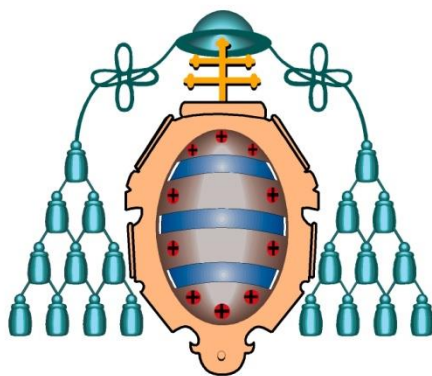

Universidad de Oviedo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Biología Funcional y Molecular

Tesis Doctoral



**Valor de Referencia del Cambio en el Diagnóstico
y Seguimiento de los Factores Bioquímicos de
Riesgo Cardiovascular en Pacientes con
Enfermedad Renal Crónica Terminal**

Zoraida Corte Arboleya

2015



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: VALOR DE REFERENCIA DEL CAMBIO EN EL SEGUIMIENTO DE LOS FACTORES BIOQUÍMICOS DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA TERMINAL.	Inglés: REFERENCE CHANGE VALUE IN THE MONITORING OF BIOCHEMICAL CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN END-STAGE RENAL DISEASE PATIENTS.

2.- Autor	
Nombre: ZORAIDA CORTE ARBOLEYA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología funcional y molecular (interdepartamental)	
Órgano responsable: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	

RESUMEN (en español)

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbi-mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT), observándose una tasa de mortalidad cardiovascular entre 10 y 20 veces superior al de la población general. Este incremento del riesgo cardiovascular tiene una etiología multifactorial, asociándose a la elevada prevalencia y al efecto acumulativo de factores de riesgo convencionales, no convencionales y específicos de la uremia. En este contexto, una correcta interpretación de los resultados de los principales factores bioquímicos de riesgo cardiovascular (FBRCV), tanto en la población general como en pacientes con ERCT, será clave para el seguimiento de individuos de alto riesgo, y esto debería llevarse a cabo desde el conocimiento de su variación biológica (VB).

En esta tesis doctoral hemos aplicado un modelo experimental simplificado, basado en el análisis por duplicado de sólo una de las muestras de cada sujeto, para la estimación de los componentes de VB de los principales FBRCV, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos y, a partir de estos datos, se han calculado los valores de referencia del cambio (VRC) más apropiados para cada magnitud. Así mismo, se ha evaluado la influencia de la ERCT y del periodo de permanencia en hemodiálisis (HD) en la concentración y VB de los FBRCV a estudio. Para ello se obtuvieron muestras de 18 pacientes con ERCT clínicamente estable, mensualmente durante un periodo de 6 meses; y de 11 sujetos aparentemente sanos, una vez por semana durante 5 semanas consecutivas. La estimación de los datos de VB se realizó mediante un análisis de la varianza.

El método desarrollado para el estudio de la VB parece estimar de forma fiable tanto los coeficientes de variación intra-individuales (CV_I) como los VRC, al tiempo que permite reducir la carga analítica; condicionante fundamental para el estudio de magnitudes con largos tiempos de análisis como los aminoácidos libres plasmáticos (AA). Los FBRCV evaluados presentan CV_I relativamente bajos en relación a sus coeficientes de variación inter-individuales (CV_G), con valores, en general, inferiores al 20%, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos.



Por otra parte, mientras que un mayor periodo en HD parece estar relacionado con un incremento en la concentración de proteína C reactiva (PCR), troponina T (us-TnT) y hormona paratiroidea intacta (PTHi), y con una disminución de la concentración de colesterol total y colesterol HDL; no se observó efecto alguno sobre sus datos de VB. Por el contrario, nuestros resultados indican que la ERCT modifica el patrón de VB de la us-TnT y la PTHi; por lo que, para un adecuado seguimiento clínico de estos pacientes, deberían emplearse los VRC derivados de sus propios datos de VB. Para el resto de FBRCV, la ERCT no altera la naturaleza de su VB, lo que justificaría el uso de los VRC derivados de individuos sanos.

El empleo de los VRC asimétricos bidireccionales calculados para los lípidos y las lipoproteínas, la PCR, la ferritina y la PTHi, permite evaluar de una forma más apropiada la respuesta al tratamiento de los pacientes con dislipemia, déficits de hierro, inflamación o hiperparatiroidismo secundario, respectivamente; tanto en pacientes con ERCT como en la población general. Para la detección y monitorización del síndrome coronario agudo, así como del estado vitamínico, deberían emplearse los VRC asimétricos unidireccionales calculados para la hs-TnT y las vitaminas B12, folato y 25-OH-vitamina D; mientras que para el seguimiento del estado nutricional, los VRC de elección serían los simétricos unidireccionales calculados para la albúmina, y los simétricos bidireccionales estimados para la transferrina y los AA.

Por último, la utilidad práctica de los VRC calculados en el seguimiento clínico de los pacientes con ERCT fue evaluada en una cohorte independiente de 47 pacientes; los cuales fueron monitorizados tanto bioquímica como clínicamente durante un periodo de 9 meses. Los resultados obtenidos reflejan que el empleo de los VRC calculados proporciona un adecuado rendimiento diagnóstico para la monitorización de los pacientes con ERCT.

RESUMEN (en Inglés)

Cardiovascular diseases are the most important cause of morbidity and mortality in end-stage renal disease (ESRD) patients, with a reported mortality rate 10 to 20 times higher than in the general population. This increased cardiovascular risk has a multifactorial etiology, being associated with the high prevalence and the cumulative effect of conventional, unconventional and uremia-related risk factors. In this context, a correct interpretation of the results of the main biochemical cardiovascular risk factors (BCRF) in both general population and ESRD patients, will be essential for a suitable monitoring of high-risk individuals, and that should be performed through their biological variation (BV).

In this dissertation we have applied a simplified experimental model, based on duplicate analysis of only one of the samples per subject, to estimate the long-term BV data of the main BCRF in ESRD patients and in healthy individuals. These data were used to define the most appropriate reference change values (RCV) for each marker, and the impact of ESRD and the



duration of hemodialysis (HD) treatment on the BCRF concentrations or the BV data have also been evaluated. For this purpose, samples were collected from 18 ESRD patients in steady-state conditions, one per month for 6 months; and from 11 healthy volunteers at weekly intervals over 5 weeks. BV data were derived using analysis of variance.

The experimental model developed for the study of BV seems to estimate reliably both within-subject coefficients of variation (CV_i) and the RCV, while reducing the analytical burden; essential for markers with long analytical run times as free plasma amino acids (AA). The BCRF showed relatively low CV_i in relation to their between-subject coefficients of variation (CV_G), with most values lower than 20%, in both ESRD patients and healthy individuals. Likewise, while a longer period in HD seems to be related to increases in plasma C-reactive protein (CRP), troponin T (hs-TnT) and intact parathyroid hormone (PTHi) concentrations, and decreases in total and HDL cholesterol; no effect was observed on the BV data. On the contrary, our results indicate that ESRD modifies the variation of hs-TnT and PTHi around their homeostatic set-points, therefore, for an appropriate clinical management of ESRD patients, RCV derived from their own BV data should be used. For the remaining BCRF, ESRD do not change the pattern of their BV, supporting the use of RCV derived from healthy individuals.

The use of the bidirectional asymmetric RCV calculated for lipids and lipoproteins, CRP, hs-TnT and PTHi, allow a more appropriate assessment of the effect of treatment in patients with dyslipemia, iron deficiencies, inflammation or secondary hyperparathyroidism, respectively, in both ESRD patients and general population. To detect and monitoring an acute coronary syndrome, as well as vitamin deficiencies, the unidirectional asymmetric RCV calculated for hs-TnT and vitamins B12, folate and 25-OH-vitamin D, should be used. For monitoring the nutritional status, the RCV of election would be the unidirectional symmetrical calculated for serum albumin and the bidirectional symmetrical estimated for serum transferrin and plasma AA.

Finally, the practical utility of the derived RCV in the clinical setting was evaluated in an independent cohort of 47 ESRD patients; which were both biochemically and clinically monitored during a period of 9 months. The results showed that the use of the derived RCV provides an adequate diagnostic performance for the clinical management of ESRD patients.

A mis Padres y mi Marido

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Rafael Venta Obaya, por permitirme realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, y por su generosidad a la hora de compartir sus conocimientos y su tiempo, estando siempre ahí cuando le he necesitado. Por mostrarme su confianza y su apoyo de forma constante a lo largo de estos años, empujándome siempre a aspirar a más, a conseguir más. Por todo, gracias maestro.

A todas las personas que se prestaron a convertirse en sujetos de este estudio, por mostrarme su confianza desde el primer momento y colaborar en todo lo que estaba en su mano.

Al personal clínico y de enfermería del Servicio de Nefrología del Hospital San Agustín de Avilés, por su inestimable colaboración y asesoramiento.

A todo el personal facultativo, administrativo, técnico y de enfermería del Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital San Agustín de Avilés; compañeros, amigos, familia. Por su cariño, confianza, y apoyo constante; no solo durante la realización de este trabajo, sino a lo largo de estos años. Porque no sería quién soy hoy en día, si no hubieseis formado parte de mi vida.

A mis amigos, por animarme, apoyarme y soportar mis ausencias. En especial me gustaría darle las gracias a Gracia Valcárcel, compañera y amiga. Este viaje hubiese sido mucho más difícil si no hubieses estado a mi lado.

A mi familia y marido, por creer en mí y ayudarme siempre en todo lo que estaba en vuestra mano. Por ser los pilares que sustenta mi vida y porque sin vosotros nada de esto hubiese sido posible.

A todos, muchas gracias.

Abreviaturas

5-metilTHF	5-metiltetrahidrofolato
ACV	Accidente cerebrovascular
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ALT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de la varianza
AST	Aspartato aminotransferasa
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ca²⁺	Iones calcio
CaR	Receptor-sensor de calcio
CE	Colesterol esterasa
CEA	Antígeno carcinoembrionario
c-HDL	Colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad
c-IDL	Colesterol unido a lipoproteínas de densidad intermedia
CKD-EPI	<i>Chronic kidney disease epidemiology collaboration</i>
c-LDL	Colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad
CMLV	Células musculares lisas
c-noHDL	Colesterol no ligado a lipoproteínas de alta densidad
COD	Colesterol oxidasa
CT	Colesterol total
CV_A	Coefficiente de variación analítica
CV_G	Coefficiente de variación interindividual
CV_I	Coefficiente de variación intraindividual
c-VLDL	Colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad
CV_T	Coefficiente de variación total
CV_{TI}	Coefficiente de variación total
DEP	Desgaste proteico energético
DM	Diabetes mellitus
DP	Diálisis peritoneal

DS	Desviación estándar
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EPIRCE	Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España
EPO	Eritropoyetina
ERC	Enfermedad renal crónica
ERCT	Enfermedad renal crónica terminal
ES	Error sistemático
ET	Error total
FAV	Fístula arteriovenosa
FBRCV	Factores bioquímicos de riesgo cardiovascular
FG	Filtrado glomerular
FGF-23	Factor de crecimiento fibroblástico 23
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HD	Hemodiálisis
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSDA	N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica
HTA	Hipertensión arterial
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
IAM	Infarto agudo de miocardio
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
II	Índice de Individualidad
IL	Interleucinas
IMC	Índice de masa corporal
IQR	Rango intercuartílico
IR	Intervalo de Referencia
IS	Estándar interno
ISRNM	<i>International Society of Renal Nutrition and Metabolism</i>
K/DOQI	<i>National kidney foundation's kidney disease outcomes quality initiative</i>
KDIGO	<i>Kidney disease improving global outcomes</i>

LB	Límite del blanco
LC	Límite de cuantificación
LD_I	Límite inferior de detección
LD_S	Límite superior de detección
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
Mg²⁺	Iones magnesio
NCEP	<i>National cholesterol education program</i>
NHANES III	<i>Third National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Presión arterial
PCR	Proteína C reactiva
PEG	Polietilenglicol
PITC	Fenilisotiocianato
POD	Peroxidasa
PSA	Antígeno prostático específico
PTC	Feniltiocarbamil
PTH	Hormona paratiroidea
PTHa	Amino hormona paratiroidea
PTHc	Fragmentos carboxi-terminales de la hormona paratiroidea
PTHi	Hormona paratiroidea intacta
RCV	Riesgo cardiovascular
REER	Registro Español de Enfermos Renales
RF	Factor de Respuesta
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RR	Riesgo relativo
SCA	Síndrome coronario agudo
SCR	Síndrome cardiorrenal
SD_A²	Varianza analítica intraserie
SD_G²	Varianza inter-individual

SD_I²	Varianza intraindividual
SD_{TI}²	Varianza total intraindividual
Se	Sensibilidad
SEN	Sociedad Española de Nefrología
Sp	Especificidad
ST	Saturación de transferrina
STD	Estándar de trabajo
TG	Triglicéridos
TnC	Troponina C
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
TSR	Tratamiento sustitutivo renal
us-TnI	Troponina I ultrasensible
us-TnT	Troponina T ultrasensible
UV	Ultravioleta
V_A	Variación analítica
VB	Variación biológica aleatoria
VB_G	Variación biológica interindividual
VB_I	Variación biológica intraindividual
VDR	Receptor de vitamina D
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VR	Valores de referencia
VRC	Valor de Referencia del Cambio

Índice

Introducción	21
Capítulo 1. Enfermedad Renal Crónica	23
1. Enfermedad Renal Crónica: Conceptos Generales	23
1.1. Definición.....	23
1.2. Clasificación.....	24
1.3. Diagnóstico de la Enfermedad Renal Crónica.....	25
1.3.1. Cronicidad y Causa.....	25
1.3.2. Estimación del Filtrado Glomerular.....	26
1.3.3. Medida de la Albuminuria.....	28
2. Epidemiología, Etiología y Factores de Riesgo de la Enfermedad Renal Crónica	29
2.1. Epidemiología.....	29
2.2. Etiología de la Enfermedad Renal Crónica en Adultos.....	30
2.3. Factores de Riesgo.....	31
3. Mecanismos de Progresión de la Enfermedad Renal Crónica	33
4. Tratamiento Sustitutivo Renal en la Enfermedad Renal Crónica Terminal	34
4.1. Diálisis Peritoneal.....	35
4.2. Hemodiálisis.....	36
4.2.1. Principios Físicos de la Diálisis.....	36
4.2.2. Elementos de la Diálisis.....	37
4.3.3. Complicaciones de la Hemodiálisis Crónica.....	39
4.3.3.1. Complicaciones Agudas de la Hemodiálisis.....	39
4.3.3.2. Complicaciones Crónicas de la Hemodiálisis.....	41
Capítulo 2. Enfermedad Renal Crónica y Patología Cardiovascular	42
1. Epidemiología	42
2. Síndrome Cardiorrenal	44

2.1. Fisiopatología del Síndrome Cardiorenal.....	45
3. Fisiopatología de las Alteraciones Cardiovasculares en la Enfermedad Renal Crónica.....	47
3.1. Disfunción Endotelial.....	47
3.1.1. Fisiología del Endotelio Vascular.....	47
3.1.2. Disfunción Endotelial en la Enfermedad Renal Crónica.....	49
3.2. Aterosclerosis.....	50
3.2.1. Definición y Etiopatogenia.....	50
3.2.2. Aterosclerosis en la Enfermedad Renal Crónica.....	53
3.3. Calcificaciones Vasculares.....	53
3.3.1. Definición, Clasificación y Fisiopatología.....	53
3.3.2. Calcificaciones Vasculares, Riesgo Cardiovascular y Enfermedad Renal Crónica.....	55
Capítulo 3. Factores de Riesgo Cardiovascular en la Enfermedad Renal Crónica.....	56
1. Factores de Riesgo Cardiovascular Convencionales.....	56
1.1. Tabaquismo.....	56
1.2. Obesidad.....	56
1.3. Hipertensión Arterial.....	57
1.4. Diabetes.....	58
1.5. Dislipemia.....	58
2. Factores de Riesgo Cardiovascular No Convencionales.....	61
2.1. Inflamación.....	61
2.1.1. Inflamación y Aterogénesis.....	61
2.1.2. Principales Marcadores Bioquímicos de Inflamación: Proteína C Reactiva.....	62
2.1.3. Inflamación, Enfermedad Renal Crónica y Enfermedad Cardiovascular.....	63
2.4. Troponina.....	65
2.4.1. Descripción, Fisiología y Métodos de Medida.....	65
2.4.2. Troponina como Marcador de Daño Miocárdico.....	67

2.4.3. Troponina en la Enfermedad Renal Crónica Terminal.....	69
3. Factores de Riesgo Cardiovascular Específicos de la uremia.....	70
3.1. Trastornos Nutricionales en la Enfermedad Renal Crónica.....	70
3.1.1. Desgaste Proteico Energético y Enfermedad Cardiovascular.....	70
3.1.2. Prevalencia del Desgaste Proteico Energético en la Enfermedad Renal Crónica.....	71
3.1.3. Mecanismos Implicados y Criterios Diagnósticos del Desgaste Proteico Energético.....	72
3.1.4. Marcadores Bioquímicos del Desgaste Proteico Energético.....	73
3.1.2.1. Albúmina.....	73
3.1.2.2. Transferrina.....	74
3.1.2.4. Colesterol.....	75
3.1.2.5. Perfil de Aminoácidos Libres Plasmáticos.....	75
3.2. Anemia en la Enfermedad Renal Crónica.....	77
3.2.1. Anemia y Riesgo Cardiovascular en la Enfermedad Renal Crónica.....	77
3.2.2. Prevalencia de la Anemia en la Enfermedad Renal Crónica.....	78
3.2.3. Definición y Etiología de la Anemia en la Enfermedad Renal Crónica.....	79
3.2.4. Principales Marcadores Bioquímicos de Anemia.....	81
3.2.4.1. Hierro.....	81
3.2.4.2. Transferrina y Saturación de Transferrina.....	81
3.2.4.3. Ferritina.....	82
3.2.4.4. Vitamina B12.....	83
3.2.4.5. Ácido Fólico.....	83
3.3. Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral.....	84
3.3.1. Implicaciones Clínicas de las Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral.....	85
3.3.2. Prevalencia de las Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral en la Enfermedad Renal Crónica.....	85

3.3.3.	Fisiopatología de las Alteraciones Óseo-Minerales.....	86
3.3.3.1.	Eje Calcio-Fosfato-Hormona Paratiroidea.....	86
3.3.3.2.	Hiperparatiroidismo Secundario.....	87
3.3.4.	Criterios Diagnósticos.....	88
3.3.5.	Principales Marcadores Bioquímicos de las Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral.....	89
3.3.4.1.	Calcio.....	89
3.3.4.2.	Fosfato.....	90
3.3.4.3.	Hormona Paratiroidea.....	90
3.3.4.4.	Vitamina D.....	92
Capítulo 4. Variación Biológica: Implicaciones en la Práctica Clínica.....		93
1.	Naturaleza de la Variabilidad Biológica.....	93
1.1.	Variabilidad Fisiológica.....	93
1.1.1.	Factores No Modificables.....	93
1.1.2.	Factores Modificables.....	94
1.2.	Variabilidad Patológica.....	95
1.3.	Variabilidad Iatrogénica.....	95
1.4.	Variación Biológica Aleatoria.....	96
2.	Estimación de los Datos de Variación Biológica.....	98
3.	Bases de Datos Internacionales de Variación Biológica.....	99
4.	Aplicaciones de los Datos de Variación Biológica.....	102
4.1.	Especificaciones de Calidad.....	102
4.1.1.	Definiciones y Conceptos.....	102
4.1.2.	Especificaciones de Calidad para la Imprecisión Basadas en la Variación Biológica.....	104
4.1.3.	Especificaciones de Calidad para el Error Sistemático Basadas en la Variación Biológica.....	105
4.1.4.	Especificaciones de Calidad para el Error Total Basadas en la Variación Biológica.....	106

4.2. Evaluación de la Utilidad de los Valores de Referencia Poblacionales.....	107
4.2.1. Definiciones y Concepto de Valores de Referencia.....	107
4.2.2. Limitaciones de los Valores de Referencia Poblacionales. Índice de Individualidad.....	108
4.3. Interpretación del Significado Clínico de Cambios en una Serie de Resultados. Valor de Referencia del Cambio.....	109
4.3.1. Definición y Cálculo del Valor de Referencia del Cambio.....	109
4.3.2. Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento de Pacientes.....	111
Hipótesis de Trabajo y Objetivos.....	113
Material y Métodos.....	117
Capítulo 5. Diseño del Estudio de Variación Biológica.....	119
1. Características del Diseño Experimental.....	119
2. Sujetos.....	119
2.1. Pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal.....	119
2.2. Individuos Sanos.....	120
3. Muestras.....	122
Capítulo 6. Métodos Analíticos.....	123
1. Consideraciones Generales.....	123
2. Métodos Analíticos para la Determinación de Lípidos y Lipoproteínas, Proteínas Plasmáticas y Minerales.....	123
2.1. Instrumentación.....	123
2.2. Métodos Analíticos para la Determinación de Lípidos y Lipoproteínas.....	123
2.2.1. Descripción de los Métodos Analíticos.....	123
2.2.1.1. Colesterol Total.....	124
2.2.1.2. Colesterol LDL.....	124
2.2.1.3. Colesterol HDL.....	124

2.2.1.4.	Colesterol VLDL y noHDL.....	125
2.2.1.5.	Triglicéridos.....	125
2.2.2.	Características de Practicabilidad y Requerimientos Analíticos....	125
2.3.	Métodos Analíticos para la Determinación de las Proteínas Plasmáticas...	126
2.3.1.	Descripción de los Métodos Analíticos.....	126
2.3.1.1.	Albúmina.....	127
2.3.1.2.	Transferrina, Ferritina y Proteína C Reactiva.....	127
2.3.2.	Características de Practicabilidad.....	127
2.4.	Métodos Analíticos para la Determinación de los Minerales Calcio y Fosfato.....	128
2.4.1.	Descripción de los Métodos Analíticos.....	128
2.4.1.1.	Calcio.....	128
2.4.1.2.	Fosfato.....	128
2.5.	Calibradores y Controles.....	128
2.6.	Intervalos de Referencia.....	129
3.	Métodos Analíticos para la Determinación de Troponina T, Hormona Paratiroidea y Vitaminas Plasmáticas.....	130
3.1.	Instrumentación.....	130
3.2.	Descripción de los Métodos Analíticos.....	130
3.2.1.	Troponina T Ultrasensible.....	130
3.2.2.	Hormona Paratiroidea.....	130
3.2.3.	25-OH-Vitamina D.....	131
3.2.4.	Vitamina B12.....	131
3.2.5.	Folato.....	132
3.3.	Controles.....	132

3.4. Intervalos de Referencia y Valores Recomendados.....	132
4. Método Analítico para la Determinación de los Aminoácidos Libres Plasmáticos.....	133
4.1. Reactivos.....	133
4.2. Instrumentación.....	134
4.3. Calibradores y Controles.....	134
4.4. Tratamiento Preanalítico de las Muestras.....	135
4.5. Separación Cromatográfica.....	136
Capítulo 7. Estimación de los Datos de Variación Biológica y Parámetros Derivados.....	137
1. Estimación de los Componentes de Variación Biológica.....	137
2. Evaluación de la Estimación de los Datos de Variación Biológica.....	138
3. Cálculo de los Parámetros Derivados de los Datos de Variación Biológica.....	138
3.1. Especificaciones de Calidad.....	139
3.2. Índice de Individualidad.....	139
3.3. Valor de Referencia del Cambio.....	139
Capítulo 8. Evaluación Práctica de la Utilidad de los Valores de Referencia del Cambio.....	141
1. Sujetos y Protocolo de Seguimiento Bioquímico y Clínico.....	141
1.1. Monitorización Bioquímica.....	141
1.2. Monitorización Clínica.....	141
2. Diseño del Estudio.....	143
Capítulo 9. Estudio Estadístico de los Datos.....	144
Resultados.....	145
Capítulo 10. Datos de Variación Biológica.....	147

1. Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular Convencionales: Lípidos y Lipoproteínas Séricas.....	147
2. Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular No Convencionales.....	154
2.1. Datos de Variación Biológica de la Proteína C Reactiva.....	154
2.2. Datos de Variación Biológica de la Troponina T.....	157
3. Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular Específicos de la Uremia	160
3.1. Marcadores Bioquímicos del Desgaste Proteico Energético.....	160
3.1.1. Datos de Variación Biológica de la Albúmina y la Transferrina.....	160
3.1.2. Datos de Variación Biológica de los Aminoácidos Libres Plasmáticos.....	163
3.2. Marcadores Bioquímicos de Anemia.....	172
3.2.1. Datos de Variación Biológica de la Ferritina.....	172
3.2.2. Datos de Variación Biológica de la Vitamina B12 y el Folato.....	175
3.3. Marcadores Bioquímicos de Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral..	178
3.3.1. Datos de Variación Biológica del Calcio y el Fosfato.....	178
3.3.2. Datos de Variación Biológica de la Hormona Paratiroidea y la 25-OH-Vitamina D.....	182
Capítulo 11. Efecto del Tiempo en Tratamiento de Hemodiálisis sobre los Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular.....	186
Capítulo 12. Utilidad Práctica de los Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento de los Pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal..	192
1. Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular en Pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal No Estable.....	192
3. Aplicación Práctica de los Valores de Referencia del Cambio.....	200
3.1. Rendimiento Diagnóstico de los Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento del Estado Cardiovascular.....	200
3.2. Rendimiento Diagnóstico de los Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento del Estado Nutricional.....	203

3.3. Rendimiento Diagnóstico de los Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento del Estado del Metabolismo Óseo-Mineral.....	208
Discusión.....	215
Capítulo 13. Diseño Experimental y Limitaciones del Estudio de Variación Biológica.....	217
Capítulo 14. Variación Biológica de los Lípidos y las Lipoproteínas Séricas	221
Capítulo 15. Variación Biológica de los Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular No Convencionales.....	224
1. Proteína C Reactiva.....	224
2. Troponina T Ultrasensible.....	226
Capítulo 16. Variación Biológica de los Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular Específicos de la Uremia.....	230
1. Marcadores Bioquímicos de Desgaste Proteico-Energético.....	230
2. Marcadores Bioquímicos de Anemia.....	235
3. Marcadores Bioquímicos del Metabolismo Óseo-Mineral.....	238
Capítulo 17. Utilidad Práctica de los Valores de Referencia del Cambio.....	242
Conclusiones.....	247
Bibliografía.....	253
Anexo I. Publicaciones.....	285

Introducción

Capítulo 1. Enfermedad Renal Crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial. La manifestación más avanzada de la ERC, la ERC terminal (ERCT), y la consiguiente necesidad de tratamiento sustitutivo renal (TSR) mediante diálisis o trasplante renal, presenta una incidencia y prevalencia crecientes en las últimas décadas¹. La visión epidemiológica de la ERC ha experimentado un cambio significativo en los últimos 20 años. Restringida inicialmente a patologías de incidencia relativamente baja, como las enfermedades glomerulares o las nefropatías hereditarias, en la actualidad la ERC afecta a un porcentaje significativo de la población debido, fundamentalmente, a su estrecha relación con estados o enfermedades de alta prevalencia, como el envejecimiento, la hipertensión arterial (HTA), la diabetes mellitus (DM) o las enfermedades cardiovasculares (ECV).

1. Enfermedad Renal Crónica: Conceptos Generales

1.1. Definición

La ERC es una enfermedad de etiología diversa y manifestaciones clínicas muy variadas, caracterizada por una pérdida progresiva e irreversible de la función renal, y en la que pueden verse afectados la mayor parte de órganos y sistemas, lo cual es un reflejo de la complejidad de las funciones que desempeña el riñón en condiciones fisiológicas, así como de las severas consecuencias que comporta la disfunción renal.

En el año 2002, la publicación de las guías K/DOQI (*National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*) para la Evaluación, Definición y Clasificación de la ERC, supuso un paso importante en el reconocimiento de la verdadera relevancia de la enfermedad, promoviéndose, por primera vez, una clasificación basada en estadios de severidad definidos por el filtrado glomerular (FG), independientemente de la etiología de la enfermedad renal². En 2003, se fundó la organización *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), como un grupo de expertos internacional e independiente para el desarrollo de iniciativas para la prevención y manejo de la ERC. En el año 2005 se publicó la primera guía KDIGO sobre la definición y clasificación de la ERC³, en la que se ratificaba el enfoque de las guías K/DOQI de 2002. La reciente actualización de las guías K/DOQI, publicada en

el año 2013, mantiene, con mínimas modificaciones, la definición propuesta previamente^{4,5}.

De esta forma, e independientemente del trastorno específico que ocasione la lesión, la ERC se define como la presencia de alteraciones en la estructura o función renal durante al menos tres meses y con implicaciones para la salud. El término "con implicaciones para la salud", añadido en la última versión de estas guías, refleja la posibilidad de que puedan existir determinadas alteraciones renales estructurales o funcionales que no conlleven consecuencias pronósticas (por ejemplo, un quiste renal simple). Los criterios para el diagnóstico de las alteraciones renales se recogen en la **Tabla 1**.

Criterios de ERC^a (cualquiera de los siguientes durante > 3 meses)	
Marcadores de Daño Renal	Albuminuria elevada
	Alteraciones del sedimento urinario
	Alteraciones electrolíticas u otras alteraciones de origen tubular
	Alteraciones estructurales histológicas
	Alteraciones estructurales en pruebas de imagen
	Trasplante renal
FG^b disminuido	FG ^b < 60 mL/min/1.73m ²

Tabla 1. Criterios Diagnósticos de la Enfermedad Renal Crónica. Adaptado de Gorostidi et al⁵. ERC^a, enfermedad renal crónica; FG^b, filtrado glomerular.

1.2. Clasificación

Clásicamente, la ERC ha sido clasificada en 5 estadios en función del valor del FG y la etiología de la enfermedad renal. Sin embargo, la última actualización de las guías KDIGO establece una nueva clasificación pronóstica de la ERC, en la que se añade un nuevo criterio de clasificación: la concentración de albuminuria⁴. Estas nuevas recomendaciones se basan en los resultados de distintos estudios clínicos, en los que se incluyeron tanto sujetos sanos, como individuos con riesgo de desarrollar ERC y pacientes con ERC. Estos estudios muestran la relevancia de la albuminuria en la patogenia de la progresión de la ERC, así como su relación con el pronóstico renal y con la mortalidad global y cardiovascular, de modo independiente al FG y a otros factores de riesgo clásicos de ECV^{6,7}.

La clasificación propuesta en las guías KDIGO contempla una división de seis categorías de riesgo en función del FG (G1-G5), que se complementan con tres categorías de riesgo según la concentración de albuminuria (**Tabla 2**)⁴.

Categorías del FG ^a		
Categoría	FG ^a (mL/min/1.73m ²)	Descripción
G1	≥90	Normal o elevado
G2	60-89	Ligeramente disminuido
G3a	45-59	Ligera a moderadamente disminuido
G3b	30-44	Moderada a gravemente disminuido
G4	15-29	Gravemente disminuido
G5	<15	Fallo renal
Categorías de Albuminuria		
Categoría	Cociente A/C ^b (mg/g)	Descripción
A1	<30	Normal a ligeramente elevada
A2	30-300	Moderadamente elevada
A3	>300	Muy elevada

Tabla 2. Clasificación en grados de la enfermedad renal crónica. Adaptado de Gorostidi et al⁵. FG^a, filtrado glomerular; A/C^b, cociente albúmina/creatinina calculado en una muestra de orina aislada (muestra recomendada).

1.3. Diagnóstico de la Enfermedad Renal Crónica

Los objetivos básicos para la aproximación al paciente con ERC son el estudio de la cronicidad y de la causa, la estimación del FG y la evaluación de la albuminuria.

1.3.1. Cronicidad y Causa

La **cronicidad** se verificará de forma retrospectiva, revisando la historia clínica previa del paciente, o bien, cuando no se dispongan de datos previos, de forma prospectiva. La **causa** se determinará en función de la presencia o ausencia de una enfermedad sistémica con potencial afectación renal, o mediante la constatación de alteraciones anatomopatológicas observadas o presuntas. Además, se deberá tener en cuenta los antecedentes familiares de enfermedad renal, la toma mantenida de fármacos nefrotóxicos, los factores medioambientales (contacto con plomo o mercurio) y las pruebas de imagen^{4,5-8}.

1.3.2. Estimación del Filtrado Glomerular

El **FG** se considera el mejor marcador disponible para la evaluación de la función renal, siendo una herramienta de utilidad no solo para el diagnóstico de ERC, sino también para monitorizar su progresión, prevenir complicaciones y realizar ajustes de dosis de fármacos nefrotóxicos⁹.

La estimación del FG mediante el **aclaramiento de creatinina**, calculado a partir de la concentración de creatinina sérica y de su excreción en orina de 24h, presenta una serie de limitaciones importantes, entre las que destacan los frecuentes errores en la recogida de orina de 24h, especialmente en niños y ancianos, y, fundamentalmente, la sobreestimación del FG debido a la secreción de creatinina a nivel del túbulo proximal. Dicha secreción es variable, tanto para un mismo individuo como entre individuos, y aumenta a medida que disminuye el FG^{9,10}. El aclaramiento de creatinina carece de la precisión necesaria para la adecuada estimación del FG, por lo que no está indicada para el estudio de la función renal, si bien puede ser de utilidad ante otros cuadros clínicos como los estudios metabólicos de litiasis o el cálculo de la función renal residual en pacientes en diálisis^{8,9,10}. Por lo tanto, la mayoría de las guías clínicas nacionales e internacionales recomiendan la estimación del FG mediante la aplicación de ecuaciones basadas en la concentración sérica de creatinina y variables antropométricas y demográficas (edad, sexo, peso, talla y etnia) como factores predictivos de la masa muscular^{4,8,9}. Entre las más de 40 ecuaciones publicadas hasta la fecha, las más utilizadas y validadas entre distintos grupos de población son la ecuación de *Cockcroft-Gault* y el conjunto de ecuaciones derivadas del estudio *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD)^{8,9}.

Publicada en 1976, la **ecuación de Cockcroft-Gault** fue desarrollada, a partir de una población de 236 individuos adultos con predominio de sexo masculino, para predecir el aclaramiento de creatinina. Esta ecuación relaciona la concentración sérica de creatinina con el peso, la edad y el sexo, siendo necesario ajustar el resultado a la superficie corporal para obtener una estimación del FG (**Tabla 3**)^{9,11}. La principal desventaja de esta fórmula es que, al emplear el aclaramiento de creatinina como método de referencia, sobrestima sistemáticamente el FG hasta en un 23%. Además, al incluir el peso, sobrestima la función renal en individuos obesos, mientras que infraestima el FG en ancianos¹⁰.

Las **ecuaciones del estudio MDRD** se desarrollaron en 1999 a partir de un estudio multicéntrico en el que se evaluaba el efecto de la restricción proteica en la dieta sobre

la progresión de la enfermedad renal. El objetivo de este estudio fue obtener una ecuación que estimara el FG y mejorara la ecuación de *Cockcroft-Gault*, empleando como método de referencia el aclaramiento de iotalamato^{9,11,12,13,14}. La fórmula más precisa extraída de este estudio fue la ecuación MDRD-6, la cual incluía parámetros demográficos (edad, sexo, etnia) y séricos (concentraciones de creatinina, urea y albúmina). El mismo grupo publicó un año después una versión abreviada de esta fórmula que incluía únicamente 4 variables (concentración de creatinina, edad, sexo y etnia), manteniendo la misma eficacia diagnóstica que la fórmula original, pero de más fácil aplicación. En el año 2007 la **ecuación MDRD-4** fue reevaluada para su empleo en aquellos laboratorios en los que el método de medida de la creatinina sérica presentara trazabilidad con el método de referencia, la espectrometría de masas con dilución isotópica (IDMS) (**Tabla 3**)¹⁵.

Ecuación de Cockcroft-Gault
$FG^a = [(140 - \text{edad}) \times (\text{peso en Kg}) \times (0,85 \text{ si mujer})] / [72 \times \text{Creatinina (mg/dL)}] \times 1,73$
Ecuación MDRD^b-IDMS^c
$FG^a = 175 \times \text{Creatinina (mg/dL)}^{-1,154} \times \text{edad}^{-0,203} \times (0,742 \text{ si es mujer}) \times (1,21 \text{ si es de raza negra})$

Tabla 3. Ecuaciones de Cockcroft-Gault y MDRD-IDMS para la estimación del filtrado glomerular. FG^a, filtrado glomerular estimado (mL/min/1.73 m²); MDRD^b, *Modification of Diet in Renal Disease*; IDMS^c, espectrometría de masas-dilución isotópica; Edad en años.

En el año 2009 el grupo CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*), dependiente del *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease* (NIDDK), publicó una nueva ecuación para la estimación del FG con la que pretendían mejorar la precisión y la sensibilidad de las ecuaciones disponibles hasta la fecha. Esta **ecuación**, denominada **CKD-EPI**, fue desarrollada y validada a partir de un pool de datos derivados de 26 estudios (12.150 individuos), en los que se empleaba el aclaramiento de iotalamato como método de referencia para el cálculo del FG. Ésta fórmula está basada en las mismas 4 variables que la ecuación MDRD-IDMS, y presenta distintas versiones en función de las mismas (**Tabla 4**)¹⁶. La comparación de las ecuaciones CKD-EPI y MDRD-IDMS muestra que el empleo de la primera incrementa significativamente la precisión y la exactitud de la estimación del FG, especialmente con valores de FG entre 60 y 90 mL/min/1.73m². Este incremento en la precisión se traduce en una mejor clasificación de los sujetos con ERC, así como una mejor predicción de la mortalidad global y cardiovascular y del riesgo de presentar

ERCT¹⁷. Basándose en estos datos, la reciente actualización de las guías K/DOQI recomiendan emplear la ecuación CKD-EPI para la estimación del FG4.

Ecuación de CKD-EPI ^a	
Etnia Blanca	
Mujeres	
Creatinina ≤0.7mg/dL	$FG^b = 144 \times (\text{Creatinina} / 0,7)^{-0,329} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Creatinina >0.7mg/dL	$FG^b = 144 \times (\text{Creatinina} / 0,7)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Hombres	
Creatinina ≤0.9mg/dL	$FG^b = 141 \times (\text{Creatinina} / 0,7)^{-0,411} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Creatinina >0.9mg/dL	$FG^b = 141 \times (\text{Creatinina} / 0,7)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Etnia Negra	
Mujeres	
Creatinina ≤0.7mg/dL	$FG^b = 166 \times (\text{Creatinina} / 0,7)^{-0,329} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Creatinina >0.7mg/dL	$FG^b = 166 \times (\text{Creatinina} / 0,7)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Hombres	
Creatinina ≤0.7mg/dL	$FG^b = 163 \times (\text{Creatinina} / 0,7)^{-0,411} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Creatinina >0.7mg/dL	$FG^b = 163 \times (\text{Creatinina} / 0,7)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{edad}}$

Tabla 4. Ecuación CKD-EPI para la estimación del filtrado glomerular. CKD-EPI^a, *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*; FG^b, filtrado glomerular estimado (mL/min/1.73 m²); Edad en años.

