GIARDINA, B. (1995): *Biol. Trace Elem. Res.*, 47 (1-3) : 165-170.
- (5) PETIT, E.; CHANCERELLE, Y.; DUMONT, E.; DIVOUX, D.; KERGONOU, F.; NOUVELOT, A. (1995a): *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36(2) : 355-364.
- (6) PETIT, E.; DIVOUX, D.; CHANCERELLE, Y.; DEKERGONOU, J.F.; NOUVELOT, A. (1995b): *Biol. Trace Elem. Res.* 47 (1-3) : 17-27.

- (7) KIKUGAWA, K.; KOJIMA, T.; YAMAKI, S.; KOSUGI, H. (1992): *Analytical Biochemistry* 202 : 249-255.
- (8) PATTON, S; KURTZ, G.W. (1951): *J. Dairy Sci.* 34: 669-674.
- (9) OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. (1979): *Anal. Biochem.* 95 : 351-358.
- (10) YAGI, K. (1976): *Biochem. Med.* 15 :212-216.
- (11) ASAKAWA, T.; MATSUSHITA, S. (1979): *Lipids* 15 (3), 1979.
- (12) HOVING, E.B.; LAING, C.; RUTGERS, H.M.; TEGGELER, M.; Van DOORMAAL, J.J.; MUSKIET, F.A.J. (1992): *Clinica Química Acta* 298: 63-76.
- (13) SINNHUBER, R.O.; YU, T.C.; CHANG, Y.T. (1958): *Food. Res.* 23 : 626-634.
- (14) KOSUGI, H.; KOJIMA, T.; KIKUGAWA, K. (1991): *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 51-55.
- (15) KIKUGAWA, K.; KOJIMA, T.; KOSUGI, H. (1991): *Eisei Kagaku (Japan)* 37 : 47-52.
- (16) PLACER, Z.A.; CUSHMAN, L.L.; JOHNSON, B.C. (1966): *Anl. Biochem.* 16 : 359-364.
- (17) ESTEPA, M.V.; RÓDENAS, S.; RAPOSO, R.; MÉNDEZ, M.T. (1995): *Análisis Clínicos*, XX, 78 – I : 28-32.
- (18) YAGI, K. (1994): *Adv. Exp. Med. Biol.* 366: 1-15.
- (19) PIECHOTA, W.; JOZEFCAK, E.; BEJM, J.; WADOWSKA, E.; TKACZEWSKI, K. (1999): *Clinical Chemistry* 45 (6) Suppl. A: 14 – 15.
- (20) DIAZ, J.; SERRANO, E.; ACOSTA, F.; CARBONELL, L.F. (1998): *Clinical Chemistry* 44 (10) : 2215 – 2216.

- (21) LONDERO, D.; LO GRECO, P. (Istituto Chimica Clinica, Udine, Italy) (1997): *G. Ital. Chim. Clin.* 21 (1) : 7 – 12.
- (22) MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.L.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. (1993): *Clin. Sci. (Lond)* 84 : 407 – 12.
- (23) KUZ'MENKO, A.I.; KLIMENKO, E.P., DONCHENKO, G.V. (1997): *Bull. Exp. Biol. Med.* 124 (9) : 885 – 887.
- (24) IFCC (1983): *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21 : 749 – 60.
- (25) SOLBERG, H.E. (1994): Establishment and use of reference values. In: Bustis, C.A.; Ashwood, E.R., eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders : 454 – 84.