1.3.3. Medida de la Albuminuria

La albuminuria, o excreción urinaria de albúmina, constituye, junto con la estimación del FG, la base del diagnóstico y clasificación actual de la ERC4. Las guías KDIGO recomiendan medir la excreción urinaria de proteínas como el cociente albúmina/creatinina en una muestra de orina aislada recogida a primera hora de la mañana. La cuantificación de la excreción urinaria de albúmina en una muestra de orina de 24h se reservará para casos especiales en los que sea necesario una estimación más precisa. En todo caso, la presencia de albuminuria únicamente deberá considerarse como tal en ausencia de factores que puedan aumentarla circunstancialmente, como las infecciones urinarias, el ejercicio físico, la fiebre o la insuficiencia cardíaca4.

El valor y la persistencia de la albuminuria se relacionan estrechamente con el pronóstico renal y vital de los pacientes con ERC, aunque es necesario tener en cuenta que la albuminuria es un marcador independiente de riesgo cardiovascular (RCV) global (disfunción endotelial, remodelado arterial), y no únicamente de enfermedad renal. Además, la presencia única de albuminuria, sin ninguna otra manifestación de daño renal, puede detectarse en otras patologías como la obesidad, el tabaquismo, la dermatitis o la artritis8.

2. Epidemiología, Etiología y Factores de Riesgo de la Enfermedad Renal Crónica

2.1. Epidemiología

Los estudios epidemiológicos muestran un importante incremento en la incidencia y la prevalencia de la ERC en los últimos años, lo que ha llevado a considerar la ERC un problema de salud pública de proporciones epidémicas asociado a un elevado coste sanitario. De hecho, el coste medio por paciente en TSR (estadio G5) es seis veces mayor que el tratamiento de pacientes con VIH y 24 veces mayor que el tratamiento de pacientes con EPOC y asma. Se estima que el TSR consume el 2.5% del presupuesto del Sistema Nacional de Salud y más del 4% del de Atención Especializada¹⁸.

La mayor parte de los estudios epidemiológicos disponibles sobre la ERC se ha realizado en grupos de pacientes en estadio G5 (diálisis y trasplante), debido a la dificultad que entraña el establecimiento de un periodo libre de enfermedad previo al desarrollo de la ERC en estadios precoces de la enfermedad. Los datos publicados por el Registro Español de Enfermos Renales (REER) muestran que, en el año 2012, la incidencia en España de ERC en estadio G5 fue de 120 nuevos casos por millón de habitantes¹. Esta tasa de incidencia es similar a la descrita para otros países de la Unión Europea^{1,10}; mientras que en Estados Unidos la tasa de incidencia es significativamente más alta, estimándose en 362 enfermos por millón de habitantes¹⁹. El estudio NAHNES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), realizado en la población norteamericana, revela que la prevalencia de la ERC en estadios G1 a G4 ha ido aumentando progresivamente desde el 10% detectado en el primer estudio (1988-1994), al 13.1% encontrado para el periodo 1998-2004²⁰. Este incremento puede ser atribuido al aumento de factores de riesgo, como la DM, la HTA, la obesidad y el síndrome metabólico, así como al envejecimiento de la población²¹.

Los estudios epidemiológicos poblacionales realizados en Europa muestran una prevalencia comparable para los estadios G1 y G2 combinados, la cual se estima en torno a un 5-7%^{22,23}. En España, los resultados del estudio EPIRCE (Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España) muestran que el 9.24% de la población adulta asintomática sufre algún grado de ERC, siendo el porcentaje en estadios G3-G5 del 3,3% para sujetos con edades comprendidas entre 40 y 60 años, y del 21.4% para sujetos de más de 64 años²⁴.

2.2. Etiología de la Enfermedad Renal Crónica en Adultos

La mayoría de las enfermedades renales pueden producir un daño estructural suficientemente grave como para causar una disminución crónica del FG. Esta reducción oscila entre discretos deterioros que apenas conllevan alteraciones clínicas o metabólicas detectables, y una ERC avanzada con repercusiones clínicas graves. El listado de causas potenciales de ERC es, por tanto, casi equivalente a la de enfermedades renales, aunque la frecuencia de los procesos causantes presenta notables diferencias geográficas y cronológicas. Las principales etiologías de la ERC en los países desarrollados, son, actualmente, la DM y la HTA; mientras que la glomerulonefritis y las enfermedades renales secundarias a procesos infecciosos continúan siendo la principal causa de ERC en países con escasos recursos económicos y sanitarios^{10,25}.

Los datos del Informe de Diálisis y Trasplante correspondiente al año 2012 del REER1 (**Figura 1**), muestran que la DM es la principal causa de ERC en la población española. El diagnóstico de etiología no filiada es la segunda causa en frecuencia debido, probablemente, a que en este grupo se incluyen muchos pacientes de edad avanzada con nefropatía vascular. Dentro de las enfermedades vasculares renales, tercera causa en frecuencia, la mayor parte se corresponde con la nefroangioesclerosis, relacionada tradicionalmente con las repercusiones renales de la HTA; mientras que hoy en día se la vincula más a la arteriosclerosis generalizada y al envejecimiento¹⁰.

Los cambios en la etiología de la ERC observados en los últimos años se atribuyen fundamentalmente al envejecimiento progresivo de la población en los países desarrollados y a la mayor prevalencia de la HTA, la DM y la obesidad, todas ellas consecuencias de los cambios acontecidos en el estilo de vida¹⁰.

Aunque la etiología de la ERCT es ampliamente conocida, no existe información fidedigna sobre las causas principales de la ERC en estadios previos al TSR. Los distintos estudios epidemiológicos no recogen estas causas, aunque si describen, con resultados diversos, cuales son los factores de riesgo asociados más relevantes.

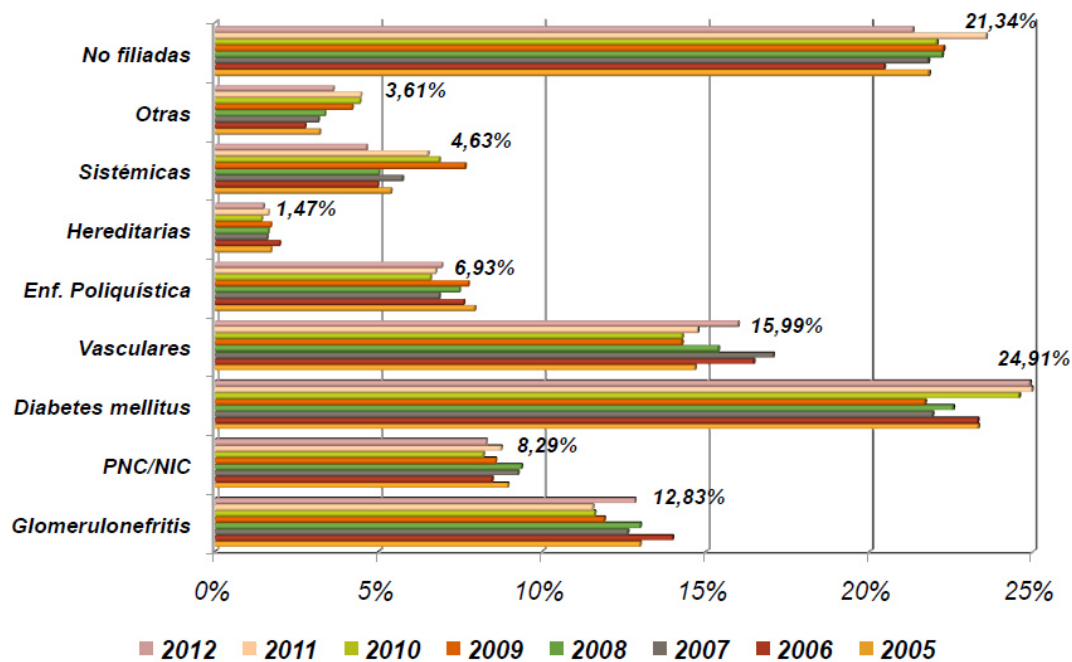


Figura 1. Etiología de la enfermedad renal crónica en nuevos pacientes a tratamiento renal sustitutivo en España durante los años 2005-2012. PNC, pielonefritis crónica; NIC, nefritis intersticial crónica. Extraído del Informe de Diálisis y Trasplante del año 2012 del Registro Español de Enfermos Renales (REER)¹.

2.3. Factores de Riesgo

Las situaciones fisiológicas y fisiopatológicas que pueden favorecer el desarrollo de la ERC son múltiples. Los principales factores de riesgo de la ERC pueden ser clasificados en tres grandes grupos (**Tabla 5**):

- ❖ Factores de susceptibilidad, los cuales predisponen la aparición de la ERC
- ❖ Factores de iniciación, que desencadenan directamente el daño renal
- ❖ Factores de progresión, que se asocian con un deterioro del daño renal preexistente

La identificación de los dos primeros grupos de factores permite definir la población con mayor riesgo de desarrollar ERC, mientras que el conocimiento de los factores de progresión señalará a aquellos pacientes con mayor riesgo de pérdida de función renal^{5,8-10}. Entre todos los factores de riesgo identificados, la DM, la HTA, la obesidad, el tabaquismo y la dislipemia se consideran factores potencialmente modificables⁸.

Algunos estudios recientes han analizado el papel de los factores de RCV clásicos en la aparición y desarrollo de la ERC. En un análisis del *Framingham Heart Study*, la presencia de estos factores de riesgo, especialmente a edad, la HTA, la DM, la concentración baja de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y el consumo de tabaco, fueron predictores de aparición de ERC durante el periodo de seguimiento de 18 años de una cohorte poblacional de individuos sin ERC al inicio del estudio²⁶.

Factores de Susceptibilidad

Genéticos
 Antecedentes familiares de enfermedad renal crónica
 Raza
 Factores maternofetales (bajo peso al nacer, malnutrición intraútero)
 Edad (ancianos)
 Sexo (varones)

Factores Desencadenantes

Diabetes mellitus
 Hipertensión sistémica
 Enfermedades autoinmunitarias
 Glomerulonefritis primarias
 Infecciones sistémicas

Factores de Progresión

Etiología de la enfermedad renal crónica
 Edad avanzada
 Sexo (varón)
 Raza negra
 Predisposición genética
 Mal control de la presión arterial
 Proteinuria/albuminuria
 Mal control glucémico

Factores Desencadenantes y de Progresión

Enfermedad cardiovascular
 Dislipemia
 Tabaquismo
 Obesidad/síndrome metabólico
 Hiperuricemia
 Consumo de alcohol
 Exposición a nefrotóxicos: Antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos...
 Insuficiencia renal aguda

Tabla 5. Principales factores de riesgo asociados al inicio y la progresión de la enfermedad renal crónica.

3. Mecanismos de Progresión de la Enfermedad Renal Crónica

Una de las principales características de la ERC es su tendencia a la progresión, independientemente de la resolución o no de la causa inicial de la nefropatía. Este deterioro progresivo de la función renal se produce, principalmente, por dos tipos de mecanismos: por un lado, un **daño específico ligado a la enfermedad causal**; y por otro, una **progresión inespecífica**, independiente de la causa inicial y que la gran mayoría de enfermedades renales parecen compartir^{10,19,27}.

Una vez que el daño estructural es suficientemente grave, la reducción de la masa nefrótica desencadena una serie de cambios adaptativos en las nefronas restantes. A nivel glomerular, se produce vasodilatación de la arteriola aferente, aumento de la presión intraglomerular y aumento de la fracción de filtración. Finalmente, tanto la hipertrofia como la hiperfiltración, mecanismos iniciales de compensación, se convierten en mecanismos lesivos, ya que el incremento de la presión y del flujo predisponen tanto a la glomerulosclerosis como a la reducción de la masa nefrótica. La mayor actividad intrarrenal del eje renina-angiotensina también parece contribuir tanto a la hiperfiltración inicial adaptativa como, más adelante, a la hipertrofia y a la esclerosis "inadaptativa"^{19,27}.

La progresión inespecífica de la ERC permite explicar la evolución desfavorable de muchos pacientes en los que la causa inicial ha desaparecido tras dejar un daño histológico residual importante; por ejemplo, en las glomerulonefritis extracapilares mediadas por anticuerpos frente al citoplasma de neutrófilos (ANCA), en las que varios años después de la lesión inicial se observa la aparición de albuminuria y disfunción renal progresiva, a pesar de la negatividad de los marcadores patogénicos¹⁰. La similitud de las vías patogénicas finales de la ERC se ve reflejada en los hallazgos histológicos, ya que las lesiones encontradas en los pacientes con ERCT guardan gran similitud, independientemente de la etiología inicial.

Las guías KDIGO definen la progresión de la ERC como un descenso sostenido del FG superior a 5 mL/min/1.73m²/año, o por un cambio de categoría (de G1 a G2, de G2 a G3a, etc.), siempre que este se acompañe de una pérdida de FG \geq 5 mL/min/1.73m². Cuando se detecten estos criterios de progresión será necesario descartar factores potencialmente reversibles de agudización, como uropatía obstructiva, depleción de volumen, situaciones de inestabilidad hemodinámica, o uso de antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la ciclooxigenasa-2 o antibióticos nefrotóxicos, entre otros. No obstante es necesario tener en cuenta que la tasa de deterioro del FG es muy

variable. Como se ha señalado con anterioridad, los diversos estudios epidemiológicos sobre la ERC coinciden en señalar que la ERC es más prevalente en sujetos hipertensos, obesos, diabéticos y fumadores, así como en pacientes con ECV previa, gota o dislipemia^{10,28,29}. En población española, los datos del estudio EPIRCE muestran que, tras la realización de un estudio multifactorial, los factores independientes que se asocian a la progresión de la ERC son la edad, la obesidad y la HTA²⁴. Además, como se puede observar en la **Tabla 6**, tanto la reducción del FG como el grado de albuminuria condicionan el pronóstico, ejerciendo, además, un efecto sinérgico^{4,5,30}.

			Albuminuria		
			Categorías, descripción y rangos		
Filtrado Glomerular			A1	A2	A3
			Normal o aumento leve	Aumento moderado	Aumento grave
Categorías, descripción y rangos (mL/min/1.73m ²)			<30 mg/g ^a	30-300 mg/g ^a	>300 mg/g ^a
G1	Normal o elevado	≥90			
G2	Levemente disminuido	60-89			
G3a	Descenso leve-moderado	45-59			
G3b	Descenso moderado-grave	30-44			
G4	Descenso grave	15-29			
G5	Fallo renal	<15			

Tabla 6. Pronóstico de la enfermedad renal crónica según las categorías de filtrado glomerular y de albuminuria. Extraído de las guías *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)*⁴. ^a, la albuminuria se expresa como cociente albúmina/creatinina.

4. Tratamiento Sustitutivo Renal en la Enfermedad Renal Crónica Terminal

El término ERCT, sinónimo del término anglosajón *end-stage renal disease*, se emplea para referirse a aquella situación subsidiaria de iniciar TSR y se corresponde, en la clasificación actual de las guías KDIGO, con la ERC en estadio G54. Los criterios principales para la inclusión de un paciente en el programa de TSR se recogen en las Normas de Actuación Clínica publicadas por la Sociedad Española de Nefrología (SEN) y se dividen en³¹:

- ❖ **Absolutas:** uremia sintomática, pericarditis, encefalopatía, hiperpotasemia no controlada en tratamiento farmacológico, acidosis metabólica grave y sobrecarga de volumen con edema agudo de pulmón y/o hipertensión refractaria.

- ❖ **Relativas:** anorexia, astenia, disminución de memoria, depresión y prurito intenso.

La presencia de una indicación absoluta obliga al inicio rápido del TSR, mientras que las indicaciones relativas deben ser valoradas para cada caso clínico concreto, aunque aconsejan no demorar demasiado su inicio. Sin embargo, y debido a los graves efectos sobre la morbi-mortalidad que puede suponer una adhesión tardía al programa, en los últimos años el TSR se está iniciando de forma más precoz, especialmente en niños, ancianos y pacientes con comorbilidades³².

El TSR puede realizarse mediante tres modalidades fundamentales: la **hemodiálisis (HD)**, la **diálisis peritoneal (DP)** y el **trasplante renal**. A pesar de algunas diferencias demográficas, la HD es la modalidad terapéutica más frecuente. En Estados Unidos, por ejemplo, más del 90% de los pacientes con ERCT están incluidos en un programa de HD²⁵. En España, según los últimos informes del REER, la prevalencia de sujetos que precisan TSR se encuentra alrededor del millar de pacientes por millón de habitantes, de los cuales un 51% han sido trasplantados, un 44% están incluidos en un programa de HD y únicamente un 5% reciben DP1.

4.1. Diálisis Peritoneal

La DP utiliza el peritoneo como membrana semipermeable que separa, por una parte, la sangre de los capilares mesentéricos y, por otra, una ascitis artificial provocada al introducir una solución glucosada que se renueva periódicamente. La cantidad de solutos excretados dependerá del volumen total diario de líquido introducido en la cavidad peritoneal. El rendimiento horario en la extracción de solutos urémicos de pequeño tamaño en la DP es mucho menor que en la HD; sin embargo, la permeabilidad de la membrana peritoneal a los solutos de peso molecular medio es mayor^{10,19,33}.

La DP ha logrado una progresiva difusión en los últimos años al ser una forma sencilla de practicar diálisis domiciliaria. Su uso clínico merece especial atención en pacientes con cardiopatía isquémica o insuficiencia cardíaca, en niños con pequeño tamaño corporal, en escolares, en pacientes con pobre acceso vascular y en aquellos que deseen independencia. Entre las escasas contraindicaciones absolutas para practicar DP destacan la posibilidad de desarrollar fibrosis o resección peritoneal importante³³.

4.2. Hemodiálisis

La HD tiene como principal objetivo depurar la sangre mediante un sistema extracorpóreo por el que se eliminan las sustancias tóxicas derivadas del catabolismo, se restablece el equilibrio ácido-básico, se corrigen las alteraciones hidroelectrolíticas y se elimina el exceso de líquido del organismo.

4.2.1. Principios Físicos de la Diálisis

La HD se basa en los principios de difusión de solutos a través de una membrana semipermeable y consiste en el intercambio de agua y solutos entre dos soluciones separadas por una membrana interpuesta entre dos compartimentos: la sangre y el líquido de diálisis. La membrana semipermeable permite el paso de agua y moléculas de pequeño y mediano peso molecular, impidiendo el paso de solutos de mayor tamaño como las proteínas y las células sanguíneas. Durante la sesión de HD la sangre del paciente entra en contacto con la membrana, cuya superficie está impregnada de líquido de diálisis. La composición del líquido de diálisis permite la depuración de sustancias acumuladas en la sangre, a la vez que puede aportar al paciente otros elementos deficitarios, como el calcio y el bicarbonato, mediante un mecanismo de transporte bidireccional. El transporte de agua y solutos a través de la membrana se lleva a cabo principalmente por dos mecanismos: difusión y convección (**Figura 2**)^{10,19}.

La **difusión** consiste en el transporte de solutos mediante un gradiente de concentración. Si dos soluciones de distinta concentración separadas por una membrana semipermeable se ponen en contacto, las moléculas tienden a moverse desde la solución más concentrada a la menos concentrada hasta alcanzar el equilibrio. Este fenómeno se denomina transporte difusivo.

La eliminación del exceso de líquidos en los pacientes en HD se consigue mediante la **ultrafiltración**. Ésta consiste en el movimiento neto de agua y solutos a través de la membrana desde el compartimento sanguíneo al del líquido de diálisis por un gradiente de presión. En la práctica clínica, la ultrafiltración se consigue aplicando una presión positiva a la sangre, o una presión negativa al líquido de diálisis. Durante la ultrafiltración el transporte de agua arrastra parte de las moléculas disueltas. Este mecanismo de transferencia de solutos se denomina **convección**.

Las moléculas de pequeño tamaño como los iones, la urea o la creatinina se aclaran mejor por difusión, mientras que las moléculas de mayor tamaño como la β 2-microglobulina se depuran más eficazmente mediante transporte convectivo.

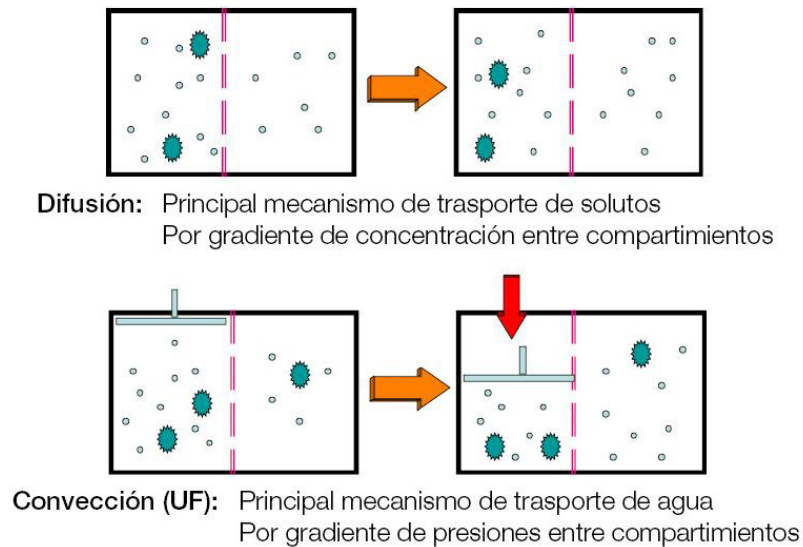


Figura 2. Esquema del transporte difusivo y convectivo. UF, ultrafiltración.

Las distintas técnicas de diálisis se diferencian principalmente en el tipo de transporte en el que se basan, unas lo hacen por transporte difusivo (HD convencional), mientras que otras se basan en el transporte convectivo (hemofiltración). En las últimas dos décadas se han desarrollado técnicas que combinan ambos tipos de transporte, con el objetivo de mejorar la eficacia depuradora de las terapias renales clásicas, como, por ejemplo, la hemodiafiltración¹⁰.

4.2.2. Elementos de la diálisis

Los elementos principales de la HD son el acceso vascular, el circuito extracorpóreo de sangre y líquido de diálisis, y el dializador o membrana de diálisis. Todo el proceso es controlado con un monitor de diálisis desde el que se controlan las características de cada sesión de diálisis, incluyendo el tiempo y la ultrafiltración final.

El **acceso vascular** ideal debe cumplir al menos tres requisitos: permitir el acceso seguro y repetido al sistema vascular del paciente, proporcionar el flujo suficiente para administrar la dosis de HD y presentar pocas complicaciones¹⁰. En la actualidad se disponen de dos tipos principales de acceso vascular: la fístula arteriovenosa (FAV) y el catéter venoso central. La FAV es el tipo de acceso de elección para la mayoría de

los pacientes ya que existen pocas contraindicaciones para su realización, entre las que se encuentran la arteriosclerosis calcificante o la insuficiencia cardiaca grave. En cambio, el catéter venoso central se asocia a una mayor morbi-mortalidad y mayor número de ingresos anuales, así como a un mayor coste sanitario³⁴.

En el **circuito extracorpóreo** (Figura 3), la sangre del paciente es conducida mediante un circuito de líneas flexibles de plástico desde el acceso vascular (línea arterial) hasta el dializador donde, una vez realizada la diálisis, retorna al paciente (línea venosa). El volumen del circuito extracorpóreo oscila entre 150 y 290 mL. El flujo de sangre se genera por una bomba peristáltica en forma de rodillo, ajustándose habitualmente entre 200-450 mL/min^{10,19}.

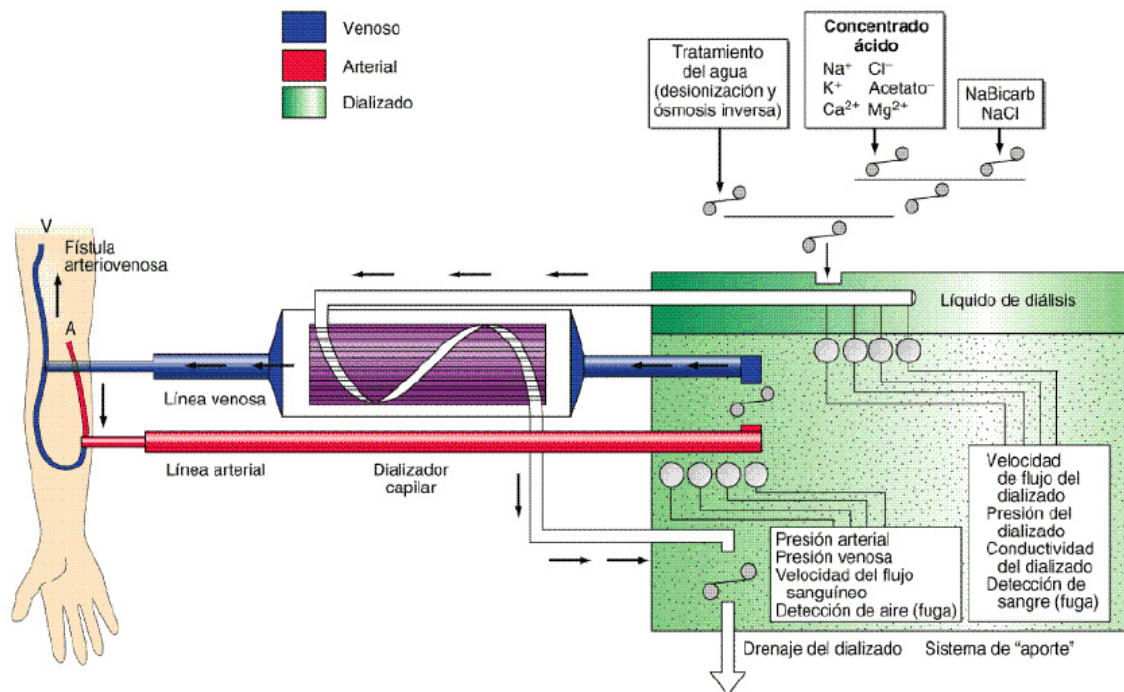


Figura 3. Esquema simplificado del circuito extracorpóreo de hemodiálisis. Extraído de Harrison principios de medicina interna 17ª ED¹⁹.

El **dializador** se compone de una carcasa, una membrana semipermeable y dos espacios o compartimentos: el de la sangre y el del líquido de diálisis. El objetivo del dializador es conseguir la mayor área de membrana en el mínimo espacio posible, la cual oscilará entre 0.45 y 2.4 m² en función del tipo de membrana¹⁰. El tipo de dializador más empleado en la actualidad es el dializador de capilares, en el que la membrana se dispone en forma de pequeños capilares, en los que la sangre circula por su interior, mientras que el líquido de diálisis la baña en su exterior. En cuanto al

tipo de membranas semipermeables, éstas pueden ser de celulosa regenerada (cuprofán; en desuso desde la década de los 90 debido a su baja biocompatibilidad), de celulosa modificada (hemofán, acetato de celulosa; las más empleadas en la actualidad) o de material sintético (poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato, poliamida; las de mayor biocompatibilidad pero con un coste más elevado).

4.2.3. Complicaciones de la Hemodiálisis Crónica

A pesar de los grandes avances conseguidos en los últimos años, la HD no restituye todas las funciones fisiológicas del riñón y, además, la propia diálisis puede ser fuente de nuevos efectos adversos. Las complicaciones asociadas a la HD crónica pueden dividirse en dos grandes grupos: complicaciones **agudas** y **crónicas**.

4.2.3.1. Complicaciones Agudas de la Hemodiálisis

Las complicaciones agudas de la HD son consecuencia de un efecto sinérgico entre las condiciones comórbidas de los pacientes y los factores y mecanismos inherentes al propio procedimiento dialítico. Entre ellas destacan, por su frecuencia, la hipotensión arterial, las náuseas y los vómitos. Otras menos frecuentes pero de mayor gravedad son el síndrome de desequilibrio, las reacciones de hipersensibilidad, las arritmias, las hemorragias y las infecciones víricas o bacterianas.

❖ **Hipotensión arterial.**

A pesar de los considerables avances técnicos y clínicos en los últimos años, se estima que la hipotensión arterial se produce en un 20-33% de las sesiones de HD³⁵, debido, principalmente, a la avanzada edad de los pacientes en HD y a la presencia de enfermedades asociadas como la DM o las ECV¹⁰. Durante el proceso de ultrafiltración, el líquido libre en proteínas es eliminado del espacio intravascular, disminuyendo así la presión hidráulica y aumentando la presión oncótica. Esto propicia el relleno desde el espacio intersticial, a la vez que se producen respuestas compensadoras a la disminución del volumen intravascular: estimulación simpática, aumento del gasto cardíaco y vasoconstricción. La hipotensión se produce cuando la tasa de ultrafiltración es mayor que la tasa de relleno plasmático o cuando la respuesta de los mecanismos compensatorios es inadecuada¹⁰.

❖ **Síndrome de Desequilibrio**

El Síndrome de desequilibrio es un conjunto de síntomas sistémicos y neurológicos que cursa con cefalea, náuseas, vómitos, desorientación, HTA y, en raras ocasiones, crisis convulsivas. Aunque el edema cerebral es un hallazgo frecuente, su patogénesis aún es controvertida. Sus formas más graves se describieron cuando se sometía a diálisis intensiva a pacientes que previamente no han sido dializados y que presentaban una concentración muy elevada de urea sérica, lo que provocaba un rápido descenso de la osmolaridad extracelular¹⁰. En pacientes en HD crónica, este síndrome se puede manifestar de forma más leve con cefaleas, náuseas y vómitos post-diálisis.

Para prevenir su aparición, las primeras sesiones de diálisis deben ser relativamente cortas y poco eficaces, con una tasa de reducción de la urea plasmática inferior al 30%. La administración de agentes hipertónicos como glucosa hipertónica, cloruro sódico hipertónico y manitol también son de utilidad para su prevención y tratamiento.

❖ **Reacciones de Tipo Alérgico**

El contacto de la sangre del paciente con todo el sistema extracorpóreo puede ocasionar distintos tipos de reacciones alérgicas. Las reacciones anafilácticas y anafilactoides se presentan por lo general en los primeros minutos de la diálisis y se caracterizan por urticaria, tos, rinorrea, lagrimeo, calambres abdominales, prurito, sensación de quemazón, angioedema, disnea e incluso colapso circulatorio. Las reacciones alérgicas más frecuentes se han descrito en relación al óxido de etileno, a la reutilización de dializadores y a la combinación de membranas de poliacrilonitrilo (AN69) e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina^{10,33}.

❖ **Arritmias**

Entre el 6 y el 76% de los pacientes con ERCT presentan arritmias supraventriculares o ventriculares durante las sesiones de HD³⁵. Estas arritmias, más frecuentes en pacientes de alto riesgo (edad avanzada, disfunción miocárdica), se han relacionado con las rápidas fluctuaciones hemodinámicas y de la concentración de los electrolitos que se producen en la HD^{10,35}.

❖ Hemorragias

Los episodios de sangrado son frecuentes durante las sesiones de hemodiálisis. Esto es debido a que a la disfunción plaquetaria característica del paciente urémico se une el uso de anticoagulantes. Además, la interacción entre la sangre y la membrana de diálisis puede producir trombopenia. Las hemorragias más frecuentes son epistaxis, sangrado gingival y del sitio de la punción¹⁰.

❖ Infecciones en el paciente en HD

Los pacientes con ERC, especialmente aquellos en TSR, presentan una actividad inmunitaria atenuada que favorece el desarrollo de infecciones bacterianas y víricas, así como enfermedades autoinmunes y neoplasias. Todo ello, unido a la necesidad de mantener un acceso vascular, hace que estos pacientes presenten una mayor incidencia de complicaciones infecciosas, con una tasa de mortalidad por sepsis de 100 a 300 veces superior a la de la población general¹⁰.

4.2.3.2. Complicaciones Crónicas de la Hemodiálisis

La progresión de la ERC puede ocasionar perturbaciones en la mayor parte de los órganos y sistemas corporales. En las fases precoces de la enfermedad no suele haber expresión clínica, aunque pueden detectarse anomalías bioquímicas y moleculares. En la ERCT, sin embargo, estas perturbaciones adquieren una mayor prevalencia y gravedad, produciendo una amplia variedad de sintomatología clínica.

Las principales manifestaciones clínicas asociadas a la progresión de la ERC son: **trastornos nutricionales, alteraciones endocrinas, anemia, alteraciones del metabolismo óseo-mineral, alteraciones cardiovasculares y manifestaciones gastrointestinales, neurológicas y dermatológicas**. De entre estas perturbaciones, las alteraciones cardiovasculares presentan una especial relevancia, tanto por su prevalencia como por su gravedad. De hecho, otras manifestaciones clínicas relacionadas con la uremia, como la anemia o la malnutrición, contribuyen decisivamente a la aparición y progresión de eventos cardiovasculares en los pacientes con ERCT^{10,36}.

Capítulo 2. Enfermedad Renal Crónica y Patología Cardiovascular

1. Epidemiología

Las alteraciones cardiovasculares son la principal causa de morbi-mortalidad en pacientes con ERC, tanto en estadios previos a diálisis, como en diálisis periódica y trasplantados renales; observándose una tasa de mortalidad cardiovascular entre 10 y 20 veces superior a la de la población general, tras ajustar por edad, sexo o presencia de DM^{37,38}. Además, el riesgo relativo con respecto a la población general es muy superior en pacientes jóvenes. Los datos del registro Europeo de Pacientes con ERC, muestran que la incidencia de muerte cardiovascular en pacientes con edad comprendida entre los 15 y los 30 años es 150 veces mayor que a la de la población general³⁷; mientras que los datos del registro Americano revelan que el riesgo de muerte cardiovascular en pacientes menores de 45 años es 100 veces superior al de la población general, reduciéndose estas diferencias con la edad³⁸. En conjunto, los datos recogidos en los registros de distintas poblaciones como Estados Unidos, Europa o Japón, coinciden en señalar que aproximadamente el 50% de las muertes acontecidas en pacientes con ERC son debidas a complicaciones cardiovasculares^{37,38,39}. De hecho, estos pacientes tienen una mayor probabilidad de fallecer por causas cardiovasculares que de progresar a ERCT, presentando, además, un peor pronóstico y una mortalidad aumentada tras sufrir un infarto agudo de miocardio (IAM), así como un mayor riesgo de sufrir IAM recurrentes, fallo cardiaco y muerte súbita⁴.

La **relación entre la ERC y la morbi-mortalidad cardiovascular** se puso de manifiesto por primera vez en 1999, tras la publicación de los datos del estudio *Framingham*⁴⁰. Estos autores encontraron que, en una cohorte de 6.233 individuos seguidos durante 15 años, aquellos con ERC leve o moderada (8% de la cohorte) presentaban una mayor prevalencia de cardiopatía isquémica, fallo cardiaco e hipertrofia ventricular izquierda (HVI). En esta línea, los resultados del estudio HOPE (*Heart Outcomes and Prevention Evaluation*), un estudio prospectivo realizado en un grupo de pacientes con ECV asociada, mostraron que aquellos sujetos con una creatinina basal ≥ 1.4 mg/dL presentaban una prevalencia de IAM, y mortalidad

cardiovascular y global significativamente superior a aquellos sujetos con concentraciones de creatinina inferiores a este punto de corte⁴¹.

En el año 2004 se publicaron los datos conjuntos de cuatro estudios poblacionales (*Atherosclerosis Risk in Communities*, *Cardiovascular Health Study*, *Framingham Heart Study* y *Framingham Offspring Study*), en los que se incluyeron un total de 22.634 individuos. Estos datos revelaron que los sujetos con ERC, definida por un FG estimado inferior a 60 mL/min/1.73m², presentaban una mayor morbi-mortalidad cardiovascular y global, identificándose la ERC como un factor de RCV independiente, y con un peso similar al de otros factores de riesgo ampliamente reconocidos como la DM, la HTA o la HVI⁴². Go et al⁴³, obtuvieron resultados similares en un amplio estudio poblacional en el que se incluyeron sujetos con ERC en estadios G1 a G4. Estos autores observaron que, a medida que disminuía el FG, aumenta el riesgo de ingresos hospitalarios y muerte por causas cardiovasculares, independientemente de la edad, la comorbilidad o la presencia de factores cardiovasculares convencionales. De hecho, la prevalencia de ECV en pacientes con ERCT es unas 10 veces superior a la de la población normal^{44,45}; estimándose la incidencia de hospitalización por cardiopatía isquémica (IAM o angina) en torno a un 8% anual, y la incidencia de aparición de una cardiopatía isquémica *de novo* en torno a un 9% el primer año y un 15% a los dos años⁴⁶.

Una relación similar a la descrita entre el FG y la aparición de eventos cardiovasculares ha sido encontrada para la concentración urinaria de albúmina, incluso con concentraciones consideradas *a priori* como fisiológicas. El primer estudio que demostró la asociación entre la presencia de albuminuria y el RCV en sujetos no diabéticos fue publicado en 1988⁴⁷. Desde entonces, múltiples estudios han confirmado que la albuminuria es un predictor de ECV arteriosclerótica, tanto en sujetos diabéticos como no diabéticos. Entre ellos, destacan los resultados obtenidos en el *Third Copenhagen City Heart Study*⁴⁸, los cuales mostraron que el riesgo de enfermedad coronaria se incrementaba en relación directa a la cuantía de la albuminuria, independientemente de la edad, el sexo, o la presencia de daño renal, DM, HTA o dislipemia. En el año 2007, el estudio HUNT II (*Nord-Trondelag Health Study*)⁴⁹, en el que se evaluó la asociación entre albuminuria y mortalidad en un grupo de 5.369 sujetos hipertensos no diabéticos durante un periodo de 4 años, demostró la asociación entre la presencia de albuminuria y la mortalidad global, especialmente en varones; así como la asociación sinérgica de la albuminuria y el FG disminuido como factores de riesgo de mortalidad cardiovascular. Ese mismo año, los datos del estudio

KEEP (*Kidney Early Evaluation Program*)⁵⁰, un estudio de cohortes en población hipertensa o diabética, revelaron que la anemia, el FG disminuido y la presencia de albuminuria se asocian de forma independiente con la ECV y, cuando todos estos factores se presentaban de forma simultánea, la prevalencia de la ECV aumentaba significativamente, mientras que la supervivencia se reducía.

De acuerdo con estas evidencias, las principales sociedades científicas internacionales de Nefrología y Cardiología recomiendan considerar la ERC como un factor de RCV independiente, e incluir la albuminuria y el FG disminuido ($<60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$) en la lista de nuevos marcadores de RCV^{51,52}. De hecho, una de las principales novedades incluidas en la reciente actualización de la Guía Europea de Prevención Cardiovascular⁵¹ es la identificación de un grupo de pacientes de muy alto riesgo vascular en el que, por primera vez, se incluyen los pacientes con ERC en estadios G4 y G5.

Por otra parte, la elevada prevalencia de ECV en la población en HD sugiere que el daño vascular puede comenzar en los estadios iniciales de la ERC y que ambos trastornos comparten factores de riesgo y mecanismos de progresión^{53,54}.

2. Síndrome Cardiorrenal

La asociación de la enfermedad renal con la ECV constituye una realidad fisiopatológica de reconocimiento reciente. Mientras que la HTA y la aterosclerosis son causas cada vez más frecuentes de nefropatía, el deterioro crónico de la función renal genera un estado vasculopático que facilita el desarrollo de lesiones del sistema cardiovascular. En términos epidemiológicos, el resultado final de todo ello es doble: por un lado, el riesgo de disfunción renal es elevado en los sujetos con una enfermedad vascular, y, por otro lado, el riesgo de eventos cardiovasculares es muy alto en sujetos con una nefropatía crónica¹³.

En el año 2008 se organizó una Conferencia de Consenso, bajo el auspicio de la organización *Acute Dialysis Quality initiative* (ADQI), que reunió a expertos internacionales en nefrología y cardiología con el fin de elaborar un documento de consenso sobre la definición, clasificación, marcadores, fisiopatología, y aproximación diagnóstica y terapéutica del **Síndrome Cardiorrenal (SCR)**. Así, el SCR se define como una situación fisiopatológica que afecta al corazón y al riñón, en la que un daño agudo o crónico en uno de ellos origina disfunción aguda o crónica en el otro. Además,

la afectación de uno de los órganos dificulta la actuación terapéutica sobre el otro, especialmente en las fases finales de la insuficiencia cardiaca y en la ERC en estadios G4-G5^{54,55}.

Se distinguen cuatro tipos de SCR en función del órgano originalmente dañado: cardiorrenales o renocardiacos; y del tipo de presentación: aguda o crónica. Se ha definido un quinto tipo para aquellos casos en los que una entidad externa afecte simultáneamente a ambos órganos: SCR secundario. Es importante señalar que, a medida que progresa su enfermedad, un elevado porcentaje de pacientes podrá moverse entre las distintas categorías del SCR⁵⁵.

2.1. Fisiopatología del Síndrome Cardiorrenal

En el SCR la contribución de la insuficiencia cardiaca y de la insuficiencia renal no son necesariamente equivalentes a su gravedad, curso natural y evolución clínica. Esto determina una amplia escala de posibles combinaciones de fallo de ambos órganos, abarcando entidades como la insuficiencia renal aguda o crónica en el caso del riñón, y la insuficiencia cardiaca sistólica y diastólica aguda o crónica en el caso del corazón. En los pacientes con SCR el riñón está afectado tanto de forma orgánica, debido en la mayor parte de los casos a una enfermedad vascular generalizada; como de forma funcional, a consecuencia del propio fallo ventricular, de las alteraciones causadas por el tratamiento o de la distribución compartimental de líquidos en el organismo¹⁰.

Los mecanismos fisiopatológicos que condicionan la interrelación cardiorrenal aún no se conocen con exactitud, si bien lo que parece estar claro es que éstos son mucho más complejos que la simple combinación de bajo gasto cardiaco e hipoperfusión renal. La hipótesis más aceptada de las desarrolladas hasta la fecha, es la existencia de un nexo fisiopatológico común entre ambos a través del daño endotelial⁵⁶. Para explicar este nexo se han implicado tres tipos de factores (**Figura 4**)^{55,56,57}:

- ❖ **Mecanismos de regulación local** como la fibrosis, el exceso de dimetilarginina asimétrica (ADMA), el estrés oxidativo, la microinflamación, el daño endotelial directo o la disminución de células residentes para la regeneración endotelial.

- ❖ **Mecanismo de regulación sistémica** como la estimulación simpática, la activación del eje renina-angiotensina, los efectos profibróticos y procalcificantes de la hormona paratiroidea (PTH), los péptidos natriuréticos o la proteína C reactiva (PCR).
- ❖ **Sobrecarga de presión** por la rigidez arterial y la HTA; y **sobrecarga de volumen**. La afectación cardíaca retroalimenta el circuito al deteriorar la función renal por bajo gasto.

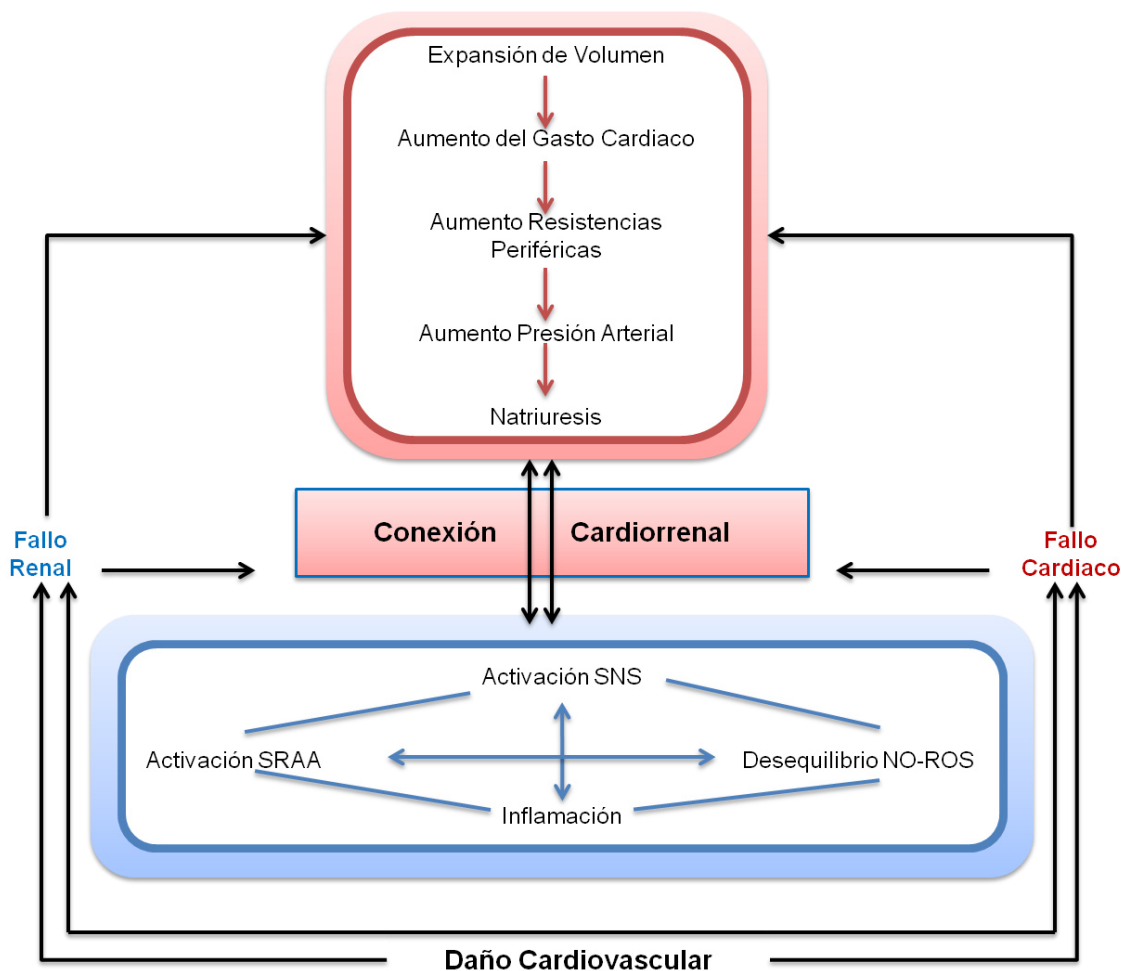


Figura 4. Bases fisiopatológicas del síndrome cardiorenal. Adaptado de Bongarzt et al⁵⁷. SNS, sistema nervioso central; SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas de oxígeno.

3. Fisiopatología de las Alteraciones Cardiovasculares en la Enfermedad Renal Crónica

La elevada morbi-mortalidad cardiovascular y global observada en sujetos con ERC, se ha relacionado con una progresión acelerada de la aterosclerosis^{14,37,44,58}, cuya presencia y severidad se correlaciona con el desarrollo de enfermedad renal⁵⁹. La ERC se asocia con una elevada prevalencia de factores de RCV convencionales, tales como la edad, la HTA, la DM, las dislipemias, el HVI o el sedentarismo⁵³. Sin embargo, y basándose en el análisis clásico de RCV para la población general, estos factores no alcanzan a explicar el marcado aumento de morbi-mortalidad cardiovascular observado en estos pacientes. De hecho, diversos estudios han demostrado que el *score* de Framingham infraestima el RCV en pacientes renales^{60,61}.

Por lo tanto, en pacientes con ERC será necesario tener en cuenta, además de los factores de riesgo convencionales, otros factores de riesgo emergentes o no convencionales como la hiperhomocisteinemia, la inflamación o el estrés oxidativo, todos ellos altamente prevalentes en estos pacientes^{62,63}; así como vías de daño cardiorrenal específicas de la uremia, entre las que destacan la anemia, la malnutrición o la enfermedad óseo-mineral^{36,53}. El nexo común de la mayoría de estos factores es la inducción de una disfunción endotelial, considerada un evento precoz y clave en el desarrollo de la aterosclerosis⁶⁴.

Recientemente, la elevada morbi-mortalidad de los pacientes urémicos, ha sido relacionada también con la presencia de calcificaciones vasculares⁶⁵. El desarrollo de estas calcificaciones extraóseas es un fenómeno multifactorial, donde el estrés oxidativo local, la presencia de factores aterogénicos y el desequilibrio del metabolismo óseo-mineral contribuyen conjuntamente a las alteraciones estructurales del vaso⁶⁶, con la consecuente aparición de fenómenos isquémicos o tromboembólicos distales^{67,68}.

3.1. Disfunción Endotelial

3.1.1. Fisiología del Endotelio Vascular

Las células endoteliales forman una monocapa que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforman la pared de los capilares (**Figura 5**). El endotelio vascular había sido considerado durante muchos años como una membrana inerte,

cuya función era la de servir como pared permeable a los vasos sanguíneos. Sin embargo, las investigaciones realizadas en los últimos 25 años ha demostrado su implicación en importantes funciones fisiológicas endocrinas, paracrinas y autocrinas, lo que, unido a su posición anatómica, le convierten en uno de los principales reguladores del tono y homeostasis vascular, así como de la proliferación de las células musculares lisas (CMLV)⁶⁹.

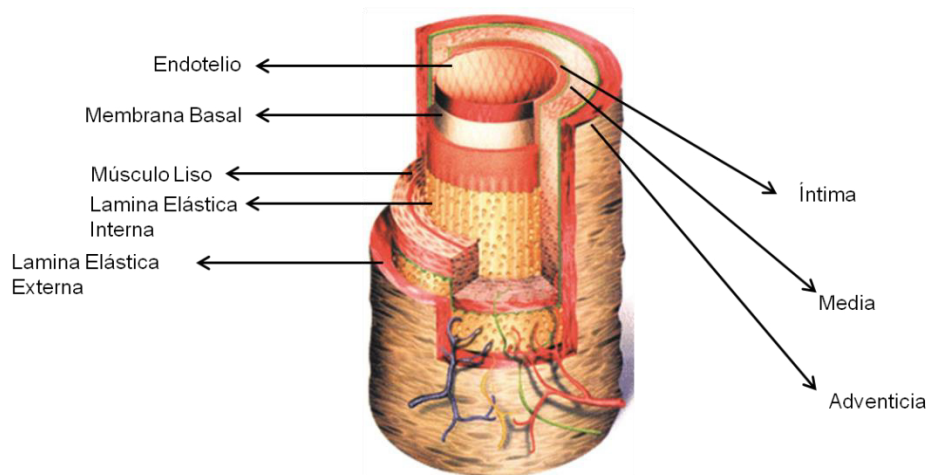


Figura 5. Estructura de la pared vascular. Adaptado de Arias et al¹⁰.

El endotelio regula el tono vascular mediante la liberación de distintos agentes vasoactivos en respuesta a cambios en la presión arterial (PA), al estrés mecánico hemodinámico o a la concentración de mediadores circulantes⁶⁸. El óxido nítrico (NO), sintetizado a nivel de la célula endotelial, es uno de los vasodilatadores más estudiados en los últimos años. El NO es sintetizado a partir de uno de los nitrógenos del grupo guanidino terminal del aminoácido L-arginina mediante una compleja reacción oxidativa catalizada por una familia de isoenzimas denominadas genéricamente NO sintetasas, las cuales precisan de tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactor. Una vez generado, el NO difunde desde la célula endotelial al músculo liso subyacente donde, a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble, aumenta la concentración de GMP cíclico intracelular, induciendo la relajación de las células musculares y la vasodilatación. El NO también participa en la inhibición de la adhesión, activación y secreción plaquetarias, la adhesión de leucocitos al subendotelio y la expresión de moléculas de adhesión, así como la migración y proliferación de las CMLV, todos ellos factores decisivos en el desarrollo de aterosclerosis y en la disrupción de la placa aterosclerótica⁶⁹.

Los mediadores endoteliales que participan en la vasoconstricción son, entre otros, la angiotensina II, la endotelina, y diversos productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico, como el tromboxano A₂ o los endoperóxidos. La angiotensina II induce la vasoconstricción, favorece la proliferación celular, induce fenómenos proinflamatorios, así como un estado protrombótico⁷⁰. La endotelina, por su parte, es el vasoconstrictor más potente sintetizado por la célula endotelial, y actúa induciendo la vasoconstricción de la CMLV de forma autocrina/paracrina, además de favorecer la proliferación de la CMLV⁷¹.

3.1.2. Disfunción Endotelial en la Enfermedad Renal Crónica

La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial, en un proceso que predispone la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, favoreciendo tanto la aterogénesis, como la agregación plaquetaria y la trombosis^{64,72}. Con frecuencia, la disfunción endotelial se acompaña de un aumento en la síntesis de mediadores que participan en la respuesta al daño y que, en ocasiones, contribuyen más a perpetuarlo que a limitarlo. Esta situación se conoce como activación endotelial y se asocia, en la mayoría de las ocasiones, a una situación de inflamación subyacente¹⁰.

Los primeros estudios que relacionaban la uremia con una disfunción endotelial crónica datan de la década de los 90. En estos estudios se demostró la presencia de un patrón típico de elevación de la concentración de diversos marcadores endoteliales séricos, tales como el factor de Von Willebrand, el activador del plasminógeno tisular, la trombosmodulina o las moléculas de adhesión circulantes, entre otros^{73,74}. Una década después, Pannier et al⁷⁵ demostraron que la ERCT y preterminal se asociaba a una respuesta vasodilatadora disminuida a varios estímulos, como la isquemia o la hipertermia, lo que pone de manifiesto la alteración de la función endotelial *in vivo*. La mayoría de estos estudios fueron realizados empleando técnicas no invasivas, como la medida de la vasodilatación arterial tras la administración sublingual de trinitrato de glicerina. Passauer et al⁷⁶, empleando técnicas invasivas más sensibles, confirmaron que la vasodilatación, inducida por la administración intra-arterial de acetilcolina en la arteria braquial, estaba disminuida en pacientes normotensos con ERCT, observando, además, una asociación entre la vasodilatación endotelio-dependiente y el remodelado cardiovascular (arteriosclerosis, HVI). Empleando las mismas técnicas invasivas, Annuk et al⁷⁷, observaron una correlación inversa entre la vasodilatación endotelio-

dependiente y el aclaramiento de creatinina, lo que sugiere que el grado de disfunción endotelial progresa con el deterioro de la función renal.

La disfunción endotelial en la uremia podría deberse tanto a un efecto deletéreo de los factores de RCV clásicos (edad, HTA, DM, dislipemia o tabaquismo), como a una activación crónica del endotelio secundaria a un estrés hemodinámico aumentado, un estado proinflamatorio crónico, un incremento del estrés oxidativo, la hiperhomocisteinemia o la acumulación de inhibidores endógenos de la síntesis de NO, como el ADMA^{75,78}.

3.2. Aterosclerosis

3.2.1. Definición y Etiopatogenia

La aterosclerosis es una enfermedad de la capa íntima de las arterias de mediano y gran calibre, caracterizada por la formación de placas fibrosas o ateromatosas generadas por el depósito anormal de lípidos y tejido fibroso en la pared arterial, en un proceso denominado ateromatosis o aterogénesis. La aterogénesis se inicia en la infancia y adolescencia, y continúa evolucionando de forma silente a lo largo de los años, hasta que la placa ateromatosa excede la capacidad de la arteria para remodelarse, y el lumen arterial comienza a disminuir⁷⁹. Con el tiempo, el crecimiento y las complicaciones (fisura, erosión o rotura) de las placas ateromatosas, conllevan la obstrucción de la luz vascular y, por tanto, la aparición de isquemia o necrosis^{79,80}.

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que afecta a arterias de distintas localizaciones simultáneamente pero con diferentes grados de progresión, desarrollándose preferentemente en las arterias que irrigan el corazón (coronarias), el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales) y las extremidades inferiores (iliacas y femorales). La presencia de afectación vascular en una localización concreta se asocia, por tanto, con un riesgo aumentado de desarrollar lesiones ateroscleróticas en otros lechos vasculares⁸¹. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen del lecho vascular afectado y del estado evolutivo de la enfermedad, relacionándose con la enfermedad cardíaca coronaria, la isquemia cerebrovascular y la enfermedad vascular arterial periférica obstructiva, siendo las consecuencias más graves de la aterosclerosis, el IAM, el accidente cerebrovascular (ACV) y la gangrena isquémica^{79,80}.

Clásicamente se han considerado dos teorías para explicar la formación de la placa de ateroma. La primera, publicada por Rokitansy en 1852⁸², postulaba que el mecanismo inicial era una reacción fibrótica que producía un engrosamiento de la íntima que, de forma secundaria, conllevaba un depósito de lípidos en su superficie (**Teoría Incrustativa**). En 1856, Virchow R⁸³, publicó una nueva hipótesis, según la cual el depósito lipídico era el proceso que determinaría la formación de la placa de ateroma (**Teoría Infiltrativa**). En ambas teorías, el endotelio es un agente pasivo que sufre un proceso fibrótico o de depósito.

Un siglo más tarde, Ross R⁸⁴ integró ambas teorías al considerar la aterosclerosis como un proceso de respuesta inflamatoria a una agresión endotelial (**Teoría de Respuesta al Daño Endotelial**). Según esta teoría, una diversidad de estímulos mecánicos, químicos, biológicos o inmunológicos, pueden ser capaces de producir una lesión del endotelio vascular, que puede ser tanto mecánica como funcional, generándose en ese momento el concepto de disfunción endotelial. Esta disfunción endotelial provoca una respuesta compensatoria que altera las propiedades homeostáticas normales del endotelio, adquiriendo propiedades procoagulantes en lugar de anticoagulantes, incrementándose la adhesividad de leucocitos y plaquetas, y aumentando la permeabilidad vascular. La disfunción resultante promueve la entrada de células inmunitarias, tanto de linfocitos T como de macrófagos, activando la respuesta inflamatoria con la consecuente liberación de citoquinas proinflamatorias (**Figura 6**). Todo este proceso en su conjunto contribuye al establecimiento y evolución de la lesión ateromatosa^{85,86,87}.

En consonancia con esta teoría, Fuster et al⁸⁸, postularon que el daño endotelial asociado a la aterogénesis puede ser clasificado en tres estadios:

- ❖ **Estadio I:** Daño funcional pero no morfológico. Puede ser debido a pequeñas alteraciones del flujo intraluminal (zonas de flexión, HTA) o del interior de la propia pared (isquemia de *vasa vasorum*). Cuando las lesiones características de este estadio se cronifican, aparecerán las primeras lesiones ateromatosas, proceso favorecido por factores tales como la hiperlipemia, el tabaquismo, o la presencia de infecciones. Con el depósito de macrófagos en el espacio subintimal, se produce la liberación de sustancias vasculotóxicas como enzimas proteolíticas o radicales libres, que conducen al establecimiento del Estadio II.

- ❖ **Estadio II:** Degradación del endotelio con la presencia de daño intimal, sin afectación de la lámina elástica interna. En este estadio la agregación plaquetaria y el depósito de fibrina, secundario a la activación de la cascada de la coagulación, favorece los procesos trombogénicos.
- ❖ **Estadio III:** Afectación severa de las capas íntima y media.

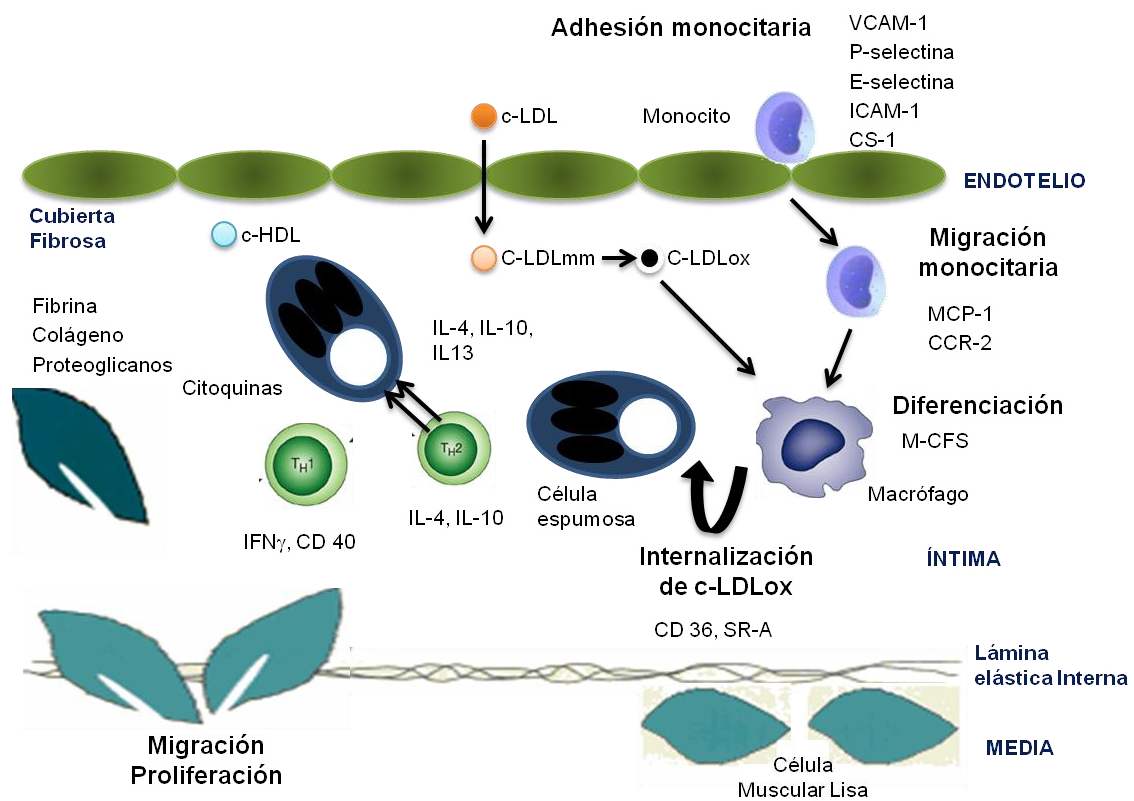


Figura 6. Mecanismos celulares y moleculares de la aterogénesis. Adaptado de Arias et al¹⁰. c-LDL, lipoproteínas de baja densidad; VCAM-1, moléculas de adhesión vascular 1; ICAM-1, moléculas de adhesión celular 1; CS-1, péptido de fibronectina (*connective segment 1*); c-HDL, lipoproteínas de alta densidad; c-LDLmm, c-LDL mínimamente oxidada; c-LDLox, c-LDL oxidada; IL-, interleucinas; Th, linfocito cooperador; IFN γ , interferón gamma; SR-A, receptor de tipo recolector (*scavenger*); MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos; M-CSF, factor estimulante de las colonias de macrófagos; CCR-2, receptor de M-CSF.

3.2.2. Aterosclerosis en la Enfermedad Renal Crónica

Como ya se ha señalado con anterioridad, la ERC se relaciona con una aterosclerosis acelerada, cuya etiopatogenia se asocia, fundamentalmente, a la presencia de una disfunción endotelial crónica^{14,44,58,64}. Diversos estudios necrópsicos⁸⁹ y clínicos^{90,91} han demostrado que la prevalencia de placas ateromatosas en arterias coronarias en pacientes en diálisis es significativamente superior que en la población general. Resultados similares se han observado mediante estudios ecográficos en otros territorios vasculares, como el iliaco o el carotideo⁷⁴. Estudios recientes, realizados en niños y adolescentes con ERC en estadios G1-G3, han constatado la presencia de un grosor íntima-media carotideo aumentado en la mayoría de los sujetos, lo que parece indicar que la aterosclerosis es un evento precoz en la ERC^{92,93}. Coll B et al⁹⁴, en un estudio similar en población adulta, observaron que el 62% de los pacientes con ERC presentaban engrosamiento de la íntima-media carotídea o placas ateromatosas, a pesar de tener un RCV bajo o intermedio (*score* <5%).

La incidencia de eventos cardiovasculares ateroscleróticos es aproximadamente tres veces superior en pacientes con ERC que en la población general⁹⁵. A este respecto, diversos estudios han demostrado que la tasa de reoclusión coronaria tras una angioplastia en pacientes urémicos es de un 70% anual, frente al 40 y 20% observado en pacientes con DM y en la población general, respectivamente^{96,97}. Así mismo, la tasa de re-estenosis tras stent coronario y la mortalidad a los 9 meses, es aproximadamente el doble en pacientes con ERC que en la población general⁹⁸.

3.3. Calcificaciones Vasculares

3.3.1. Definición, Clasificación y Fisiopatología

La calcificación vascular se define como la lesión resultante al depósito de fosfato cálcico, en forma de cristales de hidroxapatita, en vasos sanguíneos y válvulas cardíacas⁹⁹. Se distinguen dos tipos de calcificaciones arteriales en función del lugar de depósito del calcio: **calcificación de la íntima** y **calcificación de la media o esclerosis de Mönckeberg**¹⁰⁰. La calcificación de la íntima se asocia a la placa de ateroma y, por tanto, al aumento en el depósito de lípidos y el infiltrado de células inflamatorias; siendo sus principales manifestaciones clínicas la isquemia y la necrosis. La calcificación de la media, por su parte, está ligada a la rigidez vascular debida a la mineralización de las fibras elásticas, así como a la progresión de la aterosclerosis.

Este último tipo de calcificación extraósea se asocia, fundamentalmente, con un cambio fenotípico de las CMLV hacia células parecidas a osteoblastos, incrementándose la rigidez vascular y disminuyéndose la distensibilidad, lo que conduce a la aparición de HTA sistólica y a un incremento de la velocidad de la onda de pulso; contribuyendo a la evolución de la HVI y al compromiso del flujo coronario durante la diástole^{101,102}.

Clásicamente se consideraba a la calcificación vascular como un proceso pasivo y degenerativo, asociado a la edad avanzada, la aterosclerosis y a diversas patologías metabólicas, como la DM o la ERC. Sin embargo, desde hace algunos años, se ha descubierto que la calcificación vascular es, en realidad, un proceso activo y complejo, en el que están implicados numerosos mecanismos patogénicos, y que parece estar regulada por factores similares a los de formación y reabsorción ósea^{103,104,105}. Entre los principales factores asociados al desarrollo de calcificaciones vasculares, destacan la hiperfosfatemia, la edad avanzada, la dislipemia, la inflamación, el tabaquismo, la HTA, la DM y el sexo masculino¹⁰³ (Figura 7).

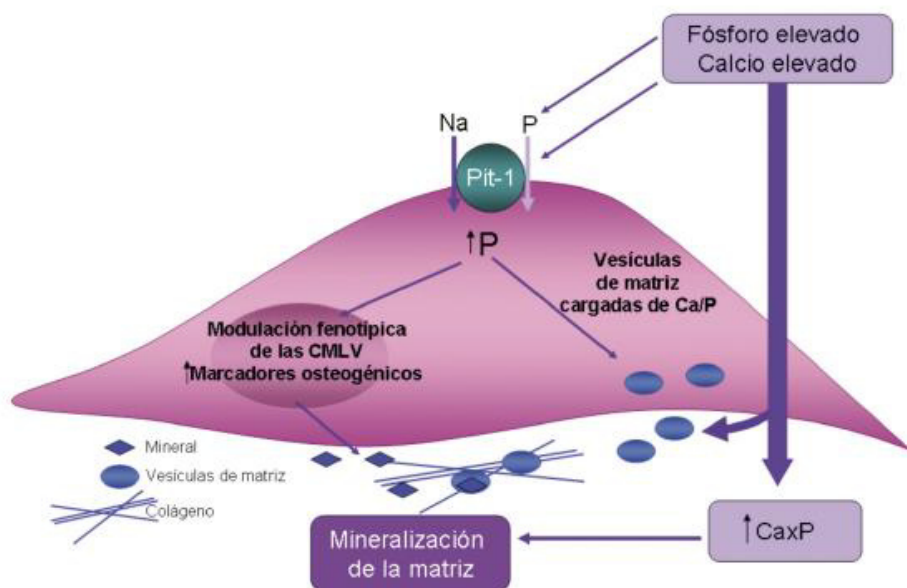


Figura 7. Efectos del calcio y el fósforo en la calcificación vascular. Adaptado de Shanahan et al¹⁰⁶.

3.3.2. Calcificaciones Vasculares, Riesgo Cardiovascular y Enfermedad Renal Crónica

En pacientes con ERC, la calcificación vascular generalizada es mucho más prevalente, más severa y sigue un curso más acelerado que en la población general^{107,108}. Estas lesiones se observan fundamentalmente en la capa media arterial y, con menor frecuencia, en la capa íntima¹⁰⁸. Goodman et al¹⁰⁹, en un estudio en el que evaluaron la presencia de calcificaciones coronarias mediante EBTC (tomografía computarizada por haz de electrones) en un grupo de sujetos menores de 30 años en HD crónica, observaron que el 80% de los sujetos presentaban una calcificación coronaria severa. Resultados similares fueron obtenidos por Caro et al¹¹⁰ en un estudio realizado en España en el que se incluyeron 44 pacientes en HD periódica, observándose una prevalencia de calcificaciones vasculares del 84%.

La calcificación vascular precoz y acelerada observada en la ERC se ha relacionado con la elevada prevalencia tanto de factores de riesgo convencionales, como de alteraciones del metabolismo óseo-mineral, lesiones ateroscleróticas e inflamación crónica^{10,103}. En pacientes con ERCT, las dosis elevadas de calcitriol, la sobrecarga de calcio, el tiempo en HD y el propio estado urémico *per se*, predisponen la transformación de las CMLV en células de estirpe osteogénica^{65,111}. La acidosis metabólica leve, por contra, parece mostrar un efecto protector, disminuyendo la incidencia de calcificaciones¹¹².

La presencia y extensión de las calcificaciones vasculares es un factor predictivo independiente de morbi-mortalidad cardiovascular, tanto en la población general como en pacientes con ERC¹¹³. Blacher et al¹¹⁴, en un estudio en el que incluyeron 110 pacientes con ERCT en HD, observaron que a medida que se incrementaba el número de vasos calcificados, la probabilidad de supervivencia a los 6 años disminuía drásticamente. London et al⁶⁵ también observaron una disminución de la supervivencia ligada a la presencia de calcificaciones vasculares en pacientes con ERCT, especialmente cuando éstas se localizaban en la íntima arterial.

Capítulo 3. Factores de Riesgo Cardiovascular en la Enfermedad Renal Crónica

1. Factores de Riesgo Cardiovascular Convencionales

Los pacientes con ERC comparten con la población general factores de RCV convencionales como: edad avanzada, sexo masculino, HTA, dislipemias, DM, tabaquismo, sedentarismo o antecedentes familiares de ECV, aunque la prevalencia de estos factores es muy superior en pacientes renales⁵³.

1.1. Tabaquismo

El tabaquismo es un factores de RCV reconocido en la población general y un predictor de aterosclerosis. La prevalencia del consumo de tabaco en pacientes con enfermedad renal es similar a la de la población general, si bien, el acumulo de nicotina es mayor en pacientes con ERC¹¹⁵.

El tabaquismo ha sido identificado como un factor de RCV en pacientes en TSR desde la década de los 80^{116,90}. Al favorecer la rigidez arterial y el desarrollo de HVI⁵⁸, el tabaquismo se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollo de insuficiencia cardiaca *de novo*, IAM, vasculopatía periférica y mortalidad en pacientes en HD^{117,118}. Por otra parte, el consumo de tabaco se asocia con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad renal, especialmente para aquellas nefropatías de etiología diabética o hipertensiva¹¹⁹.

1.2. Obesidad

La obesidad desencadena una serie de cambios hemodinámicos, estructurales y funcionales en el riñón, predisponiendo el desarrollo y la progresión de la ERC. Estos cambios se relacionan, principalmente, con el estímulo del sistema adrenérgico y del sistema renina-angiotensina, así como con modificaciones de la fisiología de las hormonas leptina y adiponectina¹²⁰. Las etiologías más habitualmente relacionadas con la obesidad son la nefropatía diabética, la nefrosclerosis hipertensiva y la esclerosis glomerular focal y segmentaria^{121,122}.

Aunque el número de ensayos clínicos que evalúan la relación entre obesidad y eventos cardiovasculares en pacientes con ERC es escaso, la obesidad se considera un factor independiente de RCV, asociándose a un deterioro acelerado de la función renal, y a un incremento de la prevalencia y de la magnitud de la albuminuria^{123,124}. En sujetos en HD, la mayoría de los estudios describen la existencia de una relación directa entre el índice de masa corporal (IMC) y la mortalidad global o cardiovascular¹²⁵. Sin embargo, es necesario señalar que otros estudios no han encontrado asociación¹²⁶ o, incluso, han observado la presencia de una relación inversa entre IMC y mortalidad¹²⁷.

Según las recomendaciones de las guías nacionales e internacionales para el manejo de la ERC, el control de la obesidad debe ser un objetivo primordial en el tratamiento del paciente con ERC, tanto como medida de prevención cardiovascular, como para frenar la progresión de la enfermedad renal⁴⁻⁵⁻⁸. Los mecanismos por los cuales la reducción de peso mejora la función renal son múltiples: mejor control de la PA, mejora del perfil lipídico y de la glucemia, aumento de la sensibilidad a la insulina, reversión de la hiperfiltración glomerular e inhibición del sistema renina-angiotensina¹²⁸. Las necesidades energéticas de los pacientes renales son similares a las de la población general, si bien la información disponible sugiere que la restricción proteica retrasa la progresión de la enfermedad renal⁸.

1.3. Hipertensión Arterial

La HTA es a la vez causa y consecuencia de la ERC¹²⁹. La prevalencia de la HTA es más alta en los pacientes con ERC que en la población general, aumentando de forma lineal a medida que disminuye el FG. Según los datos del *Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), aproximadamente el 40% de los pacientes con FG entre 60 y 90 mL/min/1,73m² presentaban una PA superior a 140/90 mmHg. Estos autores encontraron que el porcentaje de HTA se iba incrementando a medida que disminuía el FG, llegando al 75% en aquellos pacientes con FG inferior a 30 mL/min/1,73m²¹³⁰. Datos similares fueron obtenidos en el estudio MDRD, en el que la prevalencia de HTA aumentaba progresivamente del 65 al 95% cuando el FG disminuía de 85 a 15 mL/min/1,73m²¹³¹. Los principales factores asociados al incremento de la prevalencia y la severidad de la HTA en pacientes renales son: retención hidrosalina, aumento de la actividad del sistema renina-angiotensina y del sistema nervioso simpático, alteración de la síntesis de NO y disfunción endotelial,

hiperparatiroidismo secundario, y aumento de la presión de pulso por incremento de la rigidez arterial¹²⁹.

En pacientes con ERC, la HTA es tanto un factor de riesgo de progresión de la enfermedad, como de morbi-mortalidad cardiovascular, relacionándose con la aterogénesis y la aparición de eventos isquémicos agudos, así como con la calcificación coronaria arterial y el HVI, especialmente en pacientes en HD^{117,118}. Por ello, el objetivo del tratamiento antihipertensivo en estos pacientes es triple: disminuir la PA, reducir la incidencia de eventos cardiovasculares y enlentecer la progresión de la enfermedad renal.

1.4. Diabetes

La DM es la etiología más común de la ERCT, identificándose como causa principal de la enfermedad renal en aproximadamente el 40% de los nuevos pacientes²⁵. Por otra parte, la ERC, independientemente de la presencia o no de DM, se asocia, desde fases tempranas de la enfermedad, con resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Ambos hechos favorecen la acumulación de productos finales de la glicosilación, los cuales pueden producir daño endotelial y acelerar la aterogénesis¹³². En consecuencia, la nefropatía diabética se relaciona con un incremento de la morbi-mortalidad cardiovascular y global, estimándose la tasa de supervivencia a los 5 años en torno a un 10% para sujetos con DM de tipo 2 y en aproximadamente un 40% para DM de tipo 1¹³³.

El tratamiento intensivo de la hiperglicemia permite reducir las complicaciones micro y macrovasculares asociadas a la DM, si bien este tratamiento incrementa considerablemente el riesgo de hipoglucemia grave, especialmente en pacientes en TSR^{132,134}.

1.5. Dislipemia

En la población general, las dislipemias, y fundamentalmente la hipercolesterolemia, se consideran factores mayores o causales en el desarrollo de las ECV¹³⁵, así como una de las dianas terapéuticas más sensibles a las medidas de prevención y control¹³⁶. En los pacientes con ERC la prevalencia de dislipemia es muy elevada. Según datos del estudio NHANES III¹³⁰, el 28,6% de los pacientes con ERC en estadios G1 y G2 presentan alteraciones en la concentración de los lípidos y las lipoproteínas

plasmáticas, observando, además, que a medida que la función renal empeora, aumenta la concentración de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) y triglicéridos (TG), y desciende la concentración de c-HDL. En conjunto, se estima que entre el 60 y el 80% de los pacientes con ERC presentan algún grado de dislipemia¹²⁹

El patrón de dislipemia observada en la ERC para los estadios G1-G4 se caracteriza por un aumento de la concentración de TG, un aumento de remanentes de lipoproteínas [remanentes de quilomicrones y colesterol unido a lipoproteínas de densidad intermedia (c-IDL)] y una disminución de la concentración de c-HDL y apolipoproteína A1¹³⁷. La concentración de colesterol total (CT) y c-LDL puede estar aumentada o no, pero es posible observar cambios cualitativos importantes, ya que la proporción de c-LDL pequeñas y densas (c-LDLpd), consideradas altamente aterogénicas, está aumentada¹³⁸. Por contra, en el estadio G5 de la ERC el patrón de alteración lipídica depende de la modalidad de diálisis. La HD generalmente se asocia con bajas concentraciones de CT y c-LDL e hipertrigliceridemia; mientras que la DP se asocia con concentraciones elevadas de CT, c-LDL y TG¹³⁹.

Un análisis en profundidad del metabolismo lipídico en los pacientes con ERC, reveló la presencia de importantes alteraciones, como una disminución de catabolismo de los quilomicrones y del colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad (c-VLDL), y unas modificaciones post-translacionales de las alipoproteínas, especialmente en la apolipoproteína B100, por glicosilación, oxidación o carbamilación¹²⁹. Estas modificaciones dificultan la captación del c-LDL y favorecen su captación por el receptor recolector o *scavenger* LOX1, el cual juega un importante papel en la aterogénesis¹⁴⁰. En consecuencia, la concentración de colesterol no HDL (c-noHDL) y de apolipoproteína B está marcadamente aumentada. Por otra parte, se ha observado que la concentración de lipoproteína A aumenta a medida que disminuye el FG, comenzando en estadios muy tempranos de la ERC¹⁴¹.

A pesar de estar reconocida como un marcador de RCV, la ERC no había sido considerada en las recomendaciones para el tratamiento de la dislipemia hasta la reciente actualización de las Guías Europeas de Prevención Cardiovascular^{51,142}, cuyas nuevas directrices se producen en consonancia con las recomendaciones de las guías KDIGO para la Evaluación y Manejo de la ERC⁴. Ambas guías recomiendan realizar sistemáticamente un despistaje de dislipemia en los pacientes con ERC desde estadios tempranos de la enfermedad, y establecen como principal objetivo terapéutico la reducción de la concentración sérica de c-LDL a ≤ 70 mg/dL (**Tabla 7**)^{4,51,142}. La

concentración de c-noHDL se considera el segundo objetivo terapéutico en el manejo de dislipemias mixtas e incluso un predictor de riesgo más efectivo en pacientes con ERCT en HD⁵¹. Para este grupo de pacientes, el empleo del c-LDL como único marcador para la estratificación del RCV y el establecimiento de metas terapéuticas, ignora el potencial aterogénico de las lipoproteínas ricas en TG (c-VLDL y c-IDL), cuya concentración sérica se encuentra frecuentemente aumentada¹³⁹. Además, la obtención de muestras de sangre en condiciones de ayuno en pacientes en HD es más complejo que en la población general debido, entre otras causas, a la frecuencia aumentada de hipoglucemias e hipotensión. En condiciones de no ayuno, la concentración de TG se incrementa considerablemente, por lo que la concentración de c-noHDL, la cual puede ser fácilmente calculada restando la concentración de c-HDL a la de CT, puede ser un índice mucho más fiable de RCV en pacientes en HD¹⁴³.

	Recomendaciones NECP ATPIII (mg/dL)					Recomendaciones ESC/EAS (mg/dL)				
	CT ^a	LDL ^b	HDL ^c	noHDL ^d	TG ^e	CT ^a	LDL ^b	HDL ^c	noHDL ^d	TG ^e
Riesgo Bajo^f	<200	<160	>40	<190	<150	<190	<115	>40	<145	<150
Riesgo Medio^g	<200	<130	>40	<160	<150	<190	<115	>40	<145	<150
Riesgo Alto^h	<200	<100	>40	<130	<150	<190	<100	>40	<130	<150
Riesgo Muy Altoⁱ	<200	<70	>40	<100	<150	<190	<70	>40	<100	<150

Tabla 7. Concentraciones para los lípidos y las lipoproteínas séricas recomendados por el Tercer Informe del *National Cholesterol Education Program* para la Detección, Seguimiento y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en adultos (NCEP ATPIII) y por las Guías para el Manejo de las Dislipemias de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) y la Sociedad Europea de Aterosclerosis (EAS)^{51,142,144}. CT^a, colesterol total; LDL^b, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; HDL^c, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; noHDL^d, colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad; TG^e, triglicéridos. Riesgo bajo^f establecido por la presencia de uno o ninguno factores de riesgo cardiovascular (FRCV) asociados o por una estimación del riesgo cardiovascular (*Score*) <1%; Riesgo Medio^g establecido por la presencia de dos o más FRCV asociados o por un *Score* 1-5%; Riesgo Alto^h establecido por la constatación de enfermedad cardiovascular, enfermedad renal crónica moderada (Filtrado glomerular entre 30 y 60 mL/min/1,73 m²) o diabetes mellitus sin otros FRCV; Riesgo Muy Altoⁱ establecido por la presencia de enfermedad vascular ateromatosa, enfermedad renal crónica terminal o diabetes mellitus con otros FRCV asociados.

2. Factores de Riesgo Cardiovascular No Convencionales

2.1. Inflamación

2.1.1. Inflamación y Aterogénesis

En los últimos años, un número creciente de estudios prospectivos han demostrado el papel fundamental que desempeña la inflamación en la patogenia y evolución de la aterosclerosis, hasta el punto que, actualmente, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria a todos los efectos^{85,86,87}.

Los desencadenantes de la inflamación en la aterogénesis incluyen los factores cardiovasculares clásicos^{145,146}, como dislipemia, HTA, DM, obesidad o tabaquismo; así como la hiperhomocisteinemia^{147,148} y las infecciones¹⁴⁹. Estos estímulos aterogénicos provocan un daño en la pared vascular, que se asocia con un perfil proaterogénico, con elevación de lipoproteína a, fibrinógeno, leptina y disfunción endotelial; así como con una disminución de la concentración de proteínas antiaterogénicas, como la albúmina o la apolipoproteína A1⁸⁵. La respuesta inflamatoria no sólo promueve el inicio de un proceso aterosclerótico, sino que también contribuye al posterior crecimiento de la placa de ateroma y a la precipitación de sucesos trombóticos agudos^{85,86,150}.

En condiciones normales, el endotelio resiste la adhesión firme de leucocitos sanguíneos. Tras la activación inflamatoria, las células endoteliales aumentan la expresión de varios tipos de moléculas de adhesión leucocitarias, lo que favorece la adhesión y posterior migración de monocitos y linfocitos T a través de las células endoteliales hacia la pared arterial^{151,152}, en un proceso en el que también están involucradas varias citoquinas quimiotácticas¹⁵³. Una vez que los monocitos se adhieren a la pared arterial, adquieren características de macrófagos tisulares y células espumosas, las cuales secretan especies reactivas de oxígeno (ROS) y citoquinas proinflamatorias, como las interleucinas 1, 6, 12, 15 y 18 (IL-), las metaloproteasas, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o el factor tisular; amplificando el proceso inflamatorio local^{151,152,153}. La totalidad de las células vasculares son capaces de producir citoquinas, pero son los macrófagos las principales células secretoras y amplificadoras de la respuesta inflamatoria. La IL-12 y la IL-18 son inductores sinérgicos del interferón gamma (IFN γ), el principal promotor de linfocitos T y, por tanto, de su transformación en linfocitos T cooperadores. Las

citoquinas proinflamatorias también activan a las CMLV, además de promover el aumento de las moléculas de adhesión celular (ICAM-1) y vascular (VCAM-1) y de selectinas, incrementando el reclutamiento de leucocitos y, en consecuencia, amplificando la respuesta inflamatoria y el desarrollo de la lesión aterosclerótica (Figura 8)^{85,86,154}.

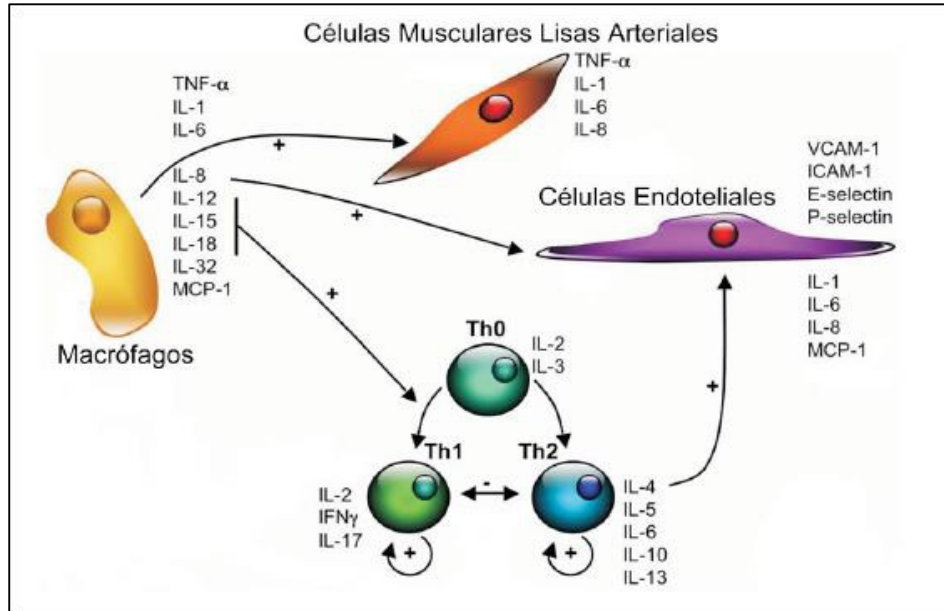


Figura 8. Principales citoquinas involucradas en la aterogénesis. Extraída de Rodríguez et al¹⁵⁴. IL-, interleucina; TNF α , factor de necrosis tumoral α ; MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos; VCAM-1, de moléculas de adhesión vascular; ICAM-1, de moléculas de adhesión celular; IFN γ , interferón gamma; E-selectin, selectina E; P-selectin, selectina P; Th, linfocitos T cooperadores.

2.1.2. Principales Marcadores Bioquímicos de Inflamación: Proteína C Reactiva

El diagnóstico bioquímico de inflamación se establece mediante la constatación de una elevación de los mediadores inflamatorios (IL-6, IL-1 o TNF α), o de determinadas proteínas denominadas **reactantes de fase aguda**, como la PCR, el fibrinógeno o la ferritina. El incremento plasmático de estas proteínas de síntesis hepática, es el resultado de una inducción enzimática causada, en la mayoría de los casos, por los mediadores inflamatorios, principalmente por la IL-6¹⁵⁵. Al mismo tiempo, estos mediadores inflamatorios son capaces de inhibir la síntesis hepática de la albúmina, prealbúmina y transferrina, proteínas que pueden considerarse como **reactantes de fase aguda de signo negativo**¹⁵⁶. De todos ellos, la PCR es el marcador inflamatorio

más utilizado en la práctica clínica, radicando su importancia no sólo en su elevada sensibilidad, sino también en el hecho de que ésta parece participar activamente en el mecanismo patogénico de la aterosclerosis¹⁵⁷.

La **PCR** fue descubierta en 1930 por William Tillet y Thomas Francis, mientras investigaban el suero de un paciente con neumonía aguda producida por *pneumococcus spp*. Estos autores observaron que el suero contenía una sustancia que precipitaba con el polisacárido C de este microorganismo, razón por la cual se bautizó a esta proteína como PCR. A mediados de la década de los 40, Avery y McCarty describieron la PCR como un reactante de fase aguda, que se sintetizaba como respuesta a estímulos inflamatorios¹⁵⁸.

La PCR, una proteína glicosilada perteneciente a la familia de las pentraxinas, forma parte de los mecanismos fisiológicos de la inmunidad innata, y su síntesis es inducida como respuesta al daño tisular mediado por infecciones, inflamación, traumatismos o neoplasias. Es sintetizada por los hepatocitos y las células del endotelio vascular, y su expresión está regulada por citoquinas, especialmente por la IL-6 y, en menor medida, por la IL-1 y el TNF α . La PCR se une con gran afinidad a una amplia variedad de ligandos tanto autólogos (lipoproteínas plasmáticas nativas y modificadas, membranas celulares dañadas, residuos de fosfatidilcolina, histonas, cromatina y células apoptóticas), como extrínsecos (glucanos, fosfolípidos y otros componentes somáticos y capsulares de bacterias, hongos y parásitos). Una vez unida a ligandos moleculares, la PCR es reconocida por C1q, activándose la vía clásica del complemento¹⁵⁹.

Tras un estímulo inductor, la concentración de PCR puede incrementarse hasta 1000 veces sobre su valor basal en las 24-48 h siguientes a la producción de daño tisular, permaneciendo elevada durante la respuesta de fase aguda y retornando a los valores basales una vez se restaura la función y estructura tisular^{158,159}.

2.1.3. Inflamación, Enfermedad Renal Crónica y Enfermedad Cardiovascular

La ERC se caracteriza por un estado de inflamación crónica^{125,126,160}, el cual parece aumentar con el grado de disfunción renal y acentuarse en aquellos sujetos en TSR, para los que la prevalencia de concentraciones elevadas de PCR se estima en torno al 50%^{125,126}. A este respecto, un análisis transversal del *Cardiovascular Health Study* evidenció un incremento de los niveles de PCR e IL-6 en los pacientes con valores elevados de creatinina sérica¹⁶⁰. Esta asociación seguía siendo significativa tras

ajustar por otros factores de RCV, así como limitando el estudio a sujetos sin evidencia de ECV clínica o subclínica.

Las causas por las que la ERC se asocia con una aumento generalizado de la respuesta inflamatoria son complejas debido a la presencia de múltiples factores subyacentes, entre los que se encuentran el propio estado urémico, la disminución del aclaramiento renal de citoquinas proinflamatorias, el aumento del estrés oxidativo o la malnutrición (**Figura 9**). Además, la presencia de comorbilidades asociadas como la insuficiencia cardiaca, la hipervolemia o la DM, así como la persistencia de determinadas infecciones crónicas, también parecen desempeñar un papel fundamental en el establecimiento del estado inflamatorio crónico^{14,161}. En los pacientes en HD, la exposición a las membranas de diálisis, la baja calidad bacteriológica del líquido de diálisis, la presencia de cuerpos extraños como catéteres que puedan dar lugar a infecciones evidentes u ocultas, o de injertos renales no funcionantes, también pueden contribuir al estado inflamatorio¹⁶¹.

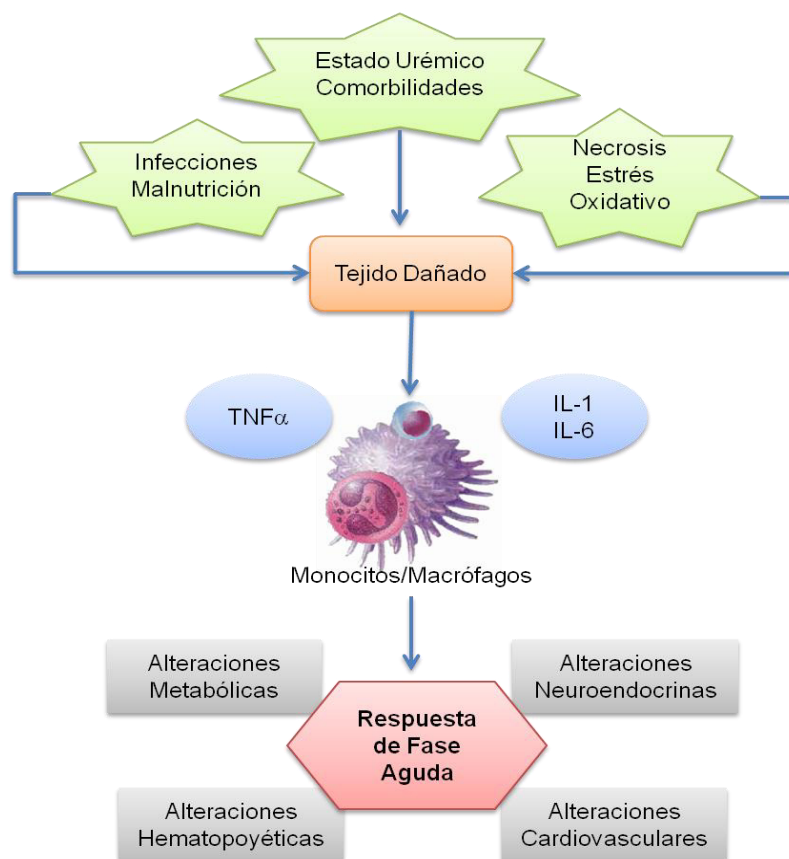


Figura 9. Esquema de la fisiopatología de la inflamación asociada a la enfermedad renal crónica. TNF α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-, interleucina.

La inflamación crónica está considerada como un factor de RCV en los pacientes con ERC, especialmente en aquellos con ERCT. Los resultados de numerosos estudios prospectivos y transversales muestran que la inflamación, definida por una concentración elevada de PCR, es un predictor independiente de morbi-mortalidad cardiovascular y global en pacientes con ERC o ERCT^{155,156,160}. Así mismo, la concentración de PCR parece correlacionarse con el grado de aterosclerosis carotídea y de la aorta torácica, así como con la HVI^{162,163}.

2.2. Troponina

2.2.1. Descripción, Fisiología y Métodos de Medida

La troponina es un complejo proteico presente en el músculo cardíaco y esquelético, cuya función es modular la interacción calcio-dependiente de la actina y la miosina, regulando la función contráctil del músculo estriado. La troponina está formada por tres subunidades polipeptídicas que presentan isomorfismo según el tipo de fibra muscular, y que se nombran según su función fisiológica: troponina T (TnT), troponina I (TnI) y troponina C (TnC)^{158,164}.

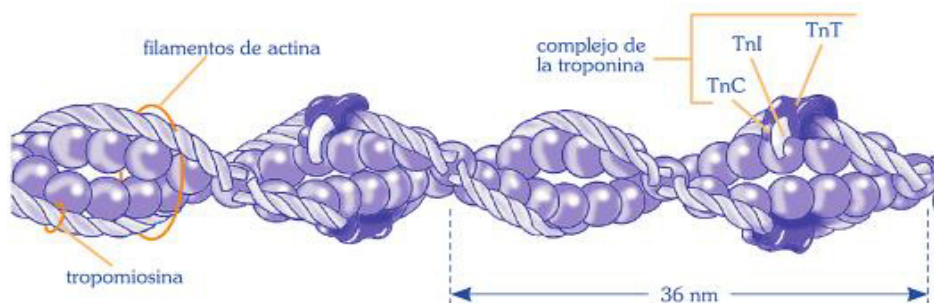


Figura 10. Tropomiosina y troponina en el filamento delgado del músculo estriado. Adaptado de Pertierra et al¹⁶⁴.

- ❖ La **TnT** es una proteína con una masa molecular de 42 KDa, que actúa como ligando del complejo de la troponina a la tropomiosina durante el proceso de contracción muscular¹⁵⁸. Se han descrito tres isoformas de la TnT, de las cuales solo una de ellas se encuentra presente en el músculo cardíaco (TnT2), diferenciándose de las isoformas esqueléticas en 11 aminoácidos¹⁶⁴.

- ❖ La **TnI**, con una masa molecular de 23 KDa, participa en la inhibición de la unión actina-miosina en ausencia de iones calcio (Ca^{2+}). Se han descrito tres isoformas de TnI, una de ellas presente exclusivamente en el músculo cardiaco (TnI3)¹⁵⁸; la cual presenta una secuencia aminoácida que se diferencia en un 40% de las descritas para las isoformas esqueléticas, además de una secuencia adicional de 31 aminoácidos¹⁵⁸.
- ❖ La **TnC** es una proteína de 18 KDa, cuya función en la contracción muscular es la fijación de iones Ca^{2+} ¹⁵⁸. Para la TnC se han identificado dos isoformas que, a diferencia de TnT y TnI, son idénticas en el músculo esquelético y cardiaco¹⁵⁸.

Las formas cardiacas de la troponina se encuentran predominantemente unidas a las fibras musculares, si bien, aproximadamente el 7% de la TnT y entre el 3 y el 5% de la TnI se encuentra en forma libre en el citoplasma del miocito¹⁵⁸. La liberación de troponina desde el miocito a la sangre puede producirse a consecuencia tanto de lesiones miocárdicas reversibles (isquemia) como irreversibles (necrosis). Ante un daño miocárdico, por tanto, se producirá un incremento de la concentración de troponina sérica que tendrá lugar en dos fases: un incremento precoz gracias a la fracción libre, seguido de un incremento gradual secundario a la liberación de troponina del complejo tropomiosina. Esta segunda fase de liberación se produce únicamente ante necrosis miocárdica, proceso por el cual los miocitos se dañan irreversiblemente y las membranas celulares se degradan. De esta forma, ante un IAM, la troponina será detectable en suero transcurridas 3-4 h del inicio del dolor torácico, alcanzara su concentración máxima a las 12-16 h y podrá seguir siendo detectable hasta 7-10 días después del IAM^{158,164,165}.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que cualquier mínima lesión celular que altere la permeabilidad de la membrana provocará la liberación de troponina cardiaca al torrente sanguíneo. En consecuencia, no sólo la necrosis miocárdica, sino cualquier condición que lesione los miocitos puede aumentar la concentración circulante de troponina¹⁵⁸. En la **Tabla 8** se recogen las principales causas cardiacas, distintas del IAM, y no cardiacas de elevación de la concentración sérica de troponina.

Causas Cardiacas	Causas No Cardiacas
Causas que producen lesión miocárdica	Alteraciones en órganos
Amiloidosis cardiaca	Edema pulmonar
Cirugía o contusión cardiaca	Embolia pulmonar
Miocarditis	Ictus cerebral
Pericarditis	Enfermedad renal crónica
Taquicardia supraventricular	Alteraciones generales
Causas que producen aumento del tamaño cardiaco	Pacientes en estado crítico
Hipertrofia ventricular izquierda	Quimioterapia en altas dosis
Insuficiencia cardiaca	Sepsis y <i>shock</i> séptico
Miocardiopatía	Ejercicio aeróbico intenso

Tabla 8. Principales causas de elevación de la troponina cardiaca en ausencia de isquemia coronaria.

Las marcadas diferencias entre las isoformas cardiacas y esqueléticas tanto de la TnT como de la TnI, han permitido desarrollar anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra las troponinas cardiacas. Los primeros métodos analíticos para la medida de la concentración de troponina fueron descritos en la década de los 90^{166,167}, si bien la sensibilidad analítica de éstos era relativamente baja, detectando únicamente concentraciones de troponina sérica superiores a 0,10 y 0,40 µg/L de TnT y TnI, respectivamente. Los métodos de medida iniciales, o de primera generación, han sido mejorados progresivamente, incrementándose significativamente la sensibilidad analítica (métodos de segunda generación). El punto cumbre de este desarrollo metodológico ha sido el reciente desarrollo de los llamados métodos de **alta sensibilidad o ultrasensibles**, tanto para la TnT (us-TnT) como para la TnI (us-TnI), los cuales permiten medir concentraciones de troponina entre 5-10 veces menores que las detectadas por los métodos de segunda generación y con una menor imprecisión analítica^{168,169}.

2.2.2. Troponina como Marcador de Daño Miocárdico

En el año 2000, las principales sociedades internacionales de cardiología presentaron una nueva definición del IAM, en la que se indicaba que toda necrosis en el contexto de una isquemia miocárdica se debía considerar como IAM, e incluía, por primera vez, a las troponinas cardiacas dentro del conjunto de biomarcadores de elección para el diagnóstico de IAM¹⁷⁰. Esta definición fue revisada en el año 2007, en un documento en el se presentó una definición de consenso o universal del IAM y en

el que se señalaba a las troponinas cardiacas como el marcador de elección para el diagnóstico y seguimiento del IAM, así como para la estratificación del riesgo de aparición de futuros eventos cardiovasculares¹⁷¹. La elección de la troponina frente a otros marcadores como la creatina quinasa MB (CK-MB), se justificó por su elevada especificidad tisular, así como por su elevada sensibilidad analítica. En el año 2012 se publicó la última actualización hasta la fecha de la definición universal de IAM¹⁷². Según esta definición, el diagnóstico de IAM requiere la detección de un incremento en la concentración sérica de los biomarcadores cardíacos, preferiblemente TnT o TnI, con al menos un valor superior al percentil 99 de la población de referencia, junto con la evidencia clínica o electrocardiográfica de isquemia miocárdica. Este valor de corte para el diagnóstico de IAM debe medirse con un imprecisión inferior al 10%, con el fin de evitar falsos positivos y facilitar la detección de cambios en la concentración sérica de troponina^{172,173}.

Hasta hace menos de 10 años, la mayoría de los métodos analíticos disponibles no permitían establecer el percentil 99 de una población de referencia con un rendimiento analítico adecuado, por lo que se empleaba como punto de corte la concentración detectable con un 10% de imprecisión, generalmente un valor más alto que el percentil 99¹⁷⁴. Sin embargo, el reciente desarrollo e implantación de los métodos de ultrasensibles, los cuales son capaces de cuantificar la concentración de troponina sérica en individuos sanos, han permitido establecer las concentraciones para el percentil 99 de una población de referencia con una precisión óptima¹⁷⁴. Estas mejoras en la sensibilidad analítica han permitido la detección de daños miocárdicos mínimos en un tiempo más corto desde la aparición de los síntomas, lo que mejora el diagnóstico precoz del IAM^{168,175}. Por contra, esta mayor sensibilidad ha incrementado el porcentaje de concentraciones anormalmente elevadas de troponina detectadas en varias situaciones clínicas agudas y crónicas que cursan con afectación cardíaca como, por ejemplo, el fallo cardíaco crónico¹⁷⁶ o la ERC¹⁷⁷. Teniendo en cuenta la elevada incidencia y prevalencia de eventos cardiovasculares en este grupo de pacientes, estos incrementos de troponina pueden dificultar el diagnóstico de IAM¹⁷².

Las guías de práctica clínica aprobadas por las principales sociedades internacionales de Cardiología y Bioquímica Clínica han abordado esta cuestión, y, para aquellos pacientes con concentraciones crónicamente elevadas de troponina cardíaca, recomiendan considerar como indicativo de IAM la presencia de un cambio en la concentración de troponina de al menos un 20% sobre el valor basal, medida a las 6-9 h tras la aparición de los síntomas¹⁷⁸.

2.2.3. Troponina en la Enfermedad Renal Crónica Terminal

Desde hace más de dos décadas, se ha constatado que la presencia de elevaciones crónicas en la concentración de troponina sérica es un hallazgo frecuente en los pacientes con ERCT, observándose una prevalencia en torno al 53%^{179,180}. Estos incrementos suelen producirse sin evidencias de daño cardíaco o síntomas clínicos^{181,180} y, además, no están correlacionados con la concentración de creatinina¹⁸². El mecanismo por el cual se produce la liberación de troponina cardíaca en la ERCT aún no está claramente establecido, aunque la hipótesis más aceptada es que el incremento de troponina se produce a consecuencia de la presencia de pequeñas áreas miocárdicas necrosadas que no llegan a producir síntomas clínicos (coronariopatía severa silente)^{183,184}. Otras causas, como la HVI, la disminución de la excreción renal de troponina o el estrés cardíaco secundario a la HD, también han sido propuestas para explicar su etiología^{185,186,187}.

Independientemente de la causa, las concentraciones elevadas de troponina sérica tienen su propia relevancia clínica. Diversos estudios han demostrado que la troponina es un importante predictor de morbi-mortalidad cardiovascular y global en pacientes con ERCT^{177,188,189} y, además, se postula que, junto con la PCR, podría ser el factor de RCV más potente de los que se dispone en la actualidad^{190,191}. En 2014, se publicó un nuevo metanálisis en el que se incluyeron 98 estudios en los que se evaluaba la concentración de troponina cardíaca en pacientes con ERC sin evidencias de síndrome coronario agudo (SCA)¹⁹². Estos autores encontraron que las concentraciones elevadas de troponina se asociaban con mortalidad cardiovascular y global en pacientes con ERCT, siendo el riesgo relativo (RR) y el intervalo de confianza al 95% (IC95%) observado para mortalidad global, tras ajustar los datos por edad y presencia de enfermedad coronaria arterial, de 3,0 (2,4-4,3) para la TnT y de 3,7 (1,9-4,6) para la TnI. El RR (IC95%) ajustado para mortalidad cardiovascular fue de 3,3 (1,8-5,4) y 4,2 (2,0-9,2) para TnT y TnI, respectivamente.

3. Factores de Riesgo Cardiovascular Específicos de la Uremia

3.1. Trastornos Nutricionales en la Enfermedad Renal Crónica

Los pacientes con ERC presentan un elevado riesgo de deterioro nutricional, especialmente aquellos en TSR. En el año 2008, la *International Society of Renal Nutrition and Metabolism* (ISRNM) propuso la adopción del término *protein energy wasting* (PEW) como nomenclatura unificadora de las alteraciones nutricionales en el paciente urémico¹⁹³. La SEN, por su parte, propone la utilización del término **desgaste proteico energético (DEP)** como traducción más fiel del término anglosajón¹⁹⁴. En este contexto, el DEP se define como un estado patológico donde hay un descenso o desgaste continuado tanto de los depósitos proteicos (músculo) como de las reservas energéticas (grasa).

3.1.1. Desgaste Proteico Energético y Enfermedad Cardiovascular

En el paciente renal, la presencia de DPE afecta a distintos órganos y sistemas, incluyendo el sistema inmune, endocrino, musculo-esquelético, tejido adiposo, hematopoyético, gastrointestinal, cardiovascular y a la cascada inflamatoria; lo que, en su conjunto, provoca un incremento de la mortalidad global y del riesgo de hospitalización^{195,196}.

En los últimos años la relación entre el DPE y la mortalidad cardiovascular en la ERCT ha alcanzado especial relevancia, hasta el punto de que el DPE se considera actualmente un nuevo factor de RCV que subyace al fenómeno de epidemiología inversa. Este fenómeno hace que marcadores que en la población general se asocian con una menor probabilidad de eventos cardiovasculares, como el descenso del IMC o concentraciones bajas de CT, se asocien con mayor presencia de ECV y menor supervivencia en pacientes en diálisis⁴³.

El DPE propicia un aumento del catabolismo muscular en el paciente urémico, tanto por la falta de nutrientes, como por el efecto combinado de la inflamación sistémica, la acidosis metabólica, las toxinas urémicas y el estrés oxidativo. La consecuencia es una pérdida de masa muscular que también afecta al tejido muscular de las arterias y el corazón, encontrándose asociaciones directas entre malnutrición, rigidez arterial y alteraciones en la estructura miocárdica. La distensión vascular continuada como consecuencia de la sobrecarga hidrosalina agrava este proceso y propicia la HVI^{10,194}.

Las restricciones dietéticas en el paciente urémico para limitar la ingesta de sodio, potasio o fósforo, entre otros, provocan con frecuencia la deficiencia de nutrientes esenciales como el selenio, el magnesio o las vitamina B12, K y D. El déficit de estos nutrientes producen alteraciones en la capacidad antioxidante y antiinflamatoria, así como en el metabolismo óseo-mineral¹⁹⁴. Como ejemplo, la prevalencia observada para el déficit de vitamina K en pacientes en HD es del 80%, y esta deficiencia se ha relacionado con un incremento del riesgo de fracturas óseas y de calcificación vascular, y, por tanto, a una mayor morbi-mortalidad cardiovascular¹⁹⁷. Por otra parte, el DPE se relaciona con un mayor riesgo de infecciones y de muerte por causas infecciosas^{198,199}.

3.1.2. Prevalencia del Desgaste Proteico Energético en la Enfermedad Renal Crónica

La prevalencia estimada del DPE en la población de diálisis oscila entre el 18 y el 75%¹⁵⁶; siendo una de las principales causas de esta imprecisión la gran variedad de herramientas de valoración y monitorización empleadas, así como los distintos puntos de corte establecidos entre los estudios epidemiológicos disponibles. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que la prevalencia de DPE en distintos países será un reflejo de la situación económica, del grado de desarrollo y de la prevalencia de la malnutrición en la población general.

En España, los primeros estudios sobre prevalencia de la malnutrición en sujetos con ERC datan de 1994. Lorenzo et al²⁰⁰, evaluaron el estado nutricional de 29 pacientes en HD crónica por medio de medidas antropométricas (pliegue tricípital, circunferencia muscular de brazo, IMC), parámetros bioquímicos (concentración sérica de albúmina) e ingesta proteica. Estos autores encontraron que, en el 65% de los sujetos estudiados, la reducción de reservas grasas y de proteínas era más marcada que lo que parecía indicar la evaluación del IMC, deficiente únicamente en el 38% de los sujetos. Ese mismo año se publicaron las primeras tablas de parámetros antropométricos para población española en HD (761 pacientes)²⁰¹, las cuales aún siguen en vigencia en la actualidad. La prevalencia de malnutrición en esta población, definida por parámetros antropométricos y marcadores bioquímicos como la albúmina y la transferrina, fue del 52% en varones y del 46% en mujeres. Los principales predictores de malnutrición fueron la edad avanzada, el índice de comorbilidad, el sexo masculino, el tiempo en HD y la tasa de catabolismo proteico normalizado. En el año 2013, Gracia-Iguacel et al²⁰² publicaron un estudio en el que se valoraba la prevalencia

del DPE, según los criterios de la ISRNM, en 122 pacientes en HD crónica. Los resultados de este estudio muestran una prevalencia del DPE del 37%, valor que se incrementó hasta un 41.1% cuando los pacientes fueron monitorizados por un periodo de dos años.

3.1.3. Mecanismos Implicados y Criterios Diagnósticos del Desgaste Proteico Energético

Los principales mecanismos fisiopatológicos implicados en el DEP de la ERC han sido recientemente revisados por la ISRNM¹⁹³. La anorexia y el aumento del catabolismo proteico, dan lugar a un desequilibrio energético, con un resultado final de aumento del gasto y del consumo de las fuentes de almacenamiento energético. El aumento de productos nitrogenados, junto con las alteraciones iónicas propias de la uremia, dan lugar a la aparición de trastornos gastrointestinales, como náuseas y vómitos, que reducen la ingesta. Además, comorbilidades frecuentemente asociadas a la ERC como la DM, la ECV, la inflamación crónica y la depresión, favorecen la anorexia^{203,204,205}. En sujetos en TSR, es necesario tener en cuenta también otros factores relacionados con la propia diálisis como la dieta restrictiva, la pérdida de aminoácidos y micronutrientes, la pérdida de sangre, la sobrecarga de volumen y otros factores psicosociales, que, en su conjunto, alteran el balance energético^{193,194}.

Los criterios diagnósticos para el DEP propuestos por la ISRNM se clasifican en cuatro categorías: criterios bioquímicos, masa corporal, masa muscular e ingesta dietética (**Tabla 9**). Para establecer el diagnóstico de DEP, se requiere cumplir al menos un criterio en tres de las cuatro categorías propuestas.

La publicación de estos criterios diagnósticos supuso un avance importante para la identificación y el abordaje terapéutico del DEP debido, fundamentalmente, a su naturaleza multifactorial (analítico, antropométrico y nutricional). Sin embargo, su aplicación en la práctica clínica resulta controvertida, ya que estos criterios se basan en unas mediciones o determinaciones que pueden ser cuestionadas de forma individualizada y, además, aún no se disponen de estudios que demuestren su validez diagnóstica o pronóstica^{194,206}.

Criterios Bioquímicos
Albúmina sérica < 3.8 g/dL
Prealbúmina < 30 mg/dL (únicamente para pacientes en diálisis)
Colesterol sérico < 100 mg/dL
Masa Corporal
Índice de masa corporal < 23 Kg/m ²
Pérdida de peso no intencionada ≥ 5% en 3 meses o ≥ 10% en 6 meses
Grasa corporal < 10% de la masa corporal
Masa Muscular
Pérdida de masa muscular ≥ 5% en 3 meses o ≥ 10% en 6 meses
Disminución del área muscular del brazo > 10% en relación al percentil 50 de la población de referencia
Ingesta Dietética
Ingesta proteica medida por la tasa de catabolismo proteico < 0.8 g/Kg/día o < 0.6 g/Kg/día en pacientes con ERC estadios G2-G5
Gasto energético calculado < 25 g/Kg/día durante al menos 2 meses

Tabla 9. Criterios diagnósticos para el Desgaste Proteico Energético propuestos por la *International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM)*. ERC, enfermedad renal crónica

3.1.4. Marcadores Bioquímicos de Desgaste Proteico Energético

Las guías K/DOQI recomiendan como marcador bioquímico de elección para la monitorización del estado nutricional de los pacientes con ERC, la medida de la concentración sérica de albúmina²⁰⁷. Sin embargo, como se trasluce de las recomendaciones de la ISRNM, otros marcadores como el CT, la transferrina o el perfil de aminoácidos séricos, pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico y monitorización del DEP.

3.1.4.1. Albúmina

La albúmina es la proteína plasmática más abundante del organismo, constituyendo hasta dos tercios de las proteínas totales en plasma. Entre sus principales funciones fisiológicas destacan el mantenimiento de la presión oncótica plasmática, la cual contribuye a la normal distribución de los líquidos en los espacios vascular e intersticial; y su capacidad de unión a un gran número de constituyentes séricos, como ácidos grasos, hormonas, enzimas, oligoelementos y diversos tóxicos, actuando como un reservorio de alta capacidad para estabilizar la concentración de ligandos libres²⁰⁸. Así mismo, la albúmina se considera una de las reservas nitrogenadas más importantes del organismo. La fracción proteica que permanece unida a los tejidos en

el espacio intersticial, es incorporada por las células y catabolizada a los correspondientes aminoácidos no esenciales, los cuales son posteriormente transportados al hígado^{165,208}.

La concentración sérica de albúmina refleja el equilibrio entre la síntesis hepática y su degradación. Ambos procesos se alteran no solo en las situaciones de aporte proteico insuficiente, sino también como consecuencia de afecciones hepáticas, traumatismos y procesos inflamatorios o infecciosos. Por otra parte, la distribución de la albúmina entre los espacios intra y extravascular, aproximadamente del 50-50% en condiciones fisiológicas, puede verse alterada por diversas patologías entre las que se encuentran la ERC y la proteinuria, lo que puede enmascarar su concentración sérica real. Todos estos factores, junto con una vida media relativamente larga (18-20 días), hacen que la determinación de albúmina sérica sea un marcador poco sensible a las alteraciones recientes de la nutrición^{208,209}.

A pesar de su falta de sensibilidad, la albúmina es el marcador bioquímico empleado con más frecuencia en la evaluación del DEP. Las guías K/DOQI recomienda como objetivo terapéutico para la prevención del DEP, una concentración de albúmina sérica superior a 4 g/dL²⁰⁷.

3.1.4.2. Transferrina

La transferrina es, junto a la albúmina, el marcador bioquímico más empleado para la valoración del estado nutricional. Es una proteína de síntesis hepática, con una vida media de 8-10 días y una distribución corporal limitada. Su principal función fisiológica es el transporte de hierro, al que se encuentra unida en un 30-40% del total²⁰⁸.

La transferrina es un marcador más sensible que la albúmina a las alteraciones nutricionales precoces, y responde con más rapidez a los cambios en el estatus proteico. Sin embargo, al igual que ocurre con la albúmina, la concentración sérica de transferrina se ve afectada por una serie de factores distintos de la DEP, como las enfermedades gastrointestinales, renales o hepáticas, los procesos inflamatorios o infecciosos, y, fundamentalmente, el estado metabólico del hierro. En estados deficitarios de hierro, la concentración de transferrina sérica aumenta significativamente a consecuencia de un incremento en su síntesis hepática; mientras que ante una sobrecarga férrica, la concentración de transferrina disminuye.

Todas estas variables dificultan considerablemente la interpretación de los resultados bioquímicos de la transferrina sérica, ya que una disminución en su concentración en un cuadro de DEP puede verse enmascarada por un incremento asociado a un déficit de hierro. A pesar de estas limitaciones, la transferrina puede ser un marcador de utilidad en el establecimiento del diagnóstico de DEP, siempre que se valore junto con otros datos clínicos y bioquímicos, como la concentración sérica de ferritina. En general, se acepta que concentraciones séricas entre 150-200 mg/dL se consideran indicativas de depleción proteica leve, entre 100-150 mg/dL de depleción moderada, e inferiores a 100 mg/dL reflejan una depleción grave²¹⁰.

3.1.4.3. Colesterol

En la evaluación de los factores de riesgo de morbi-mortalidad en pacientes con ERC a menudo se observan tendencias paradójicamente opuestas a las observadas en la población general, en lo que se conoce como fenómeno de epidemiología inversa o paradoja de la obesidad urémica. Entre los ejemplos más llamativos se encuentra la hipercolesterolemia. Cuando se segrega a los pacientes en función de la presencia de DPE, se observa que, en aquellos con DPE, la hipercolesterolemia es un factor protector, mientras que, en ausencia de DPE, éste es un factor de riesgo; lo que parece indicar que, ante un proceso de consumo energético acelerado, el CT se convierte en un marcador de las reservas grasas del organismo¹⁹⁴.

Sin embargo, la concentración sérica de CT es poco sensible e inespecífica como marcador bioquímico de DEP, debiendo emplearse exclusivamente como una herramienta de clasificación nutricional: aquellos pacientes con concentraciones de CT inferiores 150-180 mg/dL deberán ser evaluados tanto en búsqueda de déficits nutricionales, como de otros estados comórbidos²⁰⁷.

3.1.4.4. Perfil de aminoácidos Libres Plasmáticos

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que contienen tanto un grupo amino (NH₂) como un grupo carboxilo (COOH)²¹¹, distinguiéndose por las distintas cadenas laterales o grupos R. Solo 20 aminoácidos, todos ellos de tipo α , pueden encontrarse formando parte de péptidos y proteínas; considerándose a 8 de ellos como esenciales, al no poder ser sintetizados de forma endógena por el ser humano. En condiciones normales, el suplemento de aminoácidos necesario para la síntesis endógena de proteínas proviene del aporte proteico de la dieta. Una vez ingeridas, las enzimas

proteolíticas del tracto gastrointestinal degradan las proteínas a sus correspondientes aminoácidos, los cuales son absorbidos en el yeyuno, y transportados por el torrente sanguíneo al hígado y otros tejidos para ser utilizados en la síntesis de proteínas plasmáticas e intracelulares²¹².

Cada uno de los aminoácidos plasmáticos presenta una vía degradativa propia, en la cual el nitrógeno y el esqueleto carbonado que los componen, son utilizados para la síntesis de otros aminoácidos, carbohidratos y lípidos. Tanto el hígado como los riñones participan activamente en la interconversión de aminoácidos por transaminación, así como en su degradación por desaminación, incorporándose los iones amonio así generados al ciclo de la urea. Los aminoácidos sanguíneos se filtran a través de las membranas glomerulares, reabsorbiéndose a nivel de los túbulos renales. Se han descrito múltiples sistemas de transporte mediante procesos de transporte activo o difusión facilitada, destacando aquellos para aminoácidos neutros, para aminoácidos básicos y cisteína, para iminoácidos y glicina, y para ácidos dicarboxílicos^{19,212}.

El término perfil de aminoácidos se utiliza para designar a aquellos aminoácidos que se encuentran en el organismo de forma libre, no unidos a péptidos o proteínas. La concentración del perfil de aminoácidos plasmáticos es un reflejo del equilibrio entre su aporte (a través de la dieta, la absorción intestinal, el recambio proteico y la síntesis endógena de aminoácidos no esenciales), y su consumo (por parte del hígado y tejidos no hepáticos, síntesis endógena proteica y catabolismo)²¹³.

Los pacientes con ERCT presentan con frecuencia alteraciones significativas en el perfil de aminoácidos intracelular y plasmático, lo que se ha atribuido a factores tales como las dietas hipoproteicas o la ingesta inadecuada, a las alteraciones en el catabolismo de proteínas o aminoácidos, así como al propio procedimiento de HD crónica^{214,215}. Por lo tanto, la evaluación del perfil de aminoácidos plasmáticos puede proporcionarnos información muy útil acerca del estado nutricional del paciente con ERC. Sin embargo, la elevada complejidad del método de medida y el tiempo necesario para su determinación, hacen que su disponibilidad en la práctica clínica sea limitada, por lo que no es un marcador bioquímico utilizado habitualmente.

3.2. Anemia en la Enfermedad Renal Crónica

La anemia contribuye de forma relevante a la sintomatología y la calidad de vida del paciente con ERC; asociándose su presencia y severidad con un incremento de la morbi-mortalidad global y cardiovascular, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad^{118,216}.

3.2.1. Anemia y Riesgo Cardiovascular en la Enfermedad Renal Crónica

La anemia renal se asocia con una disminución de la liberación y utilización de oxígeno en los tejidos; lo que conduce a un aumento compensatorio del gasto cardiaco y del retorno venoso, así como a una disminución de las resistencias vasculares periféricas. Si estos cambios hemodinámicos persisten en el tiempo, inducen una sobrecarga de volumen que favorecen el desarrollo de HVI, dilatación del ventrículo izquierdo e insuficiencia cardiaca. Además, la anemia produce un aumento de la actividad simpática, la cual induce un incremento en la frecuencia cardiaca y en la contractibilidad miocárdica, así como una redistribución del flujo sanguíneo mediante vasoconstricción preferente en los ámbitos esplácnico, esquelético y periférico. El aumento de la actividad simpática y la vasoconstricción periférica estimulan el sistema renina-angiotensina-aldosterona, lo que favorece la retención de agua y Na⁺. Esta activación neuroendocrina puede tener efectos deletéreos a largo plazo en la función cardiaca, favoreciendo el crecimiento y la dilatación del ventrículo izquierdo, así como la fibrosis miocárdica²¹⁷. En el paciente con ERC, a estos cambios asociados a la anemia se añaden otros factores relacionados con la propia uremia, como la hipervolemia, la HTA o la rigidez arterial, que también favorecen el desarrollo de HVI. Finalmente, la anemia se asocia a un aumento del estrés oxidativo, ya de por sí aumentado en la uremia, ya que el glutatión de los hematíes es el principal componente antioxidante de la sangre (**Figura 11**)²¹⁸.

La anemia en la ERC se relaciona con el desarrollo de HVI y de insuficiencia cardiaca congestiva de *novo* o recurrente, así como con una mayor morbi-mortalidad cardiovascular y global^{216,219}. En un análisis combinado de 4 estudios poblacionales (ARIC, *Cardiovascular Health Study*, *Framingham Heart Study* y *Framingham Offspring Study*), la presencia conjunta de signos electrocardiográficos de HVI y anemia en pacientes con ERC, se asoció a un mayor riesgo de desarrollar ECV con respecto al observado para los pacientes que solo tenían HVI, y especialmente, a

aquellos que no presentaban ningún factor²²⁰. Estos datos demuestran el papel aditivo e independiente de la anemia sobre el RCV en los pacientes renales.

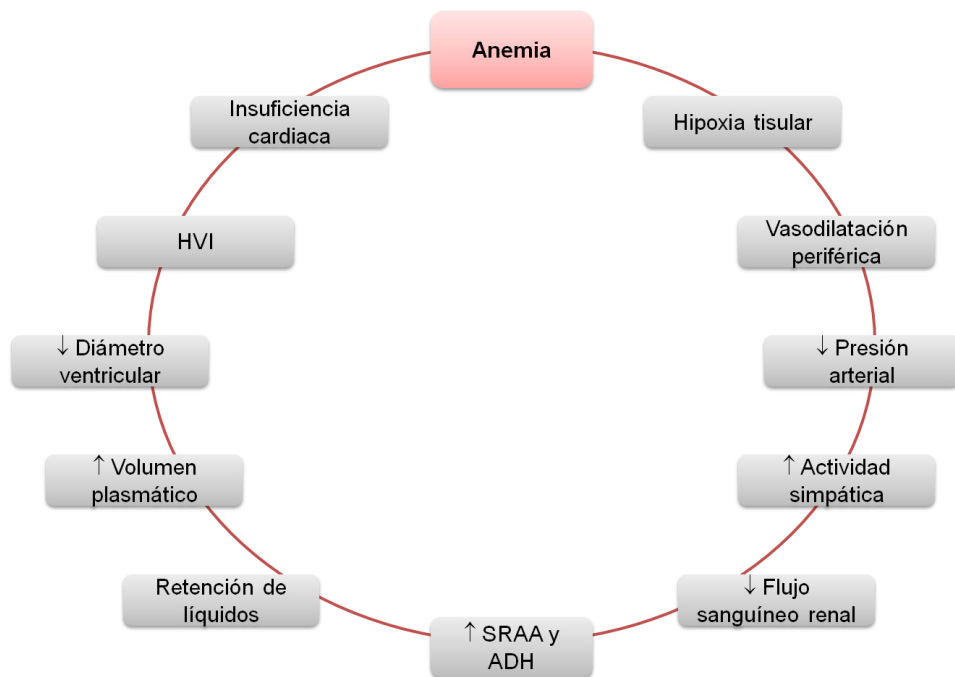


Figura 11. Relación de la anemia y la enfermedad cardiovascular. ADH, hormona antidiurética; SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona; HVI, hipertrofia ventricular izquierda. Adaptado de Arias et al¹⁰.

3.2.2. Prevalencia de la Anemia en la Enfermedad Renal Crónica

La prevalencia y la gravedad de la anemia aumenta a medida que disminuye la función renal (**Figura 12**)^{210,221}. Los datos del estudio MERENA²²², un estudio multicéntrico observacional realizado en España en una cohorte de 1.115 sujetos con ERC, mostraron una prevalencia de anemia renal del 39% y del 51% en estadios G3 y G4, respectivamente. En el estadio G5 de la ERC y en pacientes con ERCT en diálisis, se estima que aproximadamente el 90% de los sujetos presentan anemia²²⁶.

Un reciente estudio prospectivo realizado en España en un grupo de 439 pacientes con ERC sin anemia, mostró que, tras un periodo de seguimiento de 3 años, el 35% de los sujetos desarrollaban anemia. Estos sujetos presentaron, además, una progresión más rápida de la ERC que aquellos que no desarrollaron anemia, así como un mayor riesgo de hospitalización, aparición de eventos cardiovasculares y mortalidad²²³.

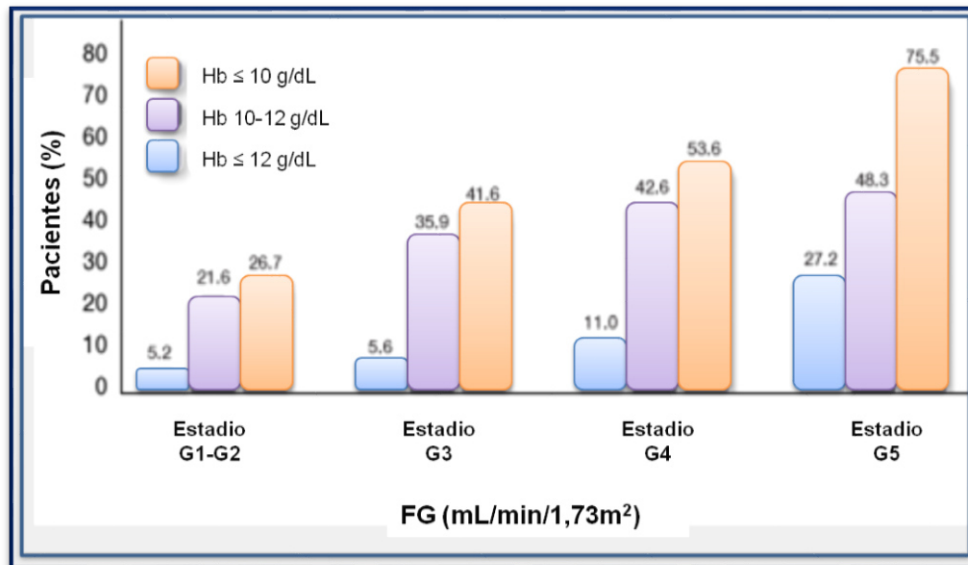


Figura 12. Prevalencia de la Anemia en los distintos estadios de la Enfermedad Renal Crónica. Adaptado de McClellan et al²²¹. GFR, filtrado glomerular; Hb, hemoglobina.

3.2.3. Definición y Etiología de la Anemia en la Enfermedad Renal Crónica

La anemia renal es una anemia hiporregenerativa, caracterizada por una reducción de la masa eritroide sin alteraciones en el volumen (normocítica) ni en la Hb corpuscular (normocroma), y con distribución eritrocitaria normal. En el frotis de sangre periférica se pueden observar espiculaciones en la membrana del eritrocito, mientras que la médula ósea muestra hipoplasia eritroide sin alteraciones de la serie blanca ni de las plaquetas¹⁰.

Los criterios para el diagnóstico de la anemia en la ERC han ido cambiando en los últimos años a medida que se publicaban distintas guías de práctica clínica. En el año 2004, *The European Best Practice Guidelines on Anemia*, propuso como criterio para el diagnóstico de anemia la presencia de una concentración de hemoglobina (Hb) inferior a 11,5 g/dL en mujeres, 13,5 g/dL en hombres con edad inferior a 70 años y 12,0 g/dL en hombres de más de 70 años²²⁴. En el 2006, las guías K/DOQI para el Manejo de la Anemia en la ERC modificaron esta definición previa, recomendando como límite inferior normal una concentración de Hb de 13,5 g/dL en hombres adultos, independientemente de la edad, y de 12,0 g/dL en mujeres²²⁵. La publicación en el año 2012 de las guías KDIGO para el manejo de la anemia dieron un nuevo giro a estos criterios. Las recomendaciones de esta guía, basadas en la definición de la anemia

proporcionada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), establecen como límite inferior normal una concentración de Hb de 13,7 g/dL para varones entre 20 y 60 años y de 13,2 g/dL para varones de más de 60 años. Para mujeres de cualquier edad el límite establecido para la Hb es 12,2 g/dL²²⁶. Aunque esta última definición es de gran utilidad para propósitos epidemiológicos, en la práctica clínica continua empleándose la definición proporcionada por las guías K/DOQI debido a su fácil implementación.

La causa principal de la anemia en la ERC es la **producción inadecuada de eritropoyetina (EPO)**. La EPO, una glucoproteína de 165 aminoácidos y masa molecular de 30.4 KDa, es sintetizada a nivel renal y hepático. La producción hepática de EPO es predominante durante la etapa fetal, mientras que el 85-90% de la síntesis de EPO en el adulto se produce a nivel renal. La disminución de la producción renal de EPO no es compensada por un hígado normal, aunque en procesos de regeneración hepatocitaria o tumorales se puede observar un aumento de la síntesis hepática de esta hormona^{10,19}.

El principal estímulo para la producción de EPO es la hipoxia, siendo su concentración plasmática normal de 10-30 mU/mL^{10,19,33}. Esta concentración aumenta rápida y exponencialmente en situaciones de hipoxia, pudiendo alcanzar valores cientos de veces superiores al valor basal en sujetos con anemia aguda. En los pacientes con ERC, paradójicamente, los valores de EPO son similares a los de la población general, aunque inapropiadamente bajos en relación a la concentración de Hb^{10,19}.

Junto con el déficit de EPO, otros factores pueden contribuir al desarrollo, mantenimiento y agravamiento de la anemia en la ERC, como son: el acortamiento de la vida media de los hematíes, la inhibición de la eritropoyesis por toxinas urémicas, el déficit de hierro, la inflamación crónica, el hiperparatiroidismo, la toxicidad por aluminio o el déficit de ácido fólico y vitamina B12. Las alteraciones en la síntesis del ADN secundarias al déficit de ácido fólico y vitamina B12, y la consecuente disminución en la proliferación y maduración celular, dan lugar a una eritropoyesis ineficaz caracterizada por una asincronía núcleo-citoplasma, que se manifiesta clínicamente como una anemia macrocítica normocroma o anemia megaloblástica²²⁶. Si bien la prevalencia de la anemia megaloblástica en la ERC es baja, su valoración es de gran importancia para el adecuado diagnóstico y tratamiento de la anemia renal, especialmente en aquellos pacientes con DEP o cuando la severidad de la anemia sea desproporcionada en relación al grado de deterioro de la función renal^{224,226}.

3.2.4. Principales Marcadores Bioquímicos de la Anemia

Junto con la Hb, parámetro esencial para el diagnóstico de anemia, los mejores marcadores bioquímicos disponibles actualmente para la evaluación y monitorización de la anemia son el hierro, la transferrina, la ferritina, la vitamina B12 y el ácido fólico.

3.2.4.1. Hierro

El hierro es un micronutriente esencial que forma parte de numerosas proteínas como la hemoglobina, la mioglobina, la ribonucleótido-reductasa, el citocromo P450 o los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. La absorción del hierro procedente de la dieta es regulada por las células del epitelio intestinal; mientras que la regulación de las reservas depende de un sistema coordinado en el que intervienen varios compartimentos de distribución, y tres proteínas que regulan los mecanismos de transporte (transferrina), reserva (ferritina) y utilización celular (receptores de transferrina). El contenido de hierro en el organismo es de 65-75 mmol, del cual aproximadamente el 80% se halla formando parte de la hemoglobina, alrededor de un 20% se acumula en los tejidos unido a la ferritina y menos del 0,1% se encuentra circulante en plasma unido a la transferrina¹⁶⁵.

La concentración sérica de hierro se ve afectada por numerosos factores tales como la edad, el sexo o la inflamación; además de verse influida por variaciones nictemerales diurnas, las cuales, a su vez, dependen de los ritmos circadianos de la EPO y de los horarios de ingestión de alimentos. Además, la concentración de hierro presenta importantes fluctuaciones aleatorias, no relacionadas con procesos fisiológicos o fisiopatológicos¹⁶⁵. Por todo ello, la determinación aislada de hierro sérico tiene un uso limitado, recomendándose siempre una evaluación simultánea junto a otros parámetros indicadores de su biodisponibilidad [transferrina y saturación de transferrina (ST)] y de sus reservas (ferritina)²⁰⁵.

3.2.4.2. Transferrina y Saturación de Transferrina

Como respuesta o mecanismo compensatorio, el déficit de hierro induce un incremento en la síntesis hepática de transferrina y, por tanto, en su concentración sérica. En condiciones fisiológicas, aproximadamente 1/3 de la transferrina se encuentra unida a hierro; mientras que en un estado de ferropenia, la transferrina circulante transportará una menor proporción de hierro, disminuyendo su tasa de

saturación. La sobrecarga de hierro, por contra, suprime la expresión de transferrina, disminuyendo su concentración sérica y aumentando la ST¹⁶⁵.

La concentración sérica de transferrina no está sometida a ritmos circadianos y presenta menos fluctuaciones que la concentración de hierro. Sin embargo, al ser un reactante de fase aguda negativo, su concentración se verá disminuida en procesos infecciosos o inflamatorios. Otros factores, como las enfermedades gastrointestinales, hepáticas, renales o el DEP, también pueden disminuir su concentración sérica en ausencia de sobrecarga de hierro. Por tanto, aunque tanto la transferrina como la ST se consideran marcadores altamente sensibles de ferropenia funcional, en la evaluación de la anemia renal, será necesario mostrar especial cautela en la interpretación de sus resultados, debido a la elevada prevalencia de comorbilidades como la inflamación crónica y el DEP^{10,205}.

3.2.4.3. Ferritina

La ferritina es una glicoproteína esférica de 450 KDa constituida por 24 subunidades polipeptídicas (apoferritina) que, al unirse, forman una cavidad central con capacidad para almacenar hasta 4500 átomos de hierro como fosfato hidróxido férrico¹⁶⁵. La principal función de la ferritina es, por tanto, la incorporación y el almacenamiento de hierro. En condiciones normales, aproximadamente el 20% del hierro absorbido por vía intestinal es almacenado en el tejido reticulohistiocitario incorporado a la ferritina, especialmente en el hígado, el bazo y la médula ósea^{164,165}.

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre la ferritina intracelular y la extracelular: cuanto menor sea el hierro almacenado, menor es la ferritina intracelular y, en consecuencia, la ferritina extracelular disminuye. Por lo tanto, la concentración de ferritina sérica proporciona una estimación fidedigna de las reservas de hierro del organismo. En estados ferropénicos, la concentración de ferritina disminuye de forma más precoz que otros marcadores del metabolismo del hierro, considerándose un marcador temprano de la disminución de la reserva de hierro hístico. En pacientes con ERC, concentraciones de ferritina inferiores a 30 ng/mL se consideran indicativas de un déficit severo de hierro y predicen con elevada fiabilidad la ausencia de depósitos férricos en la médula ósea^{165,205}.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la ferritina es un reactante de fase aguda, por lo que su concentración sérica se incrementará como respuesta a inflamaciones, infecciones o traumatismos. Por lo tanto, los valores de ferritina

deberán ser interpretados con precaución en los pacientes con ERC, especialmente en aquellos con ERCT, donde la inflamación crónica es altamente prevalente^{125,126,160}.

3.2.4.4. Vitamina B12

El término vitamina B12 o cobalamina comprende a todos los componentes de un grupo de compuestos organometálicos constituidos por un anillo corrinóide, con un átomo de cobalto central, y diversos ligandos axiales que dan lugar a las diferentes formas de la cobalamina: hidroxicobalamina (forma natural de la vitamina B12), glutationilcobalamina, metilcobalamina y adenosilcobalamina¹⁶⁴. La absorción intestinal de la vitamina B12 procedente de la dieta requiere de un mecanismo altamente especializado, en el que intervienen tres sectores del tracto digestivo: el estómago, el páncreas y el íleon terminal. Este proceso está mediado, fundamentalmente, por la producción de factor intrínseco, una glicoproteína secretada por las células parietales gástricas. Tras su absorción, la vitamina B12 une a la transcobalamina II, una proteína de síntesis enterocítica, para su transporte a través de la corriente sanguínea a los tejidos diana. El hígado capta y almacena la mayoría de la vitamina circulante, siendo la cantidad almacenada en el organismo en condiciones fisiológicas de 2-3 mg¹⁶⁵. La excreción se produce fundamentalmente por vía biliar, con una tasa de excreción diaria de 0,5-5 µg; de la cual al menos el 65-75% es reabsorbida en el íleon, mediante un mecanismo de conservación altamente eficaz^{165,209}.

La vitamina B12 es un nutriente esencial para todas las células del organismo, y su déficit causa alteraciones en la función o la morfología de varios sistemas orgánicos, dando lugar, principalmente, a alteraciones de tipo hematológico (anemia megaloblástica) y neurológico^{165,226}. La causa más frecuente de esta deficiencia es una disminución de la biodisponibilidad del factor intrínseco, la cual puede tener un origen autoinmune, genético o secundario a una atrofia gástrica. Otras causas asociadas al déficit de vitamina B12 son el DEP, los síndromes de malabsorción intestinal o la deficiencia congénita de transcobalamina II²⁰⁹.

3.2.4.5. Ácido Fólico

El término ácido fólico se aplica a toda una familia de vitámeros con actividad biológica equivalente; y que tienen en común la estructura del ácido pteroilglutámico¹⁶⁴.

Los folatos procedentes de la dieta se absorben en forma de derivados monoglutámicos a nivel intestinal, los cuales son posteriormente reducidos y metilados en el hígado para formar el 5-metil-tetrahidrofolato (5-metilTHF), forma biológicamente activa del ácido fólico. En el plasma, el 5-metilTHF se encuentra unido a proteínas, principalmente a la albúmina y a la proteína ligante de folatos. La excreción de folato se produce por vía biliar y renal, reabsorbiéndose una parte importante del folato excretado, tanto a nivel enteropático como tubular²⁰⁹.

La captación de folato por los tejidos depende de un transportador específico de la vitamina B12, por lo que sus funciones fisiológicas y su metabolismo están estrechamente relacionados^{165,226}. Las principales causas del déficit de ácido fólico son la disminución de la ingesta, los síndromes de malabsorción intestinal, el alcoholismo crónico o el déficit de vitamina B12²⁰⁹.

3.3. Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral

El término osteodistrofia renal ha sido empleado tradicionalmente para referirse a las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en los pacientes con ERC. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que las alteraciones del metabolismo óseo-mineral tienen dos dianas principales: el esqueleto y el sistema cardiovascular, existiendo una estrecha conexión entre ambas alteraciones.

Basándose en estos hallazgos, la Fundación KDIGO propuso en el año 2009 una nueva definición y un sistema de clasificación más integrado, introduciendo el concepto de **alteración óseo-mineral asociada a la ERC**²²⁷. Este término, derivado del anglosajón *Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder* (CKD-MBD), integra todas las alteraciones bioquímicas, esqueléticas y extraesqueléticas que tienen lugar a consecuencia de las alteraciones del metabolismo mineral en la ERC, considerándose ésta una enfermedad sistémica^{103,227}, caracterizada por la presencia de una o varias de las siguientes manifestaciones:

- ❖ Anormalidades del calcio, fosfato, PTH y vitamina D.
- ❖ Alteraciones en el remodelado, mineralización, volumen, crecimiento o fragilidad ósea.
- ❖ Calcificaciones cardiovasculares o de otros tejidos blandos

3.3.1. Implicaciones Clínicas de las Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral

La principal consecuencia de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en la ERC es el desarrollo de daños de severidad variable en los tejidos diana, siendo el esqueleto y el sistema cardiovascular los tejidos principalmente afectados¹⁰³.

La hiperfosfatemia se ha asociado con un aumento del grosor íntima-media, rigidez y calcificación vascular, hipertrofia miocárdica y mortalidad, así como con la progresión de la ERC²²⁸; mientras que la PTH se ha considerado clásicamente como una toxina urémica, asociándose a distintos efectos sistémicos^{33,103}. En la última década, el déficit de vitamina D, también frecuente en la población general, ha adquirido especial importancia al relacionarse con alteraciones en la inmunorregulación, la respuesta inflamatoria, la regulación de la proliferación celular, la secreción de insulina y la producción de renina^{67,68}. Como consecuencia de estos efectos, las alteraciones del metabolismo óseo-mineral han demostrado ser predictoras independientes de mortalidad en la población urémica, especialmente de causa cardiovascular^{67,229}.

Block et al⁶⁷, en un estudio en el que se incluyeron 40.538 pacientes con ERC en HD, observaron que concentraciones séricas de fosfato y PTH superiores a 1,6 mmol/L y 600 pg/mL, respectivamente, se asociaban a un incremento en la mortalidad cardiovascular y en la incidencia de fracturas óseas. Además, observaron que en estos pacientes el RCV relativo atribuible a las alteraciones del metabolismo óseo-mineral era superior al de la anemia o al de la infradiálisis. Estudios posteriores de tipo retrospectivo corroboraron estos resultados, observando además una asociación entre la hipocalcemia, el descenso en la concentración sérica de calcitriol y el incremento del producto calcio-fosfato, con la morbi-mortalidad cardiovascular^{67,230}.

3.3.2. Prevalencia de las Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral en la Enfermedad Renal Crónica

Las alteraciones del metabolismo óseo-mineral presentan una elevada prevalencia en pacientes con ERC, especialmente a partir del estadio G3 de la enfermedad. Diversos estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos muestran una prevalencia creciente del hiperparatiroidismo secundario en relación al estadio de la ERC: 23% para el estadio G3, 44% para el G4 y 72,5% para el estadio G5. De forma similar, la prevalencia de la hiperfosfatemia y del déficit de vitamina D es

significativamente mayor en el estadio G5 de la ERC que en estadios previos de la enfermedad: 9,2 y 9,1% para el estadio G3; 9,3 y 10,7% para el estadio G4; y 23,0 y 27,2% para el estadio G5²³¹.

La reciente publicación de los resultados del estudio OSERCE²³², un estudio observacional transversal en el que se incluyeron 634 pacientes con ERC en estadios G3 a G5 no sometidos a diálisis, ha permitido obtener una panorámica de la situación actual de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en la ERC en nuestro país. Los datos de este estudio muestran que, a medida que la función renal disminuye, los pacientes presentan concentraciones significativamente menores de calcio, vitamina D, hemoglobina, albúmina y bicarbonato; mientras que la concentración de fosfato, el grado de hiperparatiroidismo, HTA y proteinuria eran significativamente mayores. La prevalencia de hipocalcemia, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo, déficit de 25-OH-colecalciferol (calcidiol), definida como una concentración inferior a 30 ng/mL, e insuficiencia de 1,25-(OH)₂-colecalciferol (calcitriol), definida como una concentración inferior a 22 pg/mL) fue, respectivamente, del 45, 22, 70, 81,5 y 64,7%. Así mismo se observó que los niveles disminuidos de calcidiol eran constantes, independientemente del estadio de ERC, mientras que el déficit de calcitriol aumentaba conforme disminuía el FG.

3.3.3. Fisiopatología de las Alteraciones Óseo-Minerales

Las alteraciones de las magnitudes bioquímicas que regulan la homeostasis del metabolismo óseo-mineral ocurren progresivamente y en paralelo al deterioro del FG^{103,111}.

3.3.3.1. Eje Calcio-Fosfato-Hormona Paratiroidea

La progresión de la ERC se asocia con un aumento precoz del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) y con una reducción de la masa renal funcional²³³. Ambos factores favorecen la disminución del enzima 1- α -hidroxilasa, encargada de la síntesis de calcitriol, forma biológicamente activa de la vitamina D. El déficit de calcitriol afecta significativamente a la absorción intestinal de calcio, provocando un descenso en su concentración sérica y estimulando la síntesis de PTH. La disminución de la síntesis de calcitriol ocurre precozmente, siendo ya detectable en el estadio G3 de la ERC.

La disminución de la función renal también afecta directamente a la excreción de fosfato: el riñón no es capaz de filtrar suficiente fosfato, por lo que se produce un incremento de su concentración sérica. En condiciones fisiológicas, la hiperfosfatemia estimula la producción de PTH por la glándula paratiroides, así como la síntesis y secreción de FGF-23 por parte de los osteocitos^{111,233}. El FGF-23, por su parte, ejerce sus efectos tanto en el tejido renal, inhibiendo la reabsorción de fosfato; como en la glándula paratiroides, disminuyendo la síntesis y secreción de PTH²³³. Sin embargo, en pacientes con ERC, la persistente elevación de la concentración de PTH aún en presencia de concentraciones elevadas de FGF-23, sugiere una resistencia de las glándulas paratiroides a la acción inhibitoria de este último^{103,233}.

3.3.3.2. Hiperparatiroidismo Secundario

La glándula paratiroidea es el principal órgano responsable de la homeostasis del calcio en el organismo. Este proceso lo realiza gracias a la presencia de al menos dos receptores conocidos, a través de los cuales se canalizan los efectos de las moléculas y hormonas que modulan tanto la síntesis y secreción de PTH, como el tamaño glandular: el receptor-sensor de calcio (CaR) y el receptor de vitamina D (VDR)^{103,111}.

- ❖ El **CaR**, situado en la superficie de las células paratiroides, detecta cambios mínimos en la concentración sérica de calcio iónico. Cuando la concentración desciende, se estimula la secreción de PTH; mientras que concentraciones elevadas inhiben la liberación de la hormona. El resultado es una respuesta de la glándula paratiroidea de tipo sigmoidal, en la que pequeños cambios en la concentración sérica de calcio provocan grandes variaciones en la concentración de PTH, consiguiéndose su máxima inhibición en la hipercalcemia.
- ❖ El calcitriol actúa sobre la glándula paratiroides a través del **VDR**, un receptor de alta afinidad y especificidad. La unión del calcitriol a su receptor provoca la inhibición de la síntesis de PTH. Además, el calcitriol es capaz de inhibir indirectamente la secreción de PTH, aumentando la absorción intestinal de calcio y, a su vez, estimulando la resorción de los depósitos óseos de calcio.

En la ERC, el control anómalo de la secreción de PTH se ha atribuido a la disminución de la expresión de VDR y CaR, lo que ocurre de forma paralela al crecimiento de la glándula paratiroides. La hiperplasia paratiroidea y el consiguiente

incremento en la secreción de PTH, son los responsables del hiperparatiroidismo secundario observado en la ERC. En las formas leves y moderadas de hiperparatiroidismo, la glándula paratiroides sigue siendo capaz de responder a sus principales reguladores²³⁴. En cambio, en estadios más avanzados, especialmente en el hiperparatiroidismo terciario, una forma de hiperparatiroidismo irreversible y frecuente en pacientes en diálisis, la glándula paratiroides presenta una escasa o nula respuesta a los estímulos, mostrando un elevado grado de autonomía²³⁵. El hiperparatiroidismo secundario tiende a mantener la calcemia al estimular la reabsorción subperióstica, la producción renal de calcitriol y la reabsorción tubular de calcio. Aunque este mecanismo de compensación puede llegar a normalizar la calcemia, lo hace a expensas de inducir alteraciones del recambio óseo^{234,235}.

3.3.4. Criterios Diagnósticos

La detección de perturbaciones en la concentración sérica de calcio, fosfato y PTH es esencial para el diagnóstico de la alteración óseo-mineral en los pacientes con ERC. Estas alteraciones suelen presentarse a partir del estadio G3 de la ERC y, por tanto, se recomienda iniciar la monitorización de su concentración de a partir de dicho estadio. Sin embargo, la severidad y velocidad de progresión de las alteraciones bioquímicas del metabolismo mineral es muy variable, por lo que la frecuencia de medición debe estar guiada por la presencia, duración y magnitud de las alteraciones encontradas, así como por el grado y progresión de la ERC y el uso de fármacos para corregir las anomalías^{103,111}. En la **Tabla 10** se exponen las concentraciones de estos parámetros recomendados en la guía SEN¹⁰³ para el manejo de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en los pacientes con ERC.

Parámetro	Estadio ERC	Concentración recomendada
Calcidiol	Todos	>30 ng/mL
Calcio	Todos	2,1-2,4 mmol/L (tolerancia hasta 2,5 mmol/L)
Fosfato	Todos	0,8-1,5 mmol/L (tolerancia hasta 1,6 mg/dL en diálisis)
PTHi	Estadio G3	35-70 pg/mL
	Estadios G4 y G5	70-110 pg/mL
	Estadio G5	150-300 pg/mL

Tabla 10. Valores recomendados en la guía de la Sociedad Española de Nefrología para el manejo de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en los pacientes con enfermedad renal crónica¹⁰³. ERC, enfermedad renal crónica; PTHi, hormona paratiroidea intacta.

3.3.5. Principales Marcadores Bioquímicos de las Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral

3.3.5.1. Calcio

El calcio es el catión más abundante del cuerpo humano ya que se encuentra formando la parte mineral del tejido óseo, fundamentalmente como hidroxapatita. El compartimento extracelular contiene únicamente el 1% del calcio corporal total, y éste se encuentra en plasma en tres fracciones distintas: unido a proteínas, fundamentalmente a la albúmina (45%); formando complejos con otros iones inorgánicos como fosfato, lactato, bicarbonato o citrato (5%); y en forma libre o calcio iónico (50%), que es la fracción fisiológicamente activa¹⁶⁵.

Las principales guías clínicas señalan a la concentración de calcio iónico como el marcador ideal para el diagnóstico y seguimiento de alteraciones óseo-minerales en la ERC^{103,227,236}. Sin embargo, las dificultades en la obtención y manejo de la muestra (gasometría arterial o venosa) hacen que el marcador bioquímico de elección en la práctica clínica habitual sea la concentración sérica de calcio total.

En condiciones fisiológicas, el calcio total está sometido a unos estrictos mecanismos de regulación homeostática que hacen que su concentración sérica se encuentre dentro de un rango muy estrecho, con algunas, aunque mínimas, variaciones diurnas^{165,236}. En presencia de hipoalbuminemia, sin embargo, se produce una disminución de la fracción unida a proteínas y, en consecuencia, de la concentración de calcio total; observándose una hipocalcemia aparente que subestimaría la disponibilidad de calcio biológicamente activo. En estas situaciones, se recomienda corregir la concentración de calcio total empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Calcio Total corregido} = \text{Calcio Total (mmol/L)} + 0,2 \times [4 - \text{Albúmina (g/dL)}]$$

Además de por la concentración sérica de albúmina, la medida tanto del calcio total como del calcio iónico, pueden verse afectadas por factores tales como las alteraciones del metabolismo ácido-base o los fenómenos de hemoconcentración, todos ellos presentes en el paciente con ERC o ERCT. Por otra parte, la concentración extracelular de calcio no siempre se correlaciona con el balance de calcio, especialmente en pacientes con ERC, ya que el incremento de la concentración de PTH hace que su concentración sea frecuentemente normal, pudiendo haber un

balance tanto positivo como negativo. Todos estos factores hacen que la concentración sérica de calcio tenga poca capacidad predictiva de la enfermedad ósea subyacente^{103,227,236}.

3.3.5.2. Fosfato

El fosfato es el anión más importante intra y extracelular. Aproximadamente el 85% del fosfato del organismo se encuentra formando parte del tejido óseo junto con el calcio, por lo que los cambios en la concentración de fosfato acompañan a los de calcio en su depósito o resorción ósea. El 15% de fosfato restante se distribuye, más o menos equitativamente, entre los espacios intra y extracelular¹⁶⁵. Factores tales como el pH o la concentración de glucosa sérica, pueden causar un desequilibrio entre estos dos compartimentos, produciendo una alteración en la concentración sérica de fosfato sin que haya variaciones reales en la cantidad de fosfato corporal total²³⁶.

Únicamente un 20% del fosfato extracelular se encuentra unido a proteínas, mientras que el resto se encuentra en forma libre, como fosfato inorgánico, pudiendo ser filtrado en el glomérulo renal¹⁶⁵. Al contrario de lo que ocurre con el calcio, la diferenciación entre el fosfato libre y el unido a proteínas plasmáticas carece de relevancia fisiológica.

La concentración sérica de fosfato presenta una sensibilidad y especificidad limitadas para el diagnóstico de alteraciones del metabolismo óseo mineral en la ERC, al verse afectada por factores tales como variaciones en el pH y la glucemia, fenómenos de hemoconcentración o el incremento en la concentración de PTH^{103,227,236}.

3.3.5.3. Hormona Paratiroidea

La PTH circulante en plasma no se presenta como una única molécula, sino como diversos péptidos paratiroideos, cada uno de ellos con diferente función e incluso con diferentes receptores. Los fragmentos descubiertos hasta la actualidad son²³⁷:

- ❖ **PTH intacta (PTHi):** está constituida por un péptido de 84 aminoácidos, el cual se obtiene por proteólisis consecutiva de dos péptidos más largos, de 115 y 90 aminoácidos, respectivamente.

- ❖ **Fragmentos carboxi-terminales (PTHc):** son todos aquellos fragmentos que conservan la porción C-terminal y les falta una serie de aminoácidos en la porción N-terminal. Se diferencian dos subgrupos:
 - No 1-84: son los fragmentos más largos, que han perdido una serie de aminoácidos en cualquier lugar del segmento comprendido entre la posición 1 a 34.
 - C-terminales: son aquellos a los que el fragmento que les falta incluye más que los 34 aminoterminales.

- ❖ **Amino PTH (PTHa):** este fragmento, de reciente descubrimiento, tiene una secuencia de aminoácidos similar a la PTHi, pero presenta una fosforilización en el aminoácido 17.

De todos ellos, la PTHi es la responsable de las funciones clásicas sobre hueso y riñón, mediante la regulación de la homeostasis del metabolismo fosfo-cálcico y de la síntesis de calcitriol. La regulación y el metabolismo de los diferentes fragmentos condiciona su concentración plasmática. Así, en individuos sanos, la concentración de PTHc circulante es muy superior (80%) a la de PTHi (20%), debido, probablemente, a la menor vida media de ésta última (5-8 minutos). La PTHc se elimina por vía renal, por lo que en la ERC, al disminuir su excreción renal, tiende a acumularse a medida que disminuye el FG, llegando a alcanzar su concentración plasmática hasta un 95% del total de PTH circulante²³⁸.

La concentración sérica de PTHi es la magnitud bioquímica que mejor se correlaciona con las lesiones histológicas del hiperparatiroidismo secundario, especialmente con la actividad osteoblástica. Por lo tanto, es considerado el mejor marcador disponible actualmente para el diagnóstico de enfermedad ósea subyacente, con una sensibilidad y especificidad muy superior a la del calcio o el fosfato^{103,227,236}. Concentraciones de PTHi superiores a 450-500 pg/mL se consideran indicativas de hiperparatiroidismo secundario, y excluyen prácticamente la enfermedad ósea adinámica o de bajo remodelado con una elevada especificidad. Por contra, concentraciones de PTHi inferiores a 100-120 pg/mL, se asocian con enfermedad ósea adinámica con un valor predictivo positivo (VPP) cercano al 90%¹⁰³. Es necesario tener en cuenta, sin embargo, que la falta de estandarización derivada del empleo de los distintos métodos de medida disponibles para la PTHi, pueden dificultar la correcta interpretación de los resultados bioquímicos, especialmente de aquellos interlaboratorios.

3.3.5.4. Vitamina D

El término vitamina D (calciferol) engloba a dos tipos de secosteroides liposolubles que comparten una estructura general derivada del cilopentanoperhidrofenanteno: el ergocalciferol o vitamina D₂, y el colecalciferol o vitamina D₃¹⁶⁴. El ergocalciferol es sintetizado en las plantas a partir del ergosterol y, junto con el colecalciferol presente en el aceite de pescado, es la principal fuente dietética de vitamina D para el ser humano. Sin embargo, el 90% de los requerimientos de vitamina D provienen de la síntesis cutánea de colecalciferol a partir del 7-dehidrocolesterol, un precursor del colesterol, en una reacción catalizada por la radiación ultravioleta¹⁶⁵.

Una vez absorbida o sintetizada, la vitamina D es transportada al hígado por una proteína transportadora específica, donde, mediante una reacción de hidroxilación mitocondrial, se forma el 25-OH-vitamina D o calcidiol. El calcidiol, metabolito circulante más abundante de la vitamina D, es transportado a los distintos tejidos diana unido, principalmente, a la proteína transportadora específica de vitamina D (88%) y, en menor medida, a la albúmina²⁰⁹. El calcidiol es hidroxilado en el riñón por la acción del enzima 1- α -hidroxilasa a 1,25-OH-vitamina D, forma biológicamente activa de la vitamina D²³⁶.

La vitamina D participa activamente en la homeostasis mineral y en la función músculo esquelética. En los últimos años se ha descubierto que la vitamina D desempeña además un papel fundamental en aspectos tales como la regulación de la función endotelial e inmunológica o la regulación del ciclo celular, entre otros efectos pleiotrópicos^{209,236}.

Capítulo 4. Variación Biológica: Implicaciones en la Práctica Clínica.

Las magnitudes bioquímicas de interés clínico están sujetas a variaciones a lo largo del tiempo, las cuales pueden ser consecuencia de factores muy diversos, tanto fisiológicos como fisiopatológicos. El conocimiento de esta variabilidad biológica es esencial para la correcta gestión de todas las fases del proceso analítico: preanalítica (elección del espécimen adecuado), analítica (requerimientos de los métodos de medida) y post-analítica (interpretación de resultados).

1. Naturaleza de la Variabilidad Biológica

En función de su naturaleza, la variabilidad biológica puede ser clasificada en cuatro categorías: variabilidad fisiológica, consecuencia de variaciones metabólicas y otros estados o procesos fisiológicos; variabilidad patológica, causada por episodios de enfermedad; variabilidad iatrogénica, secundaria a la ingesta de fármacos o a intervenciones terapéuticas; y variación biológica aleatoria (VB)²³⁹.

1.1. Variabilidad Fisiológica

Los principales factores relacionados con la variabilidad fisiológica pueden clasificarse en **no modificables o inherentes al individuo**, como la edad, el sexo, la raza o la presencia de ritmos biológicos cíclicos; y **modificables**, entre los que destacan la dieta y la realización de ejercicio físico.

1.1.1. Factores No Modificables

La **edad** es uno de los principales factores responsables de la variabilidad fisiológica, afectando a la concentración de multitud de magnitudes bioquímicas como, por ejemplo, el CT, la urea o la fosfatasa alcalina (**Figura 13**). Las variaciones relacionadas con la edad se producen habitualmente en momentos críticos del ciclo vital, como en los periodos neonatal, infancia, pubertad, menopausia y vejez²⁴⁰; siendo la principal repercusión de esta variación la necesidad de estratificación de los valores de referencia (VR) poblacionales en función de la edad²⁴¹.

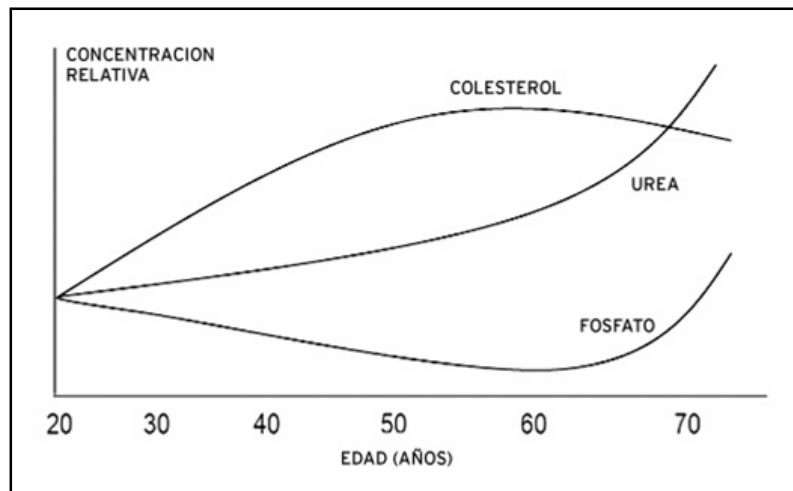


Figura 13. Variaciones observadas en la concentración de colesterol, urea y fosfato en función de la edad.

Por otra parte, la concentración sérica de determinadas magnitudes bioquímicas, especialmente hormonas y proteínas, varía siguiendo **ritmos cíclicos predecibles**, los cuales pueden ser de naturaleza circadiana, diaria, mensual o estacional²⁴⁰.

El conocimiento de estos ritmos cíclicos es imprescindible tanto para una adecuada gestión de la fase preanalítica, como para una correcta interpretación de los resultados^{240,242}. Idealmente, todas las muestras deberían ser extraídas a primera hora de la mañana, minimizando de esta forma la influencia de los ciclos diarios. La recogida de las muestras para el estudio de aquellas magnitudes bioquímicas sometidas a ritmos circadianos o mensuales, como el cortisol o la progesterona, deberá realizarse en intervalos de tiempo específicos y clínicamente relevantes. En cuanto a la interpretación de los resultados, es necesario tener en cuenta que la ausencia de un ritmo esperado es indicativo de la presencia de una patología subyacente. Un claro ejemplo es el patrón de secreción de cortisol en la enfermedad de Cushing, el cual se caracteriza por una alteración en su ritmo nictemeral normal²⁴³.

1.1.2. Factores Modificables

El efecto de la **dieta** sobre la concentración de las principales magnitudes bioquímicas depende, en gran medida, del tipo de dieta y del tiempo transcurrido desde la ingesta hasta la extracción del espécimen. Así, por ejemplo, tras una comida rica en grasas, la concentración sérica de TG puede alcanzar un valor hasta diez veces superior a su concentración basal; mientras que la concentración sérica de glucosa aumenta rápidamente tras la ingesta de alimentos, regresando a los valores

basales, en condiciones normales, al cabo de 2-3h¹⁶⁵. Si bien los efectos de la dieta no son extensibles a todas las magnitudes bioquímicas, de forma general se recomienda un mínimo de 8h de ayuno previo a la extracción del espécimen sanguíneo.

Las variaciones asociadas al **ejercicio físico** dependen, entre otros, de la intensidad y duración del ejercicio realizado, del entrenamiento previo, de la masa muscular del sujeto y de las condiciones ambientales. La mayoría de las alteraciones asociadas al ejercicio son de tipo agudo y se relacionan con el intercambio de volumen entre el espacio intravascular y el compartimento intersticial, la hemoconcentración por sudoración intensa, el daño muscular localizado y la concentración circulante de las hormonas de estrés (catecolaminas, cortisol y hormona de crecimiento)¹⁶⁵. El ejercicio moderado aumenta la concentración de glucosa, aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina y, especialmente, del enzima creatina quinasa (CK), la cual alcanza su concentración sérica máxima en las primeras 48h tras un esfuerzo intenso, y de tres a siete días tras un ejercicio físico excéntrico²⁴⁴. Así mismo, se ha observado que el ejercicio físico prolongado disminuye la concentración sérica de hierro y de la ST. La justificación más aceptada para esta ferropenia es la hemólisis intravascular que se produce a consecuencia de microtraumatismos durante el ejercicio, especialmente durante el ejercicio aeróbico en superficies duras²⁴⁴.

1.2. Variabilidad Patológica

El conocimiento de las alteraciones que las diversas patologías pueden provocar en la concentración de las magnitudes bioquímicas es una de las bases actuales de la prevención, el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento de enfermedades^{239,240}, contribuyendo al diagnóstico diferencial, orientando sobre la existencia de una lesión en un determinado órgano o sistema, descartando algún proceso patológico en particular, confirmando los hallazgos efectuados mediante otros métodos diagnósticos, etc. Un ejemplo es la utilidad de los marcadores tumorales, como el antígeno carcinoembrionario (CEA) o el antígeno prostático específico (PSA), en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de neoplasias.

1.3. Variabilidad Iatrogénica

Las variaciones iatrogénicas están causadas, en el sentido más estricto de la definición, por el consumo de fármacos o por actos terapéuticos o diagnósticos. Sin

embargo, en esta clasificación se suele incluir otros xenobióticos de uso generalizado en nuestra sociedad, como la cafeína, la nicotina o el etanol.

Las alteraciones de origen iatrogénico se producen por varios mecanismos entre los que se encuentran la inducción enzimática, la inhibición metabólica, y la competencia por la unión a proteínas transportadoras, entre otros. La magnitud de estas variaciones dependerá de la cantidad de xenobiótico ingerido, del tiempo desde la ingesta y de la idiosincrasia del paciente²⁴⁵. Como ejemplo, los anticonceptivos orales aumentan la concentración plasmática de globulina fijadora de hormonas tiroideas y, en consecuencia, la concentración de tiroxina total, pero no de la fracción libre¹⁶⁵.

1.4. Variación Biológica Aleatoria

Aunque la variabilidad biológica puede ser de origen fisiológico, patológico o iatrogénico, la variación observada para la mayoría de magnitudes bioquímicas en individuos sanos no se ajusta a ninguno de estos modelos; considerándose una variación de tipo aleatorio. Esta VB puede definirse, de una forma muy simplificada, como una fluctuación aleatoria inherente a la concentración sérica de un analito, debida a un equilibrio entre el recambio metabólico y la regulación homeostática^{246,247,248}.

Cuando se mide la concentración de una determinada magnitud bioquímica en varias muestras de un mismo individuo recogidas a lo largo del tiempo, se observará que los resultados obtenidos no son constantes. Una vez descartadas o controladas otras fuentes de variabilidad, la variación total observada puede deberse a tres factores acumulativos^{246,247}:

- ❖ Variación Preanalítica, relacionada con el proceso de extracción, transporte y preparación de las muestras.
- ❖ Variación Analítica (V_A), relacionada con la precisión y exactitud de los métodos de medida.
- ❖ Variación Biológica Inherente, debida a una fluctuación aleatoria alrededor de un punto de ajuste homeostático, denominada **Variación Biológica Intraindividual (VB_i)**.

Si esa misma magnitud bioquímica se analiza en varios sujetos, se observara una variabilidad debida a las diferencias entre los puntos de ajuste homeostático de los individuos, denominada **Variación Biológica Interindividual (VB_G)**.

Por lo tanto, minimizando y controlando la variación preanalítica y diseñando estudios que nos permitan cuantificar la variación analítica, podremos estimar tanto la VB_I como la VB_G, conocidas en su conjunto como datos o componentes de la VB^{246,247} (**Figura 14**). Estos componentes generalmente se expresan como porcentajes relativos a la media: **coeficiente de variación intra (CV_I) e interindividual (CV_G)**.

En los últimos 40 años, el desarrollo y la aplicación de la teoría de la VB ha puesto de manifiesto la gran relevancia que reviste su conocimiento, tanto para el propio laboratorio como en la práctica clínica, reconociéndose como una herramienta de gran utilidad para el establecimiento de las especificaciones de calidad analítica, la correcta interpretación de los resultados bioquímicos y la adecuada monitorización del paciente, entre otros^{246,247,248}.

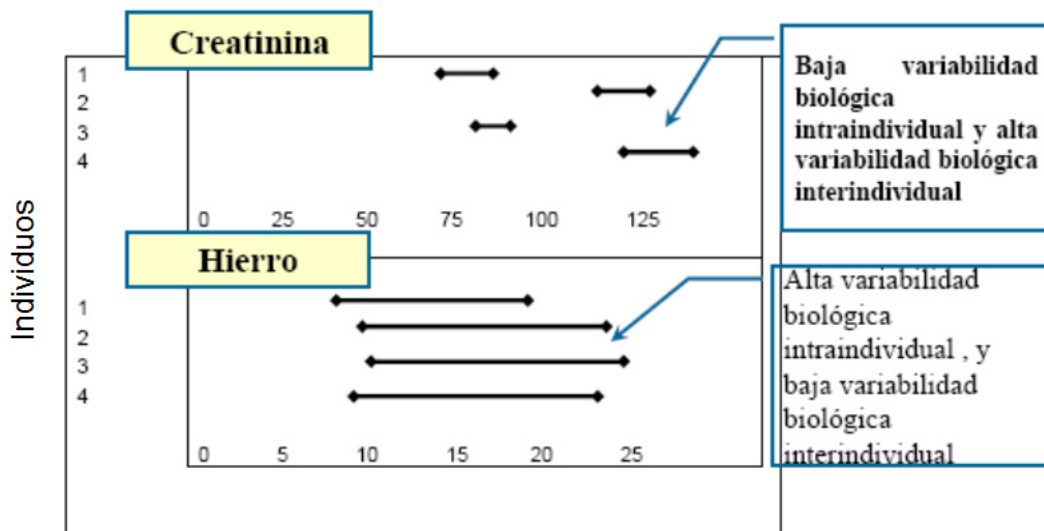


Figura 14. Representación gráfica de los componentes de variación biológica descritos para la creatinina y el hierro sérico. Los datos, obtenidos tras el análisis de 5 muestras extraídas a 4 individuos aparentemente sanos, se representan como mediana y rango de concentración.

2. Estimación de los Datos de Variación Biológica

Los componentes de VB se pueden estimar experimentalmente mediante la selección de una cohorte de sujetos *a priori* libres de enfermedad, de los cuales se obtendrá un determinado número de muestras a intervalos de tiempo específicos. En cuanto al número de sujetos y muestras, se recomienda buscar un compromiso entre el número ideal, en términos estadísticos, y el viable en función de la técnica empleada^{246,249}.

El estudio de los componentes de VB puede ser abordado a través de diversos protocolos experimentales, si bien, todos ellos parten de una premisa común: minimizar en lo posible todas aquellas variables preanalíticas que puedan afectar a la determinación de la magnitud bioquímica a estudio^{246,247,248}. Además, el diseño de un protocolo para la estimación de los datos de VB debe tener en cuenta la precisión analítica del método de medida, procurando obtener la mayor fiabilidad posible²⁵⁰.

En el diseño experimental más aceptado, propuesto originalmente por Cotlove et al²⁵¹, un reducido grupo de sujetos *a priori* sanos es seleccionado para la obtención de varias muestras en un intervalo de tiempo predeterminado. Las muestras así obtenidas son congeladas hasta el momento del análisis, analizándose por duplicado aleatorizado en una única serie analítica. Las ventajas de este método son la eliminación de la V_A interserie y la posibilidad de estimar la V_A intraserie en la propia matriz de los sujetos a estudio. Sin embargo, el gran esfuerzo analítico necesario para la aplicación de este protocolo limita considerablemente el número de sujetos y muestras que pueden ser evaluados.

Otros autores, como Shepard et al²⁵² y Costongs et al²⁵³, propusieron un método alternativo caracterizado por requerir un menor esfuerzo analítico. En este método, las muestras, previamente recogidas con idénticas premisas que en el método anterior, son analizadas una sola vez en una única serie analítica. La V_A interserie es eliminada y la V_A intraserie se calcula a partir del análisis por duplicado de controles de calidad o de un pool de muestras. El principal inconveniente de la utilización de este diseño es que las diferencias de matriz y concentración del analito entre las muestras y los controles o el pool, puede influir sustancialmente en la estimación de la V_A intraserie.

Moses et al²⁵⁴ propusieron un tercer diseño experimental en el cual las muestras son analizadas, bien por duplicado o por un análisis simple, el mismo día de la extracción. Este diseño es de especial utilidad cuando la magnitud bioquímica a estudio es

inestable, aunque su principal desventaja es que la estimación de la VB_I puede ser confundida con la V_A interserie, siendo necesaria la estimación de esta última mediante el análisis de controles de calidad.

A pesar de las diferentes metodologías descritas, las estimaciones de los componentes de VB se consideran, en general, constantes e independientes de la estrategia utilizada para su obtención^{246,248,250}. Este hecho, unido a la dificultad que entraña su adecuada estimación, hace que el empleo de datos de VB recogidos en las bases de datos internacionales^{255,256}, sea una práctica plenamente aceptada.

3. Bases de Datos Internacionales de Variación Biológica

Con el objeto de proporcionar una base de datos de fácil consulta, a lo largo de más de una década tras la publicación de la teoría de la VB, varios autores realizaron sendas recopilaciones de los artículos publicados al respecto^{257,258,259}. Sin embargo, los resultados de estos primeros esfuerzos resultaron dispares, proporcionando simplemente un listado de los datos publicados. En 1997, la Comisión de Calidad Analítica de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica, se propuso realizar una recopilación sistemática de todos los artículos publicados hasta la fecha sobre VB, con el fin de elaborar una amplia base de datos internacional²⁵⁵. Los resultados de cada uno de los artículos encontrados, 169 en esta primera edición, fueron evaluados en función de su robustez, estableciéndose cinco criterios esenciales de inclusión:

- ❖ Los artículos debían haber sido expresamente diseñados para la estimación de los componentes de VB, eliminándose así todos aquellos artículos en los que no se aplicaba un criterio de estandarización claro en la obtención de las muestras.
- ❖ El índice de fiabilidad, descrito como el cociente entre coeficiente de variación analítica (CV_A) y la mitad del CV_I , debía ser inferior a 2,0.
- ❖ El tratamiento estadístico de los datos empleado para la estimación de los componentes de VB debía estar claramente descrito, considerándose los modelos más robustos la aplicación de un análisis de la varianza (ANOVA) y las fórmulas manuales descritas por Fraser y Harris²⁴⁶.
- ❖ Los datos de VB debían derivar de sujetos aparentemente sanos.
- ❖ Los artículos estudiados debían documentar tanto el CV_I como el CV_G .

A continuación, para cada una de las magnitudes bioquímicas seleccionadas, se estudió la presencia de posibles asociaciones entre los CV_I y las características de los sujetos (edad, sexo, ayuno..), no encontrándose justificación para la estratificación de los resultados en ningún parámetro. En los casos en los que se disponía de varios estudios de VB para una misma magnitud, el valor de CV_I y CV_G incorporado a la base de datos fue la mediana de todos los artículos recopilados. Así mismo, a partir de estos datos de VB se calcularon las especificaciones de calidad analíticas^{255,260}. El concepto y procedimiento de cálculo para las especificaciones de calidad, así como sus implicaciones en el laboratorio clínico, se discutirán en profundidad en el apartado **4.1. Especificaciones de Calidad** de esta tesis doctoral.

Desde su publicación en 1999, la base de datos ha sido actualizada cada dos años, con el fin de incluir los datos procedentes de nuevos artículos y de revisar los datos de VB para las magnitudes ya incluidas, si fuera necesario a tenor de los nuevos datos recopilados. Actualmente se encuentra en su octava edición e incluye los datos de VB y las especificaciones de calidad derivadas para 358 magnitudes bioquímicas, los cuales han sido recopilados de 247 artículos especializados (**Figura 15**)²⁵⁶.

Sistema	Magnitud	Variación Biológica		Especificaciones Deseables		
		CV _I	CV _G	CV (%)	ES (%)	ET (%)
Sm-	Fenilacetato	6,60	25,20	3,30	6,51	11,96
Pla-	Fenilalanina	9,50	40,60	4,75	10,42	18,26
Sm-	Ferritina	14,20	15,00	7,10	5,16	16,88
Pla-	Fibrinógeno	10,70	15,80	5,35	4,77	13,60
Sm-	Folato	24,00	73,00	12,00	19,21	39,01
Sm-	Folitropina (FSH)	11,00	47,20	5,50	12,12	21,19

Figura 15. Ejemplo parcial del formato de la base de datos internacional de variación biológica, actualización 2014. Adaptado de Ricós et al²⁵⁶. Srm; suero; Pla, plasma; CV_I, coeficiente de variación intraindividual; CV_G, coeficiente de variación interindividual; CV, imprecisión; ES, error sistemático (sesgo); ET, error total.

En los últimos años se han puesto de manifiesto una serie de importantes limitaciones en la actual base de datos de VB, como, por ejemplo, el hecho de que para 202 magnitudes de las 358 incluidas, los datos de VB proceden de un único estudio, por lo que éstos datos podrían ser considerados como provisionales^{248,261}. Sin

embargo, es la marcada heterogeneidad de los métodos empleados para la estimación de los datos de VB entre los distintos estudios, la que se considera, actualmente, la mayor limitación de la base de datos. A consecuencia de esta heterogeneidad, en varias magnitudes para las que se dispone de un número limitado de publicaciones, se observa una importante discrepancia entre los datos de VB proporcionados por los distintos autores. Es el caso, por ejemplo, de la estimación del CV_I para la hormona luteinizante (LH) en varones, cuyo valor varía entre el 12 y el 30% entre las distintas publicaciones²⁴⁸. En un reciente estudio, Carobene et al²⁶², comprobó que los CV_I publicados para alanina aminotransferasa (ALT), AST y gamma-glutamilttransferasa (GGT) variaban dentro de un rango muy amplio (ALT: 11,1-58,1%; AST: 3,0-32,3%; 3,9-14,5%) debido, fundamentalmente, a la aplicación de protocolos inapropiados para la obtención de las muestras y el tratamiento estadístico de los datos.

Estos hallazgos plantean nuevas dudas en torno a la utilidad real de los datos de VB disponibles en la actualidad y destacan la necesidad de establecer nuevos criterios para la valoración crítica de las publicaciones sobre VB y su inclusión en las bases de datos. En consecuencia, son varios los autores que abogan por el desarrollo de un estándar internacional para la realización y presentación de los estudios sobre VB^{261,262,263,264}. Esta iniciativa ya ha sido puesta en marcha por el Grupo de Trabajo sobre VB de la *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (ELFM), el cual ha desarrollado una guía en la que identifica una serie de puntos clave que, a su parecer, deberían ser incluidos en cada una de los estudios de VB con el fin de que los datos obtenidos sean fácilmente transferibles²⁶⁵. Así mismo, Simundic et al²⁶⁶, han publicado recientemente una propuesta de estandarización para los términos y abreviaturas que definen los componentes de la VB, coincidiendo sus recomendaciones con las adoptadas originalmente por Fraser CG²⁴⁶, y que son las utilizadas en el presente documento (CV_I , CV_G y CV_A). Estos autores recomiendan también que todo artículo sobre VB incluya una descripción del método de cálculo de la V_A , así como del número de muestras y periodo de tiempo entre extracciones, tiempo transcurrido desde la extracción hasta el análisis de las muestras y número de series analíticas. En una reciente revisión, Røraas et al²⁵⁰, coinciden en señalar que el diseño experimental adoptado para la estimación de los componentes de VB debería tener en cuenta la V_A del método de medida, procurando obtener la mayor fiabilidad posible. Así mismo, señalan que los datos de VB deberían ser publicados siempre junto con sus IC95% para facilitar la comparación y transferibilidad de los mismos, así como para permitir la evaluación de la consistencia de los datos proporcionados.

4. Aplicaciones de los Datos de Variación Biológica

Los datos de VB han sido utilizados con diversos propósitos, entre los que destacan el establecimiento de especificaciones de calidad analítica, la evaluación de la utilidad de los VR poblacionales y la interpretación del significado clínico de cambios en series de resultados de pacientes.

4.1. Especificaciones de Calidad

4.1.1. Definición y Conceptos

La gestión de la calidad en un laboratorio clínico requiere la definición de unos objetivos en cuanto a las prestaciones analíticas ofertadas, teniendo en cuenta factores económicos, legislativos y, fundamentalmente, el nivel de calidad necesario para asegurar una satisfactoria decisión clínica (**Figura 16**)^{267,268}.



Figura 16. El papel central de las especificaciones de la calidad en la gestión de la calidad. Adaptado de Fraser C.G²⁴⁷.

El término más empleado para describir el nivel de prestación requerido para facilitar una adecuada decisión clínica es el de **Especificaciones de Calidad**^{267,268}. Las características de prestación de los métodos de medida disponibles en un laboratorio clínico, se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- ❖ Características de Practicabilidad: hacen referencia a los detalles de ejecución del método de medida como, por ejemplo, el volumen de muestra necesario, el límite de detección y el intervalo de medida.
- ❖ Características de Fiabilidad: definidas por la imprecisión, el error sistemático (ES), el error total (ET).

Por lo tanto, para implementar un adecuado sistema de gestión de la calidad, las especificaciones de calidad deberían ser definidas para cada una de las características de fiabilidad del método analítico.

Las primeras recomendaciones para el establecimiento de las especificaciones de calidad analíticas fueron publicadas por Tonks D²⁶⁹ en 1963, Barnett RN²⁷⁰ en 1968 y Cotlove et al²⁵¹ en 1970. Cada uno de estos autores introdujo tres conceptos distintos para definir estándares de calidad: la distribución de los resultados procedentes de una población sana, la variación clínicamente relevante en los resultados de cada analito y la distribución de resultados de una magnitud bioquímica en función de la naturaleza de su VB; respectivamente. Estas tres visiones iniciales han dado lugar al desarrollo de una gran variedad de estrategias para la obtención de las especificaciones de calidad en un laboratorio clínico.

Con el fin de aunar criterios, en 1999 se organizó una conferencia internacional en Estocolmo, patrocinada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) y la OMS, cuya declaración de consenso clasificó las estrategias para la estimación de las especificaciones de calidad según un modelo jerárquico establecido en función de las ventajas y desventajas observadas en cada uno de ellas (**Tabla 11**)²⁷¹. Esta jerarquía estaba basada en un modelo publicado con anterioridad por Fraser et al²⁷².

La estrategia de elección debería ser, por tanto, aquella que nos permitiera obtener el nivel de prestación analítico superior. Sin embargo, la valoración de las diferentes magnitudes bioquímicas en cada situación clínica concreta presenta problemas, fundamentalmente de practicabilidad^{267,273}. En consecuencia, la estrategia más aplicada es aquella propuesta inicialmente por Cotlove et al²⁵¹, según la cual las especificaciones de calidad deben ser obtenidas a partir de los datos de VB.

Rango	Estrategia	Subclases
1	Evaluación del efecto de la prestación analítica en las decisiones clínicas concretas	EC ^a en situaciones clínicas concretas
2	Evaluación del efecto de la prestación analítica en las decisiones clínicas generales	2A. EC ^a de calidad basadas en la variación biológica 2B. EC ^a basadas en las opiniones de los clínicos
3	Recomendaciones de profesionales expertos	3A. Guías de grupos nacionales o internacionales 3B. Guías de expertos individuales o de grupos institucionales
4	Basadas en recomendaciones legales o de programas de evaluación externa de la calidad	4A. EC ^a marcadas por la ley 4B. EC ^a propuestas por programas de evaluación externa de calidad
5	Datos publicados sobre el estado del arte	5A. Datos del estado del arte extraídos de programas de calidad externa 5B. Metodología individual publicada

Tabla 11. Modelo jerárquico de clasificación de las estrategias disponibles para establecer especificaciones de la calidad en el laboratorio clínico. EC^a; especificaciones de calidad. Adaptado de Fraser CG²⁴⁷.

4.1.2. Especificaciones de Calidad para la Imprecisión Basadas en la Variación Biológica

La Organización Internacional de Estandarización (ISO) define la precisión como la concordancia entre resultados independientes de medidas obtenidas bajo condiciones estipuladas, lo que en la práctica de un laboratorio de bioquímica clínica equivale a la concordancia entre replicados de una misma muestra²⁷⁴.

De acuerdo con esta definición podemos concluir que, trabajar con una baja imprecisión reduce la variabilidad inherente de los resultados individuales de una prueba, aumentando la reproductibilidad y la fiabilidad de la misma. En 1970, Cotlove et al²⁵¹ señalaron que el CV_A máxima tolerable en un laboratorio clínico debería ser menor o igual a la mitad del CV_I.

Las bases estadísticas que corroboran esta teoría fueron desarrolladas unos años después por Harris²⁷⁵, quién estableció en sus conclusiones que, si CV_A = 0,5 CV_I, el grado de variabilidad añadida a la variabilidad intrínseca de una determinada prueba diagnóstica es un 11,8%, considerándose ésta una incertidumbre razonable. Este concepto ha sido ampliado en los últimos años²⁷⁶, observándose que un aumento de la imprecisión analítica en relación al CV_I, aumenta la variabilidad total del resultado de la prueba (**Figura 17**).

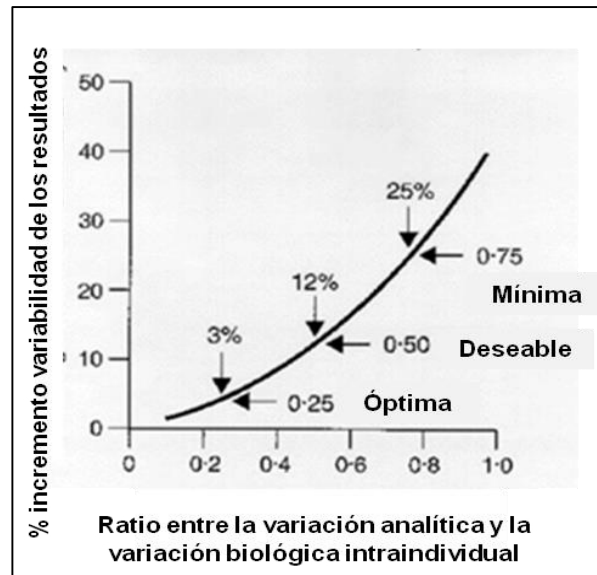


Figura 17. Especificaciones de calidad para la imprecisión, mostrando la variabilidad en el resultado de la prueba. Adaptado de Fraser et al²⁷⁶.

En consecuencia, se han propuesto tres niveles de clasificación de las prestaciones analíticas para la imprecisión ^{272,273,276,277}.

- ❖ **Prestación Deseable:** Es la especificación de calidad basada en la VB considerada de aplicación general.
- ❖ **Prestación Óptima:** Es la especificación de calidad más estricta, recomendándose su aplicación en aquellas magnitudes biológicas donde los estándares de prestación deseable se consiguen fácilmente con la tecnología y metodología actuales.
- ❖ **Prestación Mínima:** Esta especificación de calidad, menos estricta, debe ser aplicada únicamente para aquellas magnitudes para las que, con la tecnología y metodología actuales, no es posible alcanzar la prestación deseable.

4.1.3. Especificaciones de Calidad para el Error Sistemático Basadas en la Variación Biológica

El ES se define como la diferencia entre el resultado analítico obtenido y la estimación del valor verdadero, relacionándose de esta forma con la exactitud²⁷⁴. La consecuencia de un ES positivo es el desplazamiento de los valores observados para

una determinada magnitud bioquímica a la derecha del intervalo de referencia, lo que da lugar tanto a un incremento del porcentaje de población fuera del límite superior de referencia, como a una disminución del porcentaje de población fuera del límite inferior. Un ES negativo presentará un efecto contrario. Por lo tanto y desde un punto de vista clínico, la situación ideal sería trabajar con un ES nulo que permitiera la transferibilidad de los valores de referencia poblacionales tanto entre distintos laboratorios, como entre diferentes métodos o sistemas analíticos²⁴⁹.

Gowans et al²⁷⁸, fueron los primeros autores en postular que aquellos laboratorios con una población homogénea deberían poder utilizar los mismos intervalos de referencia y, para ello, el ES debía ser inferior a una cuarta parte de la VB. De forma similar a la imprecisión, se pueden considerar tres niveles de especificaciones de la calidad para el ES, deseable, óptima y mínima, en función de los porcentajes de población fuera del intervalo de referencia (**Figura 18**)^{277,278}.

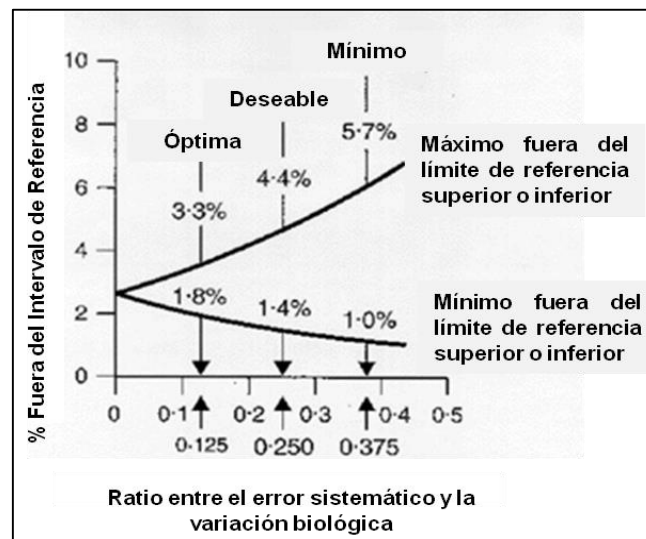


Figura 18. Especificaciones de la calidad para el error sistemático mostrando el porcentaje de población fuera de los intervalos de referencia. Adaptado de Fraser et al²⁷².

4.1.4. Especificaciones de Calidad para el Error Total Basadas en la Variación Biológica

Westgard QC²⁷⁹ introdujo por primera vez en 1974 el concepto de ET, como un parámetro en el que se consideraba de forma conjunta la imprecisión y el error sistemático. Siguiendo las mismas premisas que para la imprecisión y el ES, las especificaciones de calidad definidas para el ET se pueden clasificar como deseables, óptimas y mínimas.

4.2. Evaluación de la Utilidad de los Valores de Referencia Poblacionales

4.2.1. Definiciones y Concepto de Valores de Referencia

El objetivo primordial de un laboratorio clínico es la detección de las variaciones que tienen lugar en las distintas magnitudes bioquímicas como consecuencia de factores fisiológicos o patológicos, aportando información cuantitativa que podrá ser utilizada con fines preventivos, diagnósticos y de seguimiento. Sin embargo, de forma aislada, cualquier resultado analítico carece de interés por sí mismo, siendo necesaria su comparación con resultados obtenidos en una población libre de enfermedad, es decir, con los resultados considerados como normales o de referencia²⁸⁰.

La IFCC define los **VR** como el resultado analítico obtenido en un **Individuo de Referencia**^{281,282}. Este individuo es un sujeto que pertenece a la población a la que sirve el laboratorio clínico, y que ha sido seleccionado por presentar un estado de salud previamente definido. Esta flexibilidad en la definición del individuo de referencia permite establecer VR no solo en estados libres de enfermedad, sino también en otras condiciones fisiológicas (embarazo) y patológicas; sin menoscabo de los fundamentos teóricos. El conjunto de todos los posibles individuos de referencia constituye la **Población de Referencia**. Al ser virtualmente imposible estudiar a la totalidad de la población de referencia se recurre a la teoría del muestreo, definiéndose la **Muestra de Referencia** como un subconjunto representativo de la población de referencia.

Las distribuciones de probabilidad de los datos recogidos en la muestra de referencia constituyen la distribución de referencia. Esta distribución no sigue necesariamente un modelo gaussiano, de hecho la obtención de tal modelo suele ser excepcional. El **Intervalo de Referencia (IR)** en una distribución gaussiana se define como el intervalo alrededor de la media de la distribución de referencia que abarca aproximadamente al 95% de la población, dejando fuera del mismo al 5% restante^{281,282}. En aquellos casos en los que determinadas características de los individuos de referencia, tales como la edad o el sexo, produzcan IR significativamente diferentes, será necesario realizar una estratificación de los VR.

Los VR pueden ser categorizados atendiendo a distintos criterios como, por ejemplo, VR poblacionales o individuales, univariados o multivariados, con especificación de tiempo, etc. La inmensa mayoría de los VR disponibles en la bibliografía son poblacionales, univariados y no tiempo específicos, es decir los

especímenes son extraídos sin tener en cuenta los ritmos biológicos o la VB de la magnitud a estudio, y estimados para un único parámetro bioquímico²⁸⁰.

4.2.2. Limitaciones de los Valores de Referencia Poblacionales. Índice de Individualidad

Aún con una correcta estratificación, los VR poblacionales presentan una serie de problemas derivados, fundamentalmente, de la elevada individualidad observada para la mayoría de magnitudes bioquímicas²⁸³. Esta individualidad es la responsable de que, en condiciones fisiológicas, ningún individuo presente valores que abarquen la totalidad del IR, por lo que es posible que resultados que sean muy inusuales en él, se encuentren dentro de los límites del IR, o que valores totalmente normales se encuentren fuera del IR.

La mejor herramienta disponible en la actualidad para evaluar objetivamente la utilidad de los VR para un determinado parámetro bioquímico, es la estimación del **Índice de Individualidad (II)** derivado de los datos de VB. El II se calcula como la relación entre el coeficiente de variación total (CV_T), definido como el sumatorio del CV_A y el CV_I , y el CV_G ^{241,283,284}. En la década de los 80, Harris et al²⁴¹ propusieron el establecimiento de dos puntos de corte para la evaluación del II:

- ❖ Si $II < 0,6$, la dispersión de los valores para cada individuo comprenderá solo una mínima parte del IR. Por lo tanto, el parámetro bioquímico a estudio presentará una elevada individualidad y los VR convencionales serán de poca utilidad, recomendándose la comparación con resultados previos del propio paciente.
- ❖ Si $II > 1,4$, la distribución de valores para cada individuo cubre en su mayor parte la distribución del IR. Así pues, el parámetro bioquímico presenta una baja individualidad, y los VR convencionales serán de utilidad en diversas situaciones clínicas.

La mayoría de magnitudes bioquímicas de interés clínico presentan una elevada individualidad, lo que queda reflejado en el hecho de que para 276 de las 358 magnitudes incluidas en la base de datos de VB, el II estimado es inferior o próximo a 0,6 (**Tabla 12**)²⁵⁶. Esta individualidad dificulta tanto la monitorización y el seguimiento de los pacientes, como el diagnóstico de enfermedades precoces, latentes o subclínicas^{241,242,247}.

Parámetro	CV _I ^a (%)	CV _G ^b (%)	II ^c
Albúmina	3,1	4,2	0,74
Calcio	1,9	2,8	0,68
Creatinina	4,3	12,9	0,33
Lactato	27,2	16,7	1,63
Magnesio	3,6	6,4	0,56
Potasio	13,6	13,4	1,02
Sodio	0,7	1,0	0,7
Transferrina	3,0	4,3	0,7

Tabla 12. Índice de Individualidad y componentes de variación biológica definidos para algunas magnitudes bioquímicas a modo de ejemplo.

Adaptado de Fraser CG²⁴⁷. CV_I^a, coeficiente de variación intraindividual; CV_G^b, coeficiente de variación interindividual; II^c, índice de individualidad.

4.3. Interpretación del Significado Clínico de Cambios en una Serie de Resultados: Valor de Referencia del Cambio.

Los resultados bioquímicos proporcionados por el laboratorio clínico son empleados con diversos propósitos, entre los que se encuentran el diagnóstico, el cribado o la investigación médica. Sin embargo, la mayoría de las pruebas solicitadas en la práctica clínica habitual tienen como objetivo la monitorización y el seguimiento de pacientes con patologías tanto agudas como crónicas.

Como ya hemos señalado, la elevada individualidad observada en la mayoría de magnitudes bioquímicas, hacen que la utilidad de los VR para la interpretación de cambios en resultados seriados sea muy limitada^{241,242,247}. Este hecho ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos que nos permitan evaluar de una forma objetiva el significado clínico de cambios en series de resultados, siendo la mejor herramienta disponible en la actualidad la aplicación del **Valor de Referencia del Cambio (VRC)** derivado de los datos de VB²⁸⁵.

4.3.1. Definición y Cálculo del Valor de referencia del Cambio

Los cambios observados en resultados seriados de un individuo pueden ser debidos tanto a alteraciones en la situación clínica del paciente, como a la variabilidad introducida a consecuencia de la variación preanalítica, analítica y biológica intraindividual.

La variación preanalítica puede ser minimizada mediante la estandarización de las condiciones de obtención, transporte y manejo de las muestras. En estas condiciones, el CV_T para cada resultado obtenido en el laboratorio dependerá únicamente de la VB_i y de la V_A^{246,247,285}.

Cuando, para una determinada magnitud bioquímica, se evalúa la diferencia entre dos resultados de una serie, el CV_T observado será igual a la suma de las variaciones individuales para cada resultado^{246,247,285}:

Por lo tanto, para que los cambios en resultados seriados puedan ser considerados clínicamente significativos, la diferencia entre los resultados encontrados debe ser mayor que la suma de la variación inherente a ambos resultados. Este concepto, introducido por primera vez por Harris y Yasaka²⁸⁶, se denomina **VRC**, y se calcula mediante la fórmula:

$$VRC = \pm 2^{1/2} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

donde Z son las desviaciones normales estandarizadas para un nivel de probabilidad dado, como puede verse en la **Tabla 13**. Las puntuaciones Z unidireccionales se emplearan cuando únicamente presente relevancia clínica la probabilidad de un aumento o un descenso en la concentración del parámetro a estudio; mientras que las puntuaciones Z bidireccionales se emplearan cuando cualquier tipo de cambio en su concentración pueda ser clínicamente relevante.

Probabilidad (%)	Puntuación Z Unidireccional	Puntuación Z Bidireccional
99	2,33	2,58
98	2,05	2,33
97	1,88	2,17
96	1,75	2,05
95	1,65	1,96
90	1,28	1,65

Tabla 13. Puntuaciones Z y probabilidad. Adaptado de Fraser CG²⁴⁷.

En la práctica clínica habitual, las puntuaciones Z bidireccionales son la más utilizadas, empleándose un Z de 1,96 y 2,58 para la obtención de un VRC significativo (p<0,05) y altamente significativo (p<0,01), respectivamente^{246,247,285}. El CV_A debe ser estimado a partir de los resultados del control de calidad interno de cada laboratorio clínico, mientras que el CV_I puede extraerse de la base de datos internacional de

VB²⁵⁶. Al ser una parte importante en el cálculo del VRC, se recomienda controlar exhaustivamente la imprecisión del método de medida, siendo el objetivo el cumplimiento de las especificaciones de calidad derivadas de los datos de VB. El CV_I es, en general, constante e independiente del tiempo, la geografía o el método empleado en su estimación^{247,248,250}. Por lo tanto, el VRC se considera un herramienta de elevada fiabilidad y de aplicación universal^{246,285,287,288}.

En los últimos años, el VRC se ha empleado en un número creciente de situaciones clínicas, entre las que destacan: la interpretación de cambios en los resultados de us-TnT o us-TnI²⁸⁹, el establecimiento de umbrales fiables en la lucha contra el dopaje²⁹⁰, la evaluación de la respuesta metabólica al tratamiento en sujetos diabéticos²⁹¹, la definición de las propiedades farmacocinéticas, farmacogénicas y farmacodinámicas individuales para la monitorización terapéutica²⁹² o el diagnóstico y seguimiento de neoplasias²⁹³. A este respecto, en el año 2011, dentro de otro proyecto desarrollado en nuestro laboratorio, se publicaron los resultados de un estudio retrospectivo en el que se evaluaron 69 sujetos con una velocidad de crecimiento de PSA > 0,75 ng/mL/año, concluyendo que el empleo del VRC del PSA como valor de decisión clínica, podría reducir sustancialmente el número de biopsias prostáticas innecesarias²⁹⁴.

4.3.2. Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento de Pacientes

El VRC estimado a partir de los datos de VB de individuos sanos, se puede emplear en el seguimiento de pacientes con patologías crónicas, si bien, teniendo en cuenta que la patología subyacente puede alterar tanto el punto de ajuste homeostático de un analito como la variación en torno a ese punto, su aplicación podría no ser apropiada.

En 2007, Ricos et al²⁹⁵ se propusieron realizar una recopilación de todos los artículos sobre VB publicados hasta esa fecha en distintas patologías, de forma similar a como habían hecho unos años antes para la creación de la base de datos de VB en individuos sanos. El objeto de esta recopilación era tanto organizar la información disponible de una forma asequible para su empleo en la práctica clínica²⁹⁶, como evaluar si la presencia de una patología subyacente alteraba los datos de VB de las magnitudes bioquímicas estudiadas. Para ello, los resultados de CV_I estimados en distintas patologías fueron comparados con los datos de VB para sujetos sanos disponibles en su base de datos.

Estos autores demostraron que, para la mayoría de las magnitudes estudiadas, los valores de CV_I observados en pacientes eran similares a los estimados en individuos sanos, con la excepción de algunas magnitudes consideradas marcadores específicos de órgano. Para éstas, los CV_I estimados en las patologías específicas eran mayores que en individuos sanos y que en otras patologías:

- ❖ Alfetoproteína en enfermedades hepáticas
- ❖ CEA en cáncer colorrectal
- ❖ Antígeno carbohidrato 125 (CA 125) en cáncer de ovario
- ❖ Antígeno carbohidrato 15.3 (CA 15.3) en cáncer de mama
- ❖ Creatinina en trasplante renal
- ❖ Fosfatasa alcalina en la enfermedad de Paget
- ❖ Hemoglobina glicosilada, albuminuria y lipoproteína (a) en DM

El empleo del VRC derivado de individuos sanos para el seguimiento de estas patologías conllevaría un incremento en el número de falsos positivos, lo que podría repercutir negativamente en la toma de decisiones clínicas, como, por ejemplo, el aumento de la dosis de tratamiento, con el consecuente riesgo de toxicidad; o la realización de pruebas invasivas^{295,297}. Por lo tanto, la estimación de los componentes de VB para magnitudes bioquímicas decisivas en la monitorización de situaciones patológicas bien definidas, pueden ser clave para un adecuado seguimiento de los pacientes con enfermedades crónicas.

Hipótesis de Trabajo y Objetivos

Las ECV constituyen una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados, considerándose un problema de salud de primer orden. En el caso de los pacientes con ERCT este problema es aún más acuciante, observándose una tasa de mortalidad cardiovascular entre 10 y 20 veces superior al de la población general. Este incremento del RCV tiene una etiología multifactorial, asociándose a la elevada prevalencia y al efecto acumulativo de factores de riesgo convencionales, no convencionales y específicos de la uremia.

Una correcta interpretación de los resultados de los principales factores bioquímicos de riesgo cardiovascular (FBRCV), tanto en la población general como en pacientes con ERCT, será clave para la adecuada identificación y seguimiento de individuos de alto riesgo, y esto debería llevarse a cabo desde el conocimiento de la naturaleza de su VB.

Sin embargo, y a pesar de su relevancia en la valoración del RCV, la bibliografía disponible sobre los datos de VB para la mayoría de los FBRCV es muy limitada en individuos sanos y, hasta la fecha, inexistente en pacientes con ERCT.

Por ello, los **objetivos** de este estudio han sido:

- Evaluar la fiabilidad de un modelo experimental simplificado para el estudio de los componentes de VB, basado en el análisis por duplicado de una única muestra por cada sujeto.
- Estimar los componentes de VB de los FBRCV más relevantes para el seguimiento de los pacientes con ERCT. Las magnitudes bioquímicas estudiadas fueron:
 - ✓ FBRCV Convencionales: **CT, c-LDL, c-HDL, c-VLDL, c-noHDL, TG.**
 - ✓ FBRCV No Convencionales: **PCR, us-TnT.**
 - ✓ FBRCV Específicos de la Uremia: **albúmina y perfil de aminoácidos libres plasmáticos** (marcadores bioquímicos de DEP); **transferrina** (marcador de DEP y anemia renal); **ferritina, vitamina B12 y ácido fólico** (marcadores de anemia renal); **calcio, fosfato, PTHi y 25-OH-Vitamina D** (marcadores de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral)

- Estudiar el efecto del tiempo de permanencia en el programa de HD sobre la concentración y VB de los FBRCV evaluados.
- Evaluar como la ERCT altera la naturaleza de la VB de las magnitudes bioquímicas evaluadas mediante su comparación con los datos de VB estimados en una cohorte de individuos sanos.
- Derivar los VRC más apropiados para los datos de VB estimados en individuos sanos y pacientes con ERCT, y evaluar la utilidad de estos VRC en la identificación de cambios significativos en situaciones clínicas reales de pacientes con ERCT.
- Calcular el II y las especificaciones de calidad analítica deseables derivadas de los datos de VB estimados para los FBRCV en individuos sanos y verificar la factibilidad de su cumplimiento.

Material y Métodos

Capítulo 5. Diseño del Estudio de Variación Biológica

1. Características del Diseño Experimental

Para la estimación de los componentes de VB de los FBRCV se aplicó un nuevo protocolo experimental, el cual, si bien parte de las premisas originalmente propuestas por Cotlove et al²⁵¹, tiene como objetivo minimizar las desventajas que supone, en cuanto a tiempo y carga analítica, el duplicado de todas las muestras del estudio.

Siguiendo este diseño experimental, todas las muestras del mismo grupo, ya fueran sujetos sanos o pacientes con ERCT, fueron analizadas aleatoriamente en una única serie analítica, duplicando únicamente la primera muestra extraída a cada sujeto; seleccionando ésta por ser la de mayor tiempo de almacenamiento y, por tanto, la más susceptible de presentar variaciones inespecíficas. De esta forma, se elimina la V_A interserie y la V_A intraserie se calcula en la propia matriz de las muestras a estudio, al mismo tiempo que se disminuye el coste y el tiempo analítico.

Para minimizar la variación preanalítica, todos los análisis fueron realizados en un mismo instrumento, por el mismo operador y utilizando el mismo lote de reactivos, consumibles y calibradores.

2. Sujetos

El estudio de la VB de los FBRCV se realizó en dos cohortes independientes de sujetos: pacientes con ERCT e individuos sanos. El diseño y la ejecución del estudio fue claramente explicado a todos los participantes, obteniéndose su consentimiento informado.

2.1. Pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal

Para la estimación de los datos de VB en la ERCT, se seleccionaron 20 pacientes clínicamente estables, incluidos en el programa de HD crónica convencional del Servicio de Nefrología del Hospital San Agustín (Avilés, Asturias, España). Los criterios de inclusión en el estudio fueron:

- ❖ Edad inferior a 75 años.
- ❖ Sin historia clínica de eventos cardiovasculares, DEP, hiperparatiroidismo secundario, anemia ferropénica o tratamientos hipolipemiantes.
- ❖ Sin ingresos hospitalarios durante la duración del estudio o en los 3 meses previos.
- ❖ Sin variaciones significativas en la concentración sérica de las magnitudes bioquímicas empleadas en su monitorización en el mismo periodo de tiempo.
- ❖ Peso seco estable.

Durante el periodo de seguimiento, dos sujetos fueron hospitalizados debido a neumonía y fiebre de origen desconocido, por lo que fueron eliminados del estudio. Las principales características basales pre-diálisis de los 18 sujetos restantes (11 mujeres y 7 hombres; rango de edad: 31-75 años), se muestran en la **Tabla 14**.

2.2. Individuos Sanos

Una cohorte de 11 sujetos aparentemente sanos (8 mujeres y 3 hombres, rango de edad 21-50 años) fue seleccionada para el estudio de VB en individuos sanos, no realizándose estudios complementarios para excluir la presencia de enfermedades asintomáticas.

Ninguno de los sujetos presentaba sintomatología o antecedentes clínicos de enfermedad cardiovascular o renal, desnutrición, alteraciones del metabolismo óseo-mineral o anemia; y todos ellos mantuvieron su estilo de vida habitual durante el periodo de realización del estudio.

Rango de edad, años	31-75
Mujeres, %	61
Etiología de la ERCT^a	
Nefropatía diabética, %	28
Riñón poliquístico, %	22
Glomerulonefritis primaria, %	5,5
Nefrosclerosis, %	5,5
Otras enfermedades renales, %	17
No filiada, %	22
Hipertensión, %	38
Tabaquismo, %	17
Tratamientos Farmacológicos	
EPO ^b , %	40
Heparina, %	28
Antihipertensivos, %	38
Insulina	11
IMC^{c,d}, kg/m²	26 (19-32)
Hemoglobina^d, mmol/L	9,5 (7,4-12,5)
Glucosa^d, mg/dL	91 (49-158)
Gamma-glutamilttransferasa^d, U/L	19 (10-53)
Alanina aminotransferasa^d, U/L	11 (3-32)
Aspartato aminotransferasa^d, U/L	3 (0-23)
Creatinina sérica^d, mg/dL	8,9 (5,3-10,9)
Urea^d, mg/dL	136,5 (49-213)
Ácido úrico^d, mg/dL	5,7 (3,8-8,4)

Tabla 14. Características pre-diálisis de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal clínicamente estable. ERCT^a, enfermedad renal crónica terminal; EPO^b, hormona eritropoyética; IMC^c, índice de masa corporal; ^d, los datos se muestran como mediana (rango).

3. Muestras

El proceso de extracción y manejo de las muestras fue estandarizado siguiendo un estricto protocolo para minimizar la variación preanalítica. Todas las muestras fueron extraídas en condiciones de ayuno y a la misma hora del día (8.30-10.00), por un flebotomista experimentado mediante venipuntura convencional y evitando en lo posible la estasis venosa. En todos los casos se obtuvieron muestras de sangre en tubos de recolección a vacío (Vacuette, Greiner Bio-one, Madrid, España) sin anticoagulante para la obtención de suero; y con heparina de litio o sal dipotásica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulantes para la obtención de las muestras de plasma. Con el fin de prevenir una posible contaminación cruzada, el tubo de suero fue el primero en ser extraído.

Las muestras procedentes de los pacientes con ERCT fueron extraídas una vez al mes en condiciones pre-diálisis, obteniéndose una media de 5 muestras por paciente durante un periodo de seguimiento de 6 meses (junio-noviembre). Las muestras de individuos sanos, por su parte, fueron extraídas una vez por semana durante 5 semanas consecutivas entre los meses de septiembre a octubre.

Tras la extracción, la sangre fue dejada coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos para la obtención de suero, centrifugándose posteriormente a 3500g durante 10 minutos; mientras que para la obtención de plasma, la sangre fue centrifugada a 3500g durante 10 minutos de forma inmediata tras su extracción, evitando de esta forma la degradación *in vitro* de los componentes sanguíneos. Una vez centrifugadas, todas las muestras fueron alicuotadas y congeladas a -80 °C durante un máximo de 11 meses antes de su análisis. Las muestras de plasma EDTA fueron empleadas en la determinación de PTHi; mientras que las muestras de heparina de litio se utilizaron en la determinación del perfil de aminoácidos libres plasmáticos. El resto de FBRCV fueron analizados en las muestras de suero.

Capítulo 6. Métodos Analíticos

1. Consideraciones Generales

Previamente al análisis de las muestras, y con el objeto de comprobar el adecuado rendimiento de los métodos de medida, se procesaron dos niveles de control de calidad internos empleados de forma rutinaria en nuestro laboratorio. La única excepción fue la determinación de aminoácidos libres plasmáticos en la que, al no disponer de controles de calidad comerciales, se utilizó como control una mezcla de muestras (*pool*) previamente valorado, procedentes de individuos sanos. Así mismo, todos los métodos analíticos empleados fueron evaluados de forma regular mediante la participación en programas nacionales e internacionales de evaluación externa de la calidad.

Antes de su análisis, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y agitadas durante 30 segundos para asegurar su homogeneidad.

2. Métodos Analíticos para la Determinación de Lípidos y Lipoproteínas, Proteínas Plasmáticas y Minerales

2.1. Instrumentación

El sistema analítico Cobas 711 (Roche Diagnostics, Barcelona, España) fue empleado en la cuantificación de la concentración sérica de los lípidos y las lipoproteínas, las proteínas plasmáticas y los minerales incluidos en el estudio.

2.2. Métodos Analíticos para la Determinación de Lípidos y Lipoproteínas

2.2.1. Descripción de los Métodos Analíticos

La determinación de la concentración de los lípidos y las lipoproteínas séricas se realizó mediante métodos enzimáticos colorimétricos.

2.2.1.1. Colesterol Total

Este método se basa en el desdoblamiento de los ésteres de colesterol en colesterol libre y ácidos grasos, por acción del enzima colesterol esterasa (CE). La colesterol oxidasa (COD) cataliza entonces la oxidación del colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual, en presencia de la enzima peroxidasa (POD), induce la unión oxidativa del fenol y la 4-aminofenazona, generándose un colorante rojo de quinona-imina. La intensidad cromática del colorante formado es directamente proporcional a la concentración de CT, y se mide fotométricamente a 505 nm.

2.2.1.2. Colesterol LDL

El método empleado en la determinación de c-LDL permite su medición selectiva mediante la combinación de dos procesos: la solubilización micelar del c-LDL por un detergente no iónico y la interacción de un compuesto carbohidratado con el c-VLDL y los quilomicrones.

Tras el desdoblamiento de los ésteres de colesterol por acción del enzima CE, el H₂O₂ formado como producto secundario en la reacción catalizada por la COD, reacciona con la 4-aminoantipirina y la N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica (HSDA), formando un colorante purpúreo azul, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de c-LDL, midiéndose fotométricamente a 585 nm. Los resultados obtenidos por este método se correlacionan con los derivados del método de referencia, el cual está basado en la ultracentrifugación.

La concentración de c-LDL fue calculada también mediante la aplicación de la fórmula de Friedwald²⁹⁸:

$$[\text{c-LDL}] = [\text{CT}] - [\text{c-HDL}] - [\text{TG}]/5$$

2.2.1.3. Colesterol HDL

El método empleado permite la medida directa y selectiva del c-HDL en suero, mediante el uso de enzimas modificadas por polietilenglicol (PEG) y sulfato de dextrano. En presencia de iones magnesio (Mg²⁺), el sulfato de dextrano forma complejos hidrosolubles de forma selectiva con las partículas de c-LDL, c-VLDL y los

quilomicrones. La modificación de las enzimas CE y COD por el PEG, hace que éstas muestren una actividad catalítica, observándose la siguiente reactividad progresiva:

$$\mathbf{c\text{-LDL} < c\text{-VLDL} \cong \text{Quilomicrones} < c\text{-HDL}$$

Bajo la acción catalítica de la POD, el H₂O₂ formado como producto secundario en la oxidación de los ésteres de colesterol, reacciona con la 4-aminoantipirina y el HSDA para formar un colorante azul purpúreo, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración sérica de c-HDL y se mide fotométricamente a 585 nm.

2.2.1.4. Colesterol VLDL y noHDL

La concentración de c-VLDL se estimó a partir de la concentración obtenida para el CT, el c-HDL y el c-LDL, mediante la fórmula:

$$\mathbf{[c\text{-VLDL}] = [CT] - [c\text{-LDL}] - [c\text{-HDL}]}$$

El c-noHDL, el cual permite una estimación conjunta del colesterol de las lipoproteínas LDL, IDL y VLDL, se calculó mediante la fórmula:

$$\mathbf{[c\text{-noHDL}] = [CT] - [c\text{-HDL}]}$$

2.2.1.5. Triglicéridos

Este método emplea una lipasa lipoproteica para hidrolizar completamente los TG a glicerol, el cual se oxidará posteriormente a dihidroxiacetonafosfato y H₂O₂ por la acción del enzima glicerol-3-fosfato oxidasa. El H₂O₂ así formado, reacciona bajo la acción de la POD con la 4-aminofenazona y el 4-clorofenol para formar un colorante rojo en una reacción a punto final, cuya intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración sérica de TG y se mide fotométricamente a 505 nm.

2.2.2. Características de Practicabilidad y Requerimientos Analíticos

El límite inferior de detección (LD_i), definido como la menor concentración del analito que es posible diferenciar de cero, y el límite superior del rango lineal (LD_s) de los

métodos de medida empleados en la determinación de los lípidos y las lipoproteínas séricas, se recogen en la **Tabla 15**.

	LD _I ^a	LD _S ^b
Colesterol Total, mg/dL	3,86	800
c-LDL^c, mg/dL	3,86	548
c-HDL^d, mg/dL	3,0	120
Triglicéridos, mg/dL	8,9	889

Tabla 15. Características de practicabilidad de los métodos de medida para la determinación de los lípidos y las lipoproteínas séricas. ^aLD_I, límite inferior de detección; ^bLD_S, límite superior del rango lineal; ^cc-LDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; ^dc-HDL, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

Los métodos empleados cumplen con los requisitos establecidos por el *National Institute of Health* (NIH) y el *National Cholesterol Education Program* (NCEP)²⁹⁹, en cuanto a imprecisión, ES y ET (**Tabla 16**).

	Imprecisión, %	Error Sistemático, %	Error Total, %
Colesterol total	< 3,0	< 3,0	< 8,9
c-LDL	< 4,0	< 4,0	< 12,0
c-HDL	< 4,0	< 5,0	< 13,0
Triglicéridos	< 5,0	< 10,7	<15.0

Tabla 16. Recomendaciones del National Institute of Health (NIH) y del National Cholesterol Education Program (NCEP) sobre los requisitos de fiabilidad de los métodos de medida para la determinación de colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y triglicéridos.

2.3. Métodos Analíticos para la Determinación de las Proteínas Plasmáticas

2.3.1. Descripción de los Métodos Analíticos

Los métodos empleados en la determinación de las proteínas plasmáticas han sido estandarizados frente a un patrón de referencia para proteínas en suero humano proporcionadas por el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (IRMM)³⁰⁰.

2.3.1.1. Albúmina

La determinación de la concentración sérica de albúmina se realizó mediante un método colorimétrico. A un pH de 4,1, la albúmina tiene un carácter lo suficientemente catiónico para formar un compuesto con el verde de bromocresol (colorante aniónico), dando lugar a un complejo azul verdoso, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración sérica de albúmina; determinándose fotométricamente a 575nm.

2.3.1.2. Transferrina, Ferritina y Proteína C Reactiva

La determinación de la concentración de transferrina, ferritina y PCR séricas, se realizó mediante métodos inmunoturbidimétricos basados en el principio de aglutinación, según el cual las proteínas se adhieren a partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos, determinándose el precipitado así formado por turbidimetría.

Para la determinación de la concentración sérica de PCR en individuos sanos se empleó también un método de alta sensibilidad el cual se basa en los mismos principios de aglutinación que el método convencional y proporciona una sensibilidad analítica 10 veces mayor ($LD_I = 0,15 \text{ mg/L}$; $LD_S = 20 \text{ mg/L}$).

2.3.2. Características de Practicabilidad

El LD_I y el LD_S de los métodos de medida empleados en la determinación de las proteínas plasmáticas, se recogen en la **Tabla 17**.

	LD_I^a	LD_S^b
Albúmina, g/dL	0,2	6
Transferrina, mg/dL	10	520
Ferritina, ng/mL	0,3	800
PCR, mg/L	1,0	250
us-PCR, mg/L	0,1	20

Tabla 17. Características de practicabilidad de los métodos de medida para la determinación de las proteínas plasmáticas: albúmina, transferrina, proteína C reactiva (PCR), PCR de alta sensibilidad (us-PCR). ^a LD_I , límite inferior de detección;

^b LD_S , límite superior del rango lineal.

2.4. Métodos Analíticos para la Determinación de los Minerales Calcio y Fosfato

2.4.1. Descripción de los Métodos Analíticos

La determinación de la concentración sérica de calcio y fosfato se realizó mediante métodos colorimétricos.

2.4.1.1. Calcio

En condiciones alcalinas, el Ca^{2+} reacciona con la o-cresolftaleína complexona para formar un complejo de color violeta, cuya intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración sérica de calcio, y se mide fotométricamente a 600 nm. La adición a la mezcla de reacción de 8-hidroxiquinolina, previene posibles interferencias con los iones Mg^{2+} y Fe^{2+} . Este método ha sido estandarizado frente al método de referencia por absorción atómica. El LD_1 y el LD_5 del método han sido establecidos en 0,1 y 5,0 mmol/L, respectivamente.

2.4.1.2. Fosfato

El método empleado en la determinación de la concentración sérica de fosfato se basa en la reacción del fosfato inorgánico con el molibdato de amonio en presencia de ácido sulfúrico, para formar un complejo de fosfomolibdato de amonio, cuya concentración es directamente proporcional a la concentración de fosfato inorgánico de la muestra, determinándose fotométricamente a 340 nm. El LD_1 y el LD_5 del método fueron, respectivamente, 0,1 y 6,5 mmol/L.

2.5. Calibradores y Controles

Se emplearon los siguientes calibradores y controles suministrados por Roche Diagnostics (Barcelona, España):

- ❖ Calibrador para sistemas automatizados **c.f.a.s.**, empleado en la calibración de los métodos de determinación del CT, los TG, la albúmina, el calcio y el fosfato séricos. La concentración de estas magnitudes en el calibrador era de 164,1 mg/dL, 129,5 mg/dL, 3,57 g/dL, 2,53 mmol/L y 1,68 mmol/L, respectivamente.

- ❖ **C.f.a.s. lípidos**, empleado en la calibración de los métodos de determinación del c-LDL y el c-HDL, siendo la concentración de estas magnitudes en el calibrador de 159 y 75 mg/dL, respectivamente.
- ❖ **C.f.a.s. Proteínas**, empleado en la calibración del método de determinación de la transferrina, la ferritina y la PCR séricas. La concentración de estas magnitudes en el calibrador fue valorada en 259 mg/dL, 1010 ng/mL y 6,9 mg/dL, respectivamente.

Los controles de calidad internos empleados en la evaluación de la fiabilidad fueron el **Precicontrol Clinchem Multi1 y Multi2**, valorados a dos niveles de concentración:

- ❖ CT: 90,1 y 179 mg/dL; TG: 109 y 206 mg/dL; c-LDL: 56,4 y 98,6 mg/dL; c-HDL: 29,3 y 61,1 mg/dL
- ❖ Albúmina: 3,28 y 4,87 g/dL; Transferrina: 2,02 y 3,52 mg/dL; Ferritina: 47,1 y 68,5 ng/mL; PCR: 0,57 y 3,42 mg/dL
- ❖ Calcio: 2,11 y 3,38 mmol/L; Fosfato: 1,23 y 2,08 mmol/L.

2.6. Intervalos de Referencia

Los IR definidos para la concentración sérica de albúmina, transferrina, ferritina, PCR, calcio y fosfato, en una población adulta libre de enfermedad, se recogen en la **Tabla 18**.

		IR Inferior	IR Superior
Albúmina, g/dL		3,5	5,2
Transferrina, mg/dL		200	360
Ferritina, ng/mL	Varones	30	400
	Mujeres	15	150
PCR^a, mg/L		0,0	5,0
Calcio, mmol/L		2,15	2,50
Fosfato, mmol/L		0,87	1,45

Tabla 18. Intervalos de referencia (IR) definidos en una población adulta libre de enfermedad^{301,302}. PCR^a, proteína C reactiva.

3. Métodos Analíticos para la Determinación de Troponina T, Hormona Paratiroidea y Vitaminas Plasmáticas

3.1. Instrumentación

El sistema analítico Cobas e411 fue empleado en la determinación de us-TnT, PTHi y 25-OH-vitamina D; mientras que la determinación de vitamina B12 y folato se realizó en una plataforma analítica Cobas e601. Ambos sistemas, así como los calibradores y controles internos utilizados, fueron suministrados por Roche Diagnostics (Barcelona, España)

3.2. Descripción de los Métodos Analíticos

Las determinaciones se realizaron mediante ensayos de electroquimioluminiscencia (ECLIA).

3.2.1. Troponina T ultrasensible

La determinación de la concentración sérica de us-TnT, se basa en el empleo dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la TnT cardiaca, los cuales reconocen dos epítomos (aminoácidos 125-131 y 136-147) situados en la parte central de la molécula de TnT. Mediante este ensayo se detecta tanto la forma libre la TnT, como sus complejos binarios y terciarios³⁰³.

La curva de calibración preestablecida para el método de medida fue adaptada al analizador a través del calibrador **Troponin T hs Calset**, comercializado en dos niveles de concentración de us-TnT: 18 y 4200 ng/L. El límite del blanco (LB) y el LD_i del método fueron estimados en 3 y 5 ng/L, respectivamente; mientras que el límite de cuantificación (LC), definido como la concentración mínima de TnT medible con un CV_A inferior al 10%, fue de 13 ng/L.

3.2.2. Hormona Paratoidea

La determinación de la concentración plasmática de PTHi se realizó mediante un método de 2^a generación basado en un ensayo de tipo sándwich, según el cual un anticuerpo monoclonal biotilnado reacciona con el fragmento N-terminal de la

molécula de PTH (epítopes 26-32); mientras que un segundo anticuerpo marcado con un quelato de rutenio, se une al fragmento C-terminal (epítopes 55-64). Este método detecta tanto los fragmentos de PTHi, como los "no 1-84"; aunque no se han detectado interferencias con la PTHa.

La curva maestra de calibración fue adaptada al analizador mediante un calibrador **PTH Calset**. Éste calibrador se comercializa a dos niveles de concentración: 0,05 y 4500 pg/mL. El LD_i y LD_s estimados fueron 1,20 y 5000 pg/mL, respectivamente. La sensibilidad funcional del ensayo, definida como la menor concentración de PTHi que es posible cuantificar con un CV_A inferior al 20%, fue de 6,0 pg/mL.

3.2.3. 25-OH-Vitamina D

El método empleado en la determinación de la concentración sérica de 25-OH-vitamina D, fue un inmunoensayo competitivo basado en el empleo de la proteína de unión específica de la vitamina D para la detección tanto de 25-OH vitamina D3 como D2.

La curva maestra de calibración fue ajustada mediante un calibrador **Vitamin D Total (25-OH) Calset**, comercializado a dos niveles de concentración: 15 y 70 ng/mL. Este método ha sido estandarizado frente al método de referencia por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El LD_i y el LD_s del método fueron, respectivamente, 3 y 70 ng/mL.

3.2.4. Vitamina B12

La determinación de la concentración sérica de vitamina B12 se realizó mediante un inmunoensayo competitivo basado en el empleo de factor intrínseco gástrico, mediante el cual se detectan todas las formas de la cobalamina: hidroxicobalamina, glutationilcobalamina, metilcobalamina y adenosilcobalamina.

El calibrador empleado en el ajuste de la curva maestra fue el **Vitamin B12 Calset**, el cual se comercializa a dos niveles de concentración: 187 y 1107 pg/mL. El LD_i y el LD_s del método fueron establecidos en 30 y 2000 pg/mL.

3.2.5. Folato

El método empleado en la determinación de la concentración sérica de folato fue un inmunoensayo competitivo basado en el empleo de proteínas fijadoras específicas del folato para la detección del 5-metilTHF.

Un calibrador **Folate III Calset** fue empleado en el ajuste de la curva maestra de calibración al analizador; siendo la concentración de folato en el calibrador de 4,0 y 17,0 ng/mL. El LD_I y el LD_S del método fueron 0,6 y 1,5 ng/mL.

3.3. Controles

Los controles de calidad empleados en la evaluación de la fiabilidad fueron:

- ❖ **Precicontrol Troponin**, valorado a dos niveles de concentración de us-TnT: 26 y 1920 ng/L.
- ❖ **Precicontrol Bone**, empleados en la evaluación de los métodos de determinación de la PTHi y la 25-OH-vitamina D. Estos controles se suministran valorados a tres niveles de concentración: 60, 205 y 850 pg/mL de PTHi; y 20, 40 y 70 ng/mL de 25-OH-vitamina D.
- ❖ **Precicontrol Anemia**, empleados en la evaluación de los métodos para la determinación de vitamina B12 y folato; y valorados a tres niveles de concentración: 350, 700 y 1500 pg/mL de vitamina B12; y 3,0, 8,0 y 14,0 ng/mL de folato.

3.4. Intervalos de Referencia y Valores Recomendados

El valor discriminante empleado en la evaluación de la concentración sérica de us-TnT se corresponde con el percentil 99 de una población de referencia, el cual ha sido establecido en 14 ng/L¹⁶⁸. Para la 25-OH-vitamina D, el valor discriminante recomendado es 30 ng/mL^{103,304}.

Los IR para la concentración plasmática de PTHi, vitamina B12 y folato en una población adulta libre de enfermedad, han sido definidos en: 15-65 pg/mL; 191-663 pg/dL; y 3,1-17,5 ng/mL, respectivamente.

4. Método Analítico para la Determinación de los Aminoácidos Libres Plasmáticos

La determinación del perfil de aminoácidos libres plasmáticos se realizó por HPLC en fase reversa y detección ultravioleta (UV), siguiendo el método comercial *Pico-Tag* (Waters, Barcelona, España)³⁰⁵, basado en el uso de fenilisotiocianato (PITC) como reactivo de derivatización precolumna.

4.1. Reactivos

Los reactivos empleados en la derivatización de las muestras y en el análisis cromatográfico, se recogen, agrupados en función de la casa comercial proveedora, en la **Tabla 19**.

Casa Comercial	Características
Waters	
Pico-Tag Eluyente 1	6% acetonitrilo, 2% acetato sódico anhidro (pH 6,4), 92% agua
Pico-Tag Eluyente 2	45% acetonitrilo, 15% metanol, 40% agua
Pico-Tag solución de inyección	Buffer fosfato + acetonitrilo, pH 7,4
Millipore Corp.	
Ultrafiltros Microcon	Membranas Amicon YM de 10 KDa
Sigma-Aldrich	
Fenilisotiocianato (PITC)	
Trietilamina	
L-Metionin-Sulfona	
Solución estándar aminoácidos básicos	
Solución estándar aminoácidos ácidos y neutros	
L-Glutamina	
Merck	
Acetato sódico (NaOAc)	
Acetonitrilo (ACN)	
Ácido clorhídrico (HCl)	
Metanol (MeOH)	
Millipore	
Agua desionizada ultrapura (Milli-Q plus)	

Tabla 19. Relación de reactivos necesarios para la separación cromatográfica de aminoácidos libres plasmáticos por HPLC, agrupados en función de la casa comercial proveedora.

4.2. Instrumentación

El cromatógrafo (Waters, Barcelona, España), utilizado para la separación y cuantificación de los aminoácidos libres plasmáticos por HPLC en fase reversa, consistió en:

- ❖ Sistema binario de bombas (Waters 1525), utilizadas en la dispensación del flujo de los eluyentes 1 y 2.
- ❖ Inyector automático (Waters 717 plus autosampler), utilizado en la inyección de las muestras al sistema cromatográfico.
- ❖ Módulo de control de temperatura, modelo TCM; empleado en el establecimiento de una temperatura de trabajo de 46 °C.
- ❖ Columna en fase reversa C18 (300 x 3,9 mm) para aminoácidos libres fisiológicos (Pico-Tag, Waters). Esta columna es sometida a un estricto control de calidad previo a su comercialización, que garantiza un número de platos teóricos superior a 120000/m.
- ❖ Detector UV (*Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector*).
- ❖ Estación de trabajo controlada por un software cromatográfico *Breeze* (Waters, Barcelona, España), utilizada en la integración de los cromatogramas y en la cuantificación de aminoácidos libres.

4.3. Calibradores y Controles

El calibrador empleado consistió en una mezcla de dos soluciones estándar comerciales de aminoácidos fisiológicos, suministradas por separado: solución de aminoácidos básicos, y solución de aminoácidos ácidos y neutros; ambas con 2,5 µmol/mL de cada aminoácido en HCl 0,1N, con la excepción de la cistina con 1,25 µmol/mL. La glutamina no está presente en dichas soluciones debido a su inestabilidad en medio ácido, por lo que se preparó una solución de L-Glutamina por disolución de 3,65 mg en 10 mL de agua Milli-Q plus. El estándar de trabajo (STD) incluía las siguientes proporciones:

- ❖ 200 µL solución aminoácidos ácidos y neutros
- ❖ 200 µL solución aminoácidos básicos

- ❖ 200 µL L-Glutamina
- ❖ 650 µL Agua Milli-Q plus

La concentración de todos los aminoácidos en la mezcla final es de 400 µmol/L, con la excepción de la cistina, cuya concentración es de 200 µmol/L. Con el fin de contrarrestar posibles variaciones en los pipeteos o en los volúmenes de inyección de las muestras, se empleó un estándar interno (IS) de Metionin-Sulfona con una concentración de 400 µmol/L, preparado mediante la disolución de 7,25 mg de L-Metionin-Sulfona en 100 mL de agua Milli-Q plus.

Al no disponer de controles de calidad comerciales, la evaluación del adecuado rendimiento del método cromatográfico, se realizó empleando un *pool* de muestras de individuos sanos como muestra control. Para su preparación, las muestras procedentes de individuos sanos fueron mezcladas y filtradas hasta obtener una mezcla homogénea, la cual fue alícuotada, congelada a -20°C y liofilizada. En el momento del análisis, el *pool* fue reconstituido con 1 mL de agua Milli-Q plus.

4.4. Tratamiento Preanalítico de las Muestras

El tratamiento preanalítico de las muestras consta de dos etapas: **desproteínización** y **derivatización**.

Para la **desproteínización**, 200 µl de la muestra o del *pool* fueron diluidos con 200 µl de IS. La mezcla es agitada y ultrafiltrada mediante una membrana de microcelulosa porosa capaz de retener moléculas con una masa molecular superior a 10 KDa (ultrafiltros *Microcon*, *Millipore*), centrifugándose posteriormente a 13000 rpm durante 20 min, con el fin de obtener un volumen de ultrafiltrado superior a 50 µl.

A continuación, las muestras son sometidas al proceso de **derivatización**, el cual consiste en tres pasos de evaporación y secado a vacío:

- ❖ Paso 1: 50 µl del ultrafiltrado de las muestras o del STD, se trasvasan a un tubo capilar y se evaporan hasta sequedad en una estación de vacío, hasta alcanzar una presión de 150 mTorr. En éste secado se eliminan los solventes y los componentes volátiles de las muestras.
- ❖ Paso 2: Las muestras y el STD son rehidratados con 10 µl de solución de resecado (MeOH: NaOAc 1M: trietilamina; 2:2:1), realizándose un segundo

secado a vacío para neutralizar cualquier residuo ácido presente en las muestras.

- ❖ **Paso 3:** El residuo obtenido tras el segundo secado se disuelve en 20 µl de solución de derivatización (MeOH; trietilamina: agua: PITC; 7:1:1:1), incubándose 10 min a temperatura ambiente para la formación de los feniltiocarbamil (PTC) derivados. Tras la incubación, se realiza el último secado a vacío, en el cual la trietilamina y el exceso de reactivo son eliminados.

Una vez derivatizados, tanto las muestras, como el STD y el *pool*, se redisuelven con 100 µl de la solución de inyección, y se trasvasan a los viales del sistema cromatográfico para su inyección.

4.5. Separación Cromatográfica

La separación cromatográfica se realiza en una columna de fase reversa Pico-Tag C18, a una temperatura de trabajo de 46 °C. La elución de los PTC derivados se efectúa mediante un gradiente de eluyentes 1 y 2 (**Tabla 20**), a un flujo de trabajo de 1,0 ml/min; monitorizándose la variación de la absorbancia a 254 nm a la salida de la columna. El volumen de muestra inyectado en todos los casos fue de 10 µL, y el tiempo necesario para cada separación cromatográfica fue de 65 minutos.

Tiempo (min)	Eluyente 1 (%)	Eluyente 2 (%)
0	100	0
13.5	97	3
24	94	6
30	91	9
50	66	34
62	66	34
62.5	0	100
66.5	0	100
67	100	0

Tabla 20. Gradiente utilizado en la separación de aminoácidos libres plasmáticos según el método Pico-Tag (Waters, Barcelona, España)³⁰⁵.

Capítulo 7. Estimación de los Datos de Variación Biológica y Parámetros Derivados

1. Estimación de los Componentes de Variación Biológica

La varianza analítica intraserie (SD_A^2) fue calculada a partir de las diferencias entre los duplicados de la primera muestra de cada paciente, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$SD_A^2 = \Sigma d^2/2N$$

donde d es la diferencia entre duplicados y N es el número de duplicados. La SD_A^2 se expresa como porcentaje relativo a la media de los duplicados o CV_A .

Como paso previo a la estimación de los componentes de VB, se aplicaron los test de Cochran y Reed para la identificación de valores aberrantes en los datos de cada sujeto (intra-sujeto), y en el conjunto de datos de todos los sujetos (inter-sujetos), respectivamente. Estos test han sido formulados partiendo del principio de normalidad, por lo que, previamente a su aplicación, se realizó una transformación logarítmica de los datos de aquellas variables que no seguían una distribución gaussiana.

Tras la eliminación de los valores aberrantes, la estimación de los componentes de VB se realizó mediante un ANOVA, el cual divide la varianza total de cada una de las magnitudes estudiadas en dos componentes: varianza inter-individual (SD_G^2), y varianza total intraindividual o varianza residual (SD_{TI}^2). La SD_{TI}^2 incluye tanto la variación analítica como la biológica intraindividual, por lo que la varianza intraindividual (SD_I^2) se obtuvo tras sustraer el componente analítico, mediante la fórmula:

$$SD_I^2 = SD_{TI}^2 - SD_A^2$$

Los componentes de VB intra e interindividual se expresaron como porcentajes relativos a la media homeostática de cada individuo (CV_I) y a la media global de todos los sujetos (CV_G), respectivamente.

Los IC95% para los coeficientes de variación, se calcularon de acuerdo a la fórmula publicada por Miller EG³⁰⁶:

$$\text{IC95\%} = \text{CV} \pm Z_{0,025} [m^{-1} \times \text{CV}^2 \times (0,5 + \text{CV}^2)]^{1/2}$$

donde

$Z_{0,025} = 1,96$; desviación normal estandarizada para un nivel de probabilidad del 95%

$m = n-1$; grados de libertad de la distribución muestral, siendo n el número de datos disponible para la estimación de los componentes de VB.

2. Evaluación de la Estimación de los Datos de Variación Biológica

La potencia de la estimación de los componentes de VB, definida como la probabilidad de detectar un CV_i distinto de cero, se evaluó siguiendo el método propuesto por Røraas et al²⁵⁰, basado en la relación entre la V_A intraserie y la VB_i :

$$\text{Ratio} = \text{SD}_A / \text{SD}_i$$

Cuanto menor sea el ratio obtenido, mayor será la potencia de la estimación de los datos de VB, considerándose que cuando su valor es inferior a 1 la potencia tiende a la unidad.

3. Cálculo de los Parámetros Derivados de los Datos de Variación Biológica

Los datos de VB obtenidos para cada una de las magnitudes bioquímicas evaluadas, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT, fueron empleados en el cálculo de los VRC.

Las especificaciones de calidad analítica y el II fueron calculados únicamente a partir de los datos de VB estimados en individuos sanos, ya que estos parámetros han sido formulados para su aplicación en la población general y no en situaciones clínicas concretas, como la ERCT.

3.1. Especificaciones de Calidad

Las fórmulas empleadas para el cálculo de las especificaciones de calidad deseables para la imprecisión, el ES y el ET, se describen a continuación:

$$\text{Imprecisión} = 0,50 \text{ CV}_i$$

donde 0,50 es el factor mediante el cual el porcentaje de variabilidad analítica añadida a la variabilidad intrínseca de una prueba diagnóstica es de un máximo del 12%²⁷⁶.

$$\text{ES} = 0,250 (\text{CV}_G^2 + \text{CV}_I^2)^{1/2}$$

donde 0,250 es el múltiplo de la VB mediante el cual el porcentaje de población fuera del intervalo de referencia es de un máximo del 4,4%²⁷⁸.

$$\text{ET} = 1,65 (0,50 \text{ CV}_i) + 0,250 (\text{CV}_G^2 + \text{CV}_I^2)^{1/2} = 1,65 \text{ Imprecisión} + \text{ES}$$

donde 1,65 es el factor estadístico para un nivel de probabilidad del 90%, en el que se excluye un 10% de la distribución en uno de los extremos²⁷⁸.

3.2. Índice de Individualidad

El II se calculó como la relación entre el CV_T y el CV_G , mediante la fórmula:

$$\text{II} = (\text{CV}_I^2 + \text{CV}_A^2)^{1/2} / \text{CV}_G$$

3.3. Valor de Referencia del Cambio

La fórmula empleada para el cálculo del VRC fue:

$$\text{VRC} = 2^{1/2} * Z * (\text{CV}_A^2 + \text{CV}_I^2)^{1/2}$$

El valor de Z empleado en el cálculo de los VRC de todas las magnitudes evaluadas, fue de 1,96 (Z bidireccional; 95% de probabilidad). Para la us-TnT, la albúmina y las vitaminas plasmáticas 25-OH-vitamina D, B12 y folato, la toma de decisiones clínicas

requiere la detección de un incremento o de un descenso significativo en su concentración, por lo que para estas magnitudes se calcularon también los VRC unidireccionales ($Z = 1,65$; 95% probabilidad).

Esta fórmula asume una distribución gaussiana tanto para la V_A como para la V_B . Por lo tanto, para aquellas magnitudes en las que la distribución de los datos no era gaussiana, el VRC se estimó también mediante un método logarítmico descrito por primera vez en las ecuaciones formuladas por Fokkema et al³⁰⁷. Este método emplea el CV_T de los datos sin transformar para estimar el parámetro σ de la distribución logarítmica, mediante la fórmula:

$$\sigma = [\text{Ln} (CV_T^2 + 1)]^{1/2}$$

Dada su asimetría, se obtiene un VRC para los incrementos

$$VRC_{\text{pos}} = [\exp (1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

y otro para los decrementos

$$VRC_{\text{neg}} = - [\exp (1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

El cálculo de los IC95% para los VRC se realizó mediante la fórmula de Miller EG³⁰⁶ previamente descrita.

Capítulo 8. Evaluación Práctica de la Utilidad de los Valores de Referencia del Cambio

1. Sujetos y Protocolo de Seguimiento Bioquímico y Clínico

Para la evaluación de la utilidad de los VRC en el seguimiento del estado clínico de pacientes con ERCT, se seleccionó una nueva cohorte de 47 pacientes (21 mujeres y 26 hombres; rango de edad: 30-80 años) incluidos en el programa de HD crónica convencional del Servicio de Nefrología del Hospital San Agustín (Avilés, Asturias, España). Estos pacientes no cumplían los criterios de inclusión en el estudio de VB debido a la presencia de antecedentes clínicos de ECV, DEP, hiperparatiroidismo secundario o anemia ferropénica, o por una inadecuada adhesión al programa de HD, con un peso seco no estable. Las principales características basales pre-diálisis de estos sujetos, se recogen en la **Tabla 21**.

Los pacientes con ERCT no estable fueron monitorizados tanto bioquímica como clínicamente durante un periodo de seguimiento de 6 y 9 meses, respectivamente, con el fin de detectar cambios en el estado clínico a corto y medio plazo.

1.1. Monitorización Bioquímica

La monitorización bioquímica se realizó mediante la extracción trimestral de muestras de suero y plasma, obtenidas en condiciones pre-diálisis, de acuerdo al protocolo de seguimiento habitual del Servicio de Nefrología. De esta forma, para cada uno de los sujetos, se disponen de tres muestras: basal (inicio del estudio), control 1 (tres meses) y control 2 (seis meses).

El proceso de extracción, preparación y conservación de las muestras se realizó en idénticas condiciones a las descritas para el estudio de los componentes de VB (**3. Muestras**).

1.2. Monitorización Clínica

La monitorización clínica de los pacientes con ERCT no estable se realizó mediante la consulta de la historia clínica y de las valoraciones de los nefrólogos implicados en

su seguimiento. El diagnóstico de confirmación de eventos clínicamente relevantes se realizó a través de los resultados de los siguientes métodos y pruebas diagnósticas:

- ❖ Angiografía, tomografía computarizada craneal, ecocardiograma y electrocardiograma, para el diagnóstico de eventos cardiovasculares.
- ❖ Parámetros antropométricos (IMC, peso y masa muscular), para el diagnóstico de cambios en el estado nutricional o DEP de *novo*.
- ❖ Manifestaciones clínicas y pruebas de imagen complementarias (radiologías óseas simples, densitometría ósea), para el diagnóstico de alteraciones en el metabolismo óseo-mineral.

Rango de edad, años	30-80	Tratamientos Farmacológicos	
Mujeres, %	45	Antihipertensivos, %	34
Etiología de la ERCT^a		Hipolipemiantes, %	6
Nefropatía diabética, %	23	Sup. nutricionales, %	11
Riñón poliquístico, %	13	EPO ^g , %	36
Amiloidosis, %	4	Hierro, %	9
Nefrosclerosis, %	11	Calcio, %	28
No filiada, %	38	Vitamina D, %	21
Otras causas, %	11	Heparina, %	26
Tabaquismo, %	20	Insulina, %	12
Comorbilidades		Hemoglobina^f, mmol/L	9,0 (7,2-13,0)
Hipertensión, %	34	Glucosa^f, mg/dL	116 (56-371)
Dislipemia, %	15	GGT^{h,f}, U/L	22 (4-177)
ECV ^b , %	40	ALT^{i,f}, U/L	11 (3-32)
DEP ^c , %	11	AST^{i,f}, U/L	3 (0-23)
Anemia renal, %	34	Creatinina^f, mg/dL	7,4 (3,0-12,5)
HPT ^d secundario, %	25	Urea^f, mg/dL	124 (36-284)
IMC^{e,f}, kg/m²	25 (17-38)	Ácido úrico^f, mg/dL	5,7 (3,3-8,9)

Tabla 21. Características basales pre-diálisis de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal.

ERCT^a, enfermedad renal crónica terminal; ECV^b, enfermedad cardiovascular; DEP^c, desgaste proteico energético; HPT^d, hiperparatiroidismo; IMC^e, índice de masa corporal; ^f, los datos se muestran como mediana (rango); EPO^g, hormona eritropoyética; GGT^h, gamma-glutamilttransferasa; ALTⁱ, alanina aminotransferasa; ASTⁱ, aspartato aminotransferasa.

2. Diseño del Estudio

El protocolo establecido para la evaluación de la utilidad de los VRC en el seguimiento de pacientes con ERCT no estable, consta de los siguientes pasos:

- ❖ Para cada uno de los pacientes, se calculó el porcentaje de cambio de la concentración de todos los FBRCV incluidos en el estudio con respecto al valor basal, a los tres y seis meses de seguimiento.
- ❖ Estos porcentajes de cambio fueron comparados con los VRC estimados en pacientes con ERCT. En todos los casos se emplearon los VRC bidireccionales ($Z = 1,96$; 95% probabilidad), con la excepción de la us-TnT y las vitaminas 25-OH-vitamina D, B12 y folato, donde se utilizaron los VRC unidireccionales ($Z = 1,65$; 95% probabilidad).
- ❖ En aquellos casos en los que el porcentaje de cambio podía ser considerado como clínicamente significativo en función de los VRC, se evaluó si estas variaciones se correlacionaban con cambios en el estado clínico del paciente, a corto o medio plazo.
- ❖ El rendimiento diagnóstico de los VRC se estimó mediante el cálculo de los valores de sensibilidad (Se), especificidad (Sp), VPP y valor predictivo negativo (VPN).

Capítulo 9. Estudio Estadístico de los Datos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS versión 15.0 (SPSS Inc, Chicago IL; USA).

El test de Levene fue empleado para confirmar la homogeneidad de las varianzas, y la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de las distribuciones. En consecuencia, se aplicaron los test no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, o la prueba t de Student y el ANOVA para la comparación de las medias, según procediese. En todos los test empleados, se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

La estimación de los valores de Se, Sp, VPP y VPN, así como sus respectivos IC95%, se realizó mediante el programa estadístico EpiDat versión 3.1 (Xunta de Galicia, Organización Panamericana de la Salud).

La aplicación de las formulas para la obtención de los componentes de VB, y el cálculo de las especificaciones de calidad, el II y los VRC, se realizó en una hoja de cálculo Excel 2010 (Microsoft Corp, Redmond WA; USA).

Resultados

Capítulo 10. Datos de Variación Biológica

1. Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular Convencionales: Lípidos y Lipoproteínas Séricas

La variación de los resultados obtenidos para los lípidos y las lipoproteínas séricas en el estudio de VB realizado tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, se muestran en las **Figuras 19-22**. Las concentraciones de todos los lípidos y lipoproteínas séricas estudiadas seguían una distribución no gaussiana en ambos grupos de sujetos.

Como se puede observar en la **Figura 20**, la mediana de la concentración sérica de TG obtenida en uno de los individuos sanos (sujeto 7), fue significativamente mayor ($p < 0,05$) a la del resto de sujetos. Estos datos fueron identificados como valores aberrantes por el test de Reed, eliminándose del estudio de los componentes de VB tanto de los TG, como del c-LDL calculado por la fórmula de Friedwald.

La **Tabla 22** recoge los componentes de VB obtenidos para cada uno de los lípidos y lipoproteínas séricas, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT; así como la mediana y el rango, el CV_A intraserie, el ratio SD_A/SD_I y el número de datos disponibles tras la eliminación de valores aberrantes; siendo el porcentaje de datos eliminados inferior al 2%, y el ratio entre la V_A intraserie y VB_I inferior a 0,3 en todas las magnitudes estudiadas. En la **Tabla 23** se muestran los VRC calculados para ambos grupos de sujetos, junto con los II y las especificaciones de calidad analítica deseables derivadas de los datos de VB estimados en individuos sanos.

La mediana de la concentración sérica de TG y de c-VLDL observada en pacientes con ERCT fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la obtenida en individuos sanos; mientras que la concentración de c-HDL fue significativamente inferior. Sin embargo, de acuerdo con los IC95%, no se observaron diferencias significativas en los componentes de VB y, en consecuencia, la estimación de los VRC fueron semejantes en ambos grupos de sujetos.

Los VRC asimétricos (positivo y negativo) calculados a partir del método logarítmico, muestran valores consistentes con el VRC obtenido a partir del enfoque tradicional, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT.

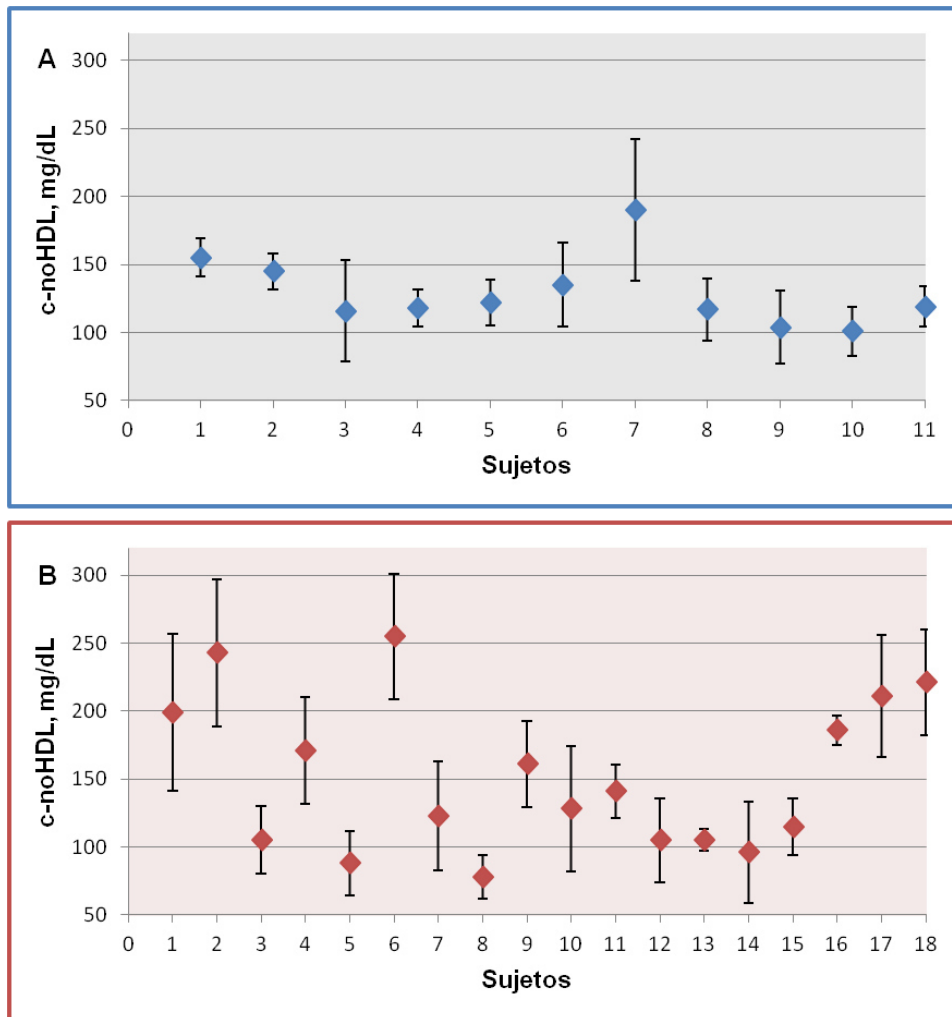


Figura 19. Concentraciones séricas de colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad (c-noHDL). Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

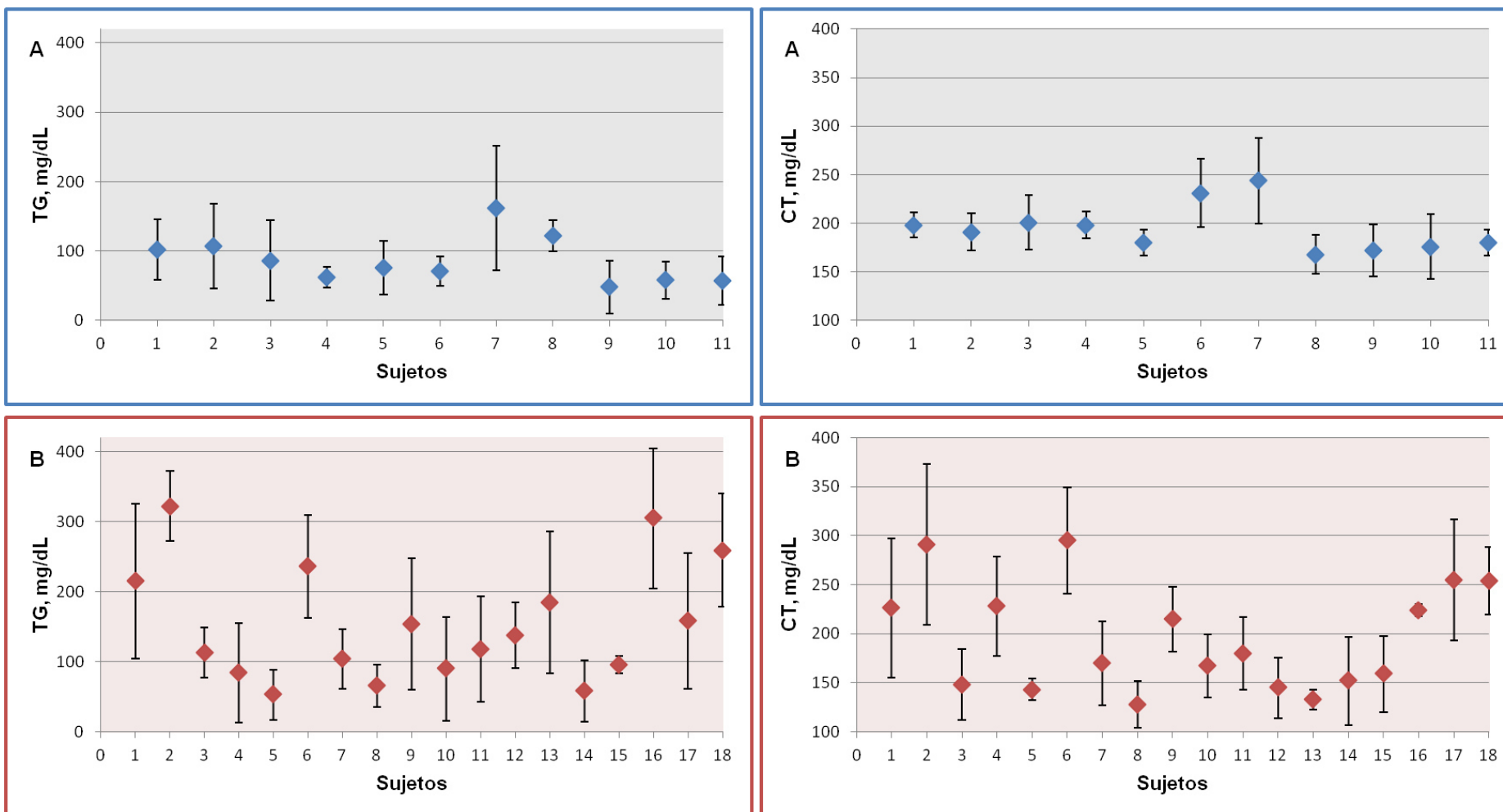


Figura 20. Concentraciones séricas de triglicéridos (TG) y colesterol total (CT). Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

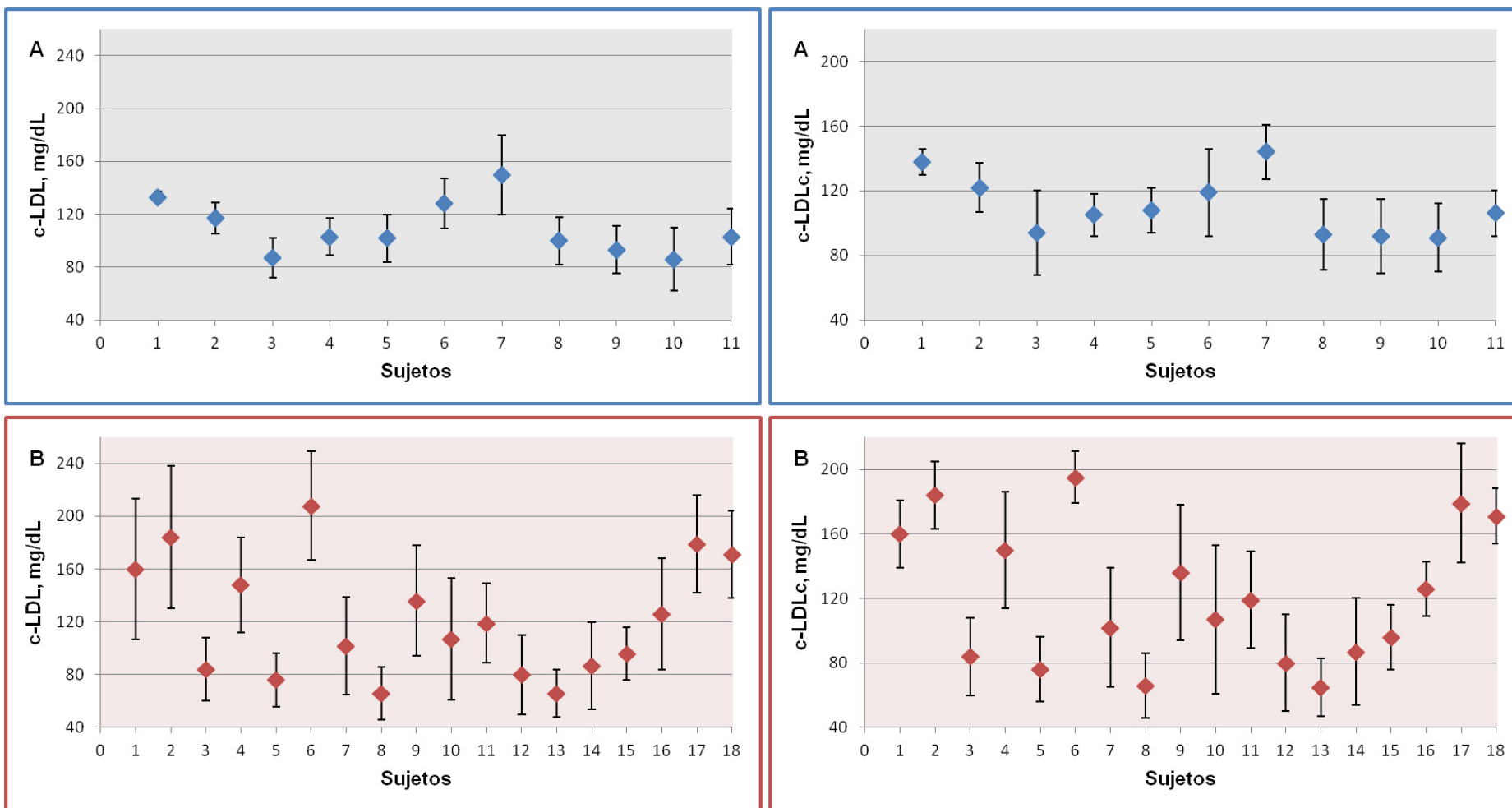


Figura 21. Concentraciones séricas de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) y c-LDL calculado por la fórmula de Friedwald (c-LDLc). Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

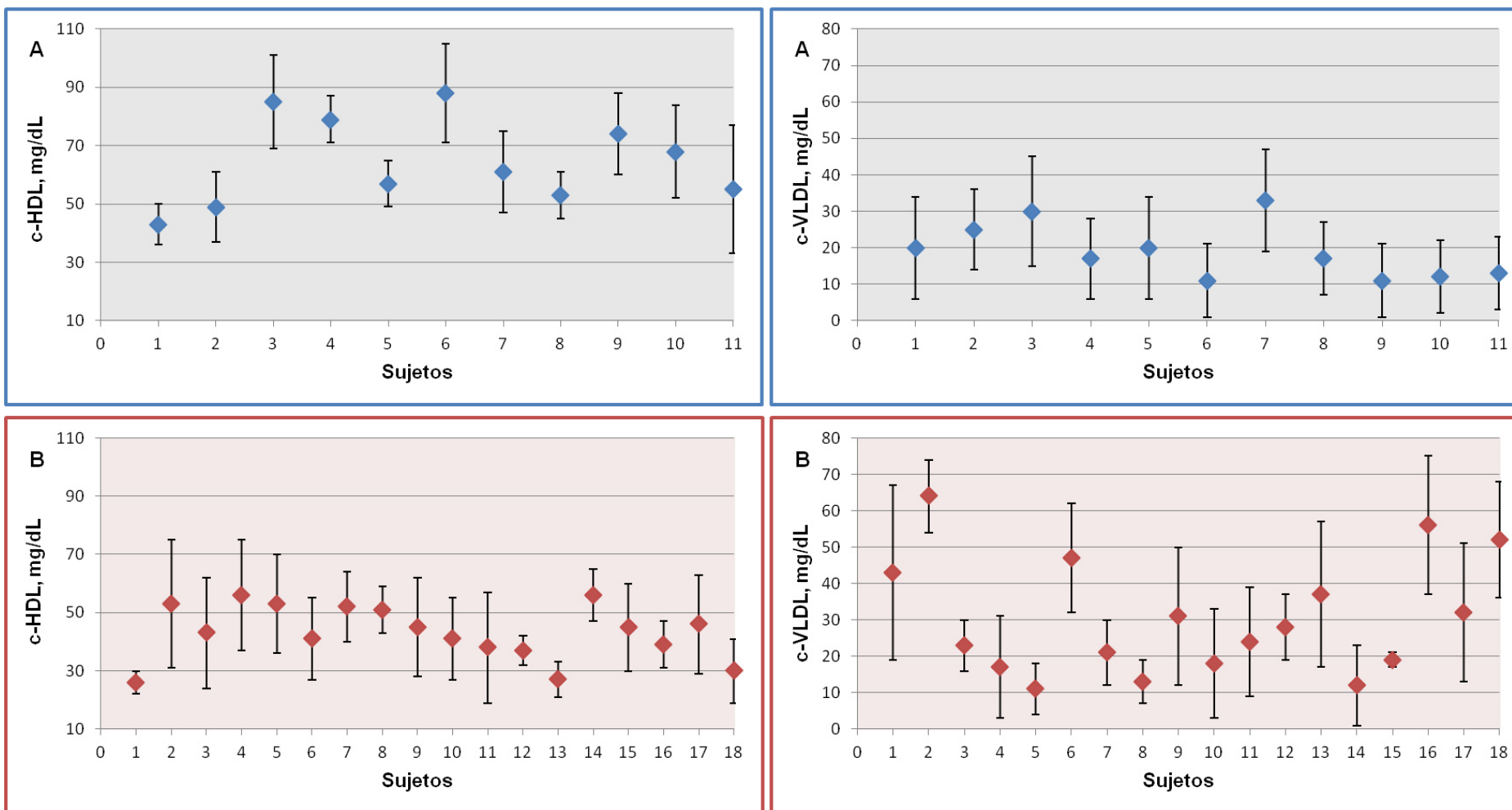


Figura 22. Concentraciones séricas de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad (c-VLDL). Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

	Individuos sanos							Pacientes con ERCT						
	N ^h	Mediana (IQR) ⁱ , mg/dL	Rango, mg/dL	CV _A ^j , %	CV _I ^k , % (IC95%) ^l	CV _G ^m , % (IC95%) ^l	R ⁿ	N ^h	Mediana (IQR) ⁱ , mg/dL	Rango, mg/dL	CV _A ^j , %	CV _I ^k , % (IC95%) ^l	CV _G ^m , % (IC95%) ^l	R ⁿ
TG^a	48	72(48)	39-137	1,8	24,7 (19,4-30,0)	58,4 (43,1-73,7)	0,07	98	123(94)*	34-339	2,5	20,3 (17,3-23,2)	74,2 (59,1-89,4)	0,12
CT^b	54	191(28)	156-276	1,5	5,4 (4,4-6,4)	28,9 (22,9-34,8)	0,28	97	176(84)	116-334	1,1	7,0 (6,0-7,9)	39,6 (33,2-45,9)	0,16
c-HDL^c	54	62(26)	37-96	1,4	9,4 (7,6-11,2)	51,4 (39,3-63,5)	0,15	98	44(15)*	21-74	2,6	11,4 (9,8-13,1)	51,56 (42,6-60,5)	0,23
c-LDL^d	53	106(32)	77-178	1,4	7,3 (5,9-8,8)	43,2 (33,4-52,9)	0,19	98	108(74)	55-212	1,9	9,8 (8,4-11,2)	53,6 (44,1-63,0)	0,19
c-LDLc^e	48	105(24)	77-141	2,5	7,0 (5,6-8,5)	36,4 (25,9-44,9)	0,36	97	107(48)	55-212	2,1	11,7 (8,3-13,6)	59,6 (44,0-70,8)	0,18
c-VLDL^f	48	14(10)	8-32	3,8	29,3 (22,9-35,8)	61,0 (44,7-77,2)	0,13	97	25(25)*	7-83	3,4	26,7 (22,6-30,7)	72,3 (57,7-86,9)	0,13
c-noHDL^g	54	124(31)	91-217	2,1	7,9 (6,4-9,5)	44,1 (34,2-54,0)	0,27	97	132(84)	71-273	1,6	7,5 (6,4-8,5)	66,3 (53,5-79,1)	0,21

Tabla 22. Datos de variación biológica obtenidos para los lípidos y las lipoproteínas séricas en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). TG^a, triglicéridos; CT^b, colesterol total; c-HDL^c, colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; c-LDL^d, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-LDLc^e, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad calculado mediante la fórmula de Friedwald [c-LDLc = CT - c-HDL - (TG/5)]; c-VLDL^f, colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad estimadas mediante la fórmula [c-VLDL = CT-c-LDL-c-HDL]; c-noHDL^g, colesterol no HDL calculado mediante la fórmula [c-noHDL = CT-c-HDL]; N^h, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)ⁱ, rango intercuartílico; CV_A^j, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^k, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^l, intervalo de confianza al 95%; CV_G^m, coeficiente de variación inter-individual; Rⁿ, SD_A/SD_I. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney.

	Individuos sanos							Pacientes con ERCT		
	II ^h	VRC ⁱ % (IC95%) ^j	VRC _{pos} ^k , % (IC95%) ^j	VRC _{neg} ^l , % (IC95%) ^j	I ^m , %	ES ⁿ , %	ET ^o , %	VRC ⁱ % (IC95%) ^j	VRC _{pos} ^k , % (IC95%) ^j	VRC _{neg} ^l , % (IC95%) ^j
TG^a	0,43	68,8 (49,4-88,1)	106,2 (67,5-144,9)	-51,5 (-38,6-64,4)	12,4	15,9	36,3	56,6 (46,4-66,8)	85,7 (66,8-104,6)	-46,2 (-38,4-54,0)
CT^b	0,19	15,5 (12,5-18,5)	20,9 (16,8-25,0)	-17,3 (-13,9-20,7)	2,7	7,3	11,8	19,5 (16,7-22,4)	25,0 (21,3-28,7)	-20,0 (-17,1-22,9)
c-HDL^c	0,18	26,3 (20,9-31,6)	34,8 (27,4-42,2)	-25,8 (-20,6-31,0)	4,7	13,1	20,8	32,5 (27,5-37,6)	47,2 (39,2-55,2)	-32,1 (-27,1-37,1)
c-LDL^d	0,17	20,7 (16,6-24,9)	27,4 (21,8-33,0)	-21,5 (-17,2-25,8)	3,7	11,0	17,0	27,7 (23,5-32,0)	38,2 (32,1-44,3)	-27,6 (-23,4-31,7)
c-LDLc^e	0,21	20,7 (16,3-25,0)	30,0 (23,4-36,6)	-23,1 (-18,2-28,0)	3,5	8,5	14,3	33,0 (24,8-38,1)	46,3 (38,5-54,1)	-31,6 (-26,7-36,5)
c-VLDL^f	0,48	81,5 (56,3-106,6)	132,3 (75,6-189,0)	-56,9 (-42,1-71,7)	14,7	17,0	41,1	74,5 (59,2-89,8)	125,3 (89,2-161,4)	-55,6 (-45,6-65,6)
c-noHDL^g	0,19	22,7 (18,2-27,3)	32,0 (25,3-38,7)	-24,3 (-19,4-25,9)	4,0	11,2	11,8	21,1 (18,0-24,2)	28,5 (24,2-32,8)	-22,2 (-18,9-25,5)

Tabla 23. Parámetros derivados de los datos de variación biológica obtenidos para los lípidos y las lipoproteínas séricas en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). TG^a, triglicéridos; CT^b, colesterol total; c-HDL^c, colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; c-LDL^d, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-LDLc^e, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad calculado mediante la fórmula de Friedwald [c-LDLc = CT - c-HDL - (TG/5)]; c-VLDL^f, colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad estimadas mediante la fórmula [c-VLDL = CT-c-LDL-c-HDL]; c-noHDL^g, colesterol no HDL calculado mediante la fórmula [c-noHDL = CT-c-HDL]; II^h, índice de individualidad; VRCⁱ, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); IC95%^j, intervalo de confianza al 95%; VRC_{pos}^k, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{neg}^l, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); I^m, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ESⁿ, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ET^o, especificaciones de calidad deseables para el error total.

2. Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular No Convencionales

2.1. Datos de Variación Biológica de la Proteína C Reactiva

La variación de los resultados de PCR sérica derivados del estudio de VB realizado en pacientes con ERCT clínicamente estable e individuos sanos, se muestra en la **Figura 23**. Los datos de concentración obtenidos en ambos grupos de sujetos presentaban una distribución no gaussiana.

La mediana de la concentración sérica de PCR obtenida en 9 de los individuos sanos fue menor al LD_1 (1,0 mg/L) del método de medida convencional, por lo que, para obtener una adecuada estimación de los datos de VB, la determinación de su concentración sérica se realizó mediante un método de alta sensibilidad. Por contra, 15 de los pacientes con ERCT presentaron una mediana de la concentración sérica de PCR superior a 1,0 mg/L.

Como se puede observar en la **Figura 23**, la mediana de la concentración sérica de uno de los individuos sanos (sujeto 2) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) a la del resto de sujetos. Estos datos fueron identificados como valores aberrantes por el test de Reed, eliminándose del estudio de los componentes de VB. Así mismo, en esta **Figura** se puede observar que, durante el periodo del estudio, dos de los pacientes con ERCT (sujetos 11 y 13) mostraron una variabilidad de la concentración sérica de PCR superior a la del resto de pacientes. El estudio de su historia clínica no reveló la presencia de infecciones, inflamación, neoplasias o traumatismos evidentes que justificasen las diferencias observadas.

La **Tabla 24** muestra los componentes de VB y los VRC estimados para la PCR sérica, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos; así como los II y las especificaciones de calidad analítica deseables derivadas de los datos de VB obtenidos en individuos sanos. Así mismo, en esta tabla se muestran la mediana y el rango, el CV_A intraserie, el número de datos disponible tras la eliminación de valores aberrantes y el ratio entre la V_A intraserie y VB_i , el cual fue inferior a 0,2. El porcentaje de datos eliminado fue inferior al 1%, distribuyéndose uniformemente entre los distintos sujetos.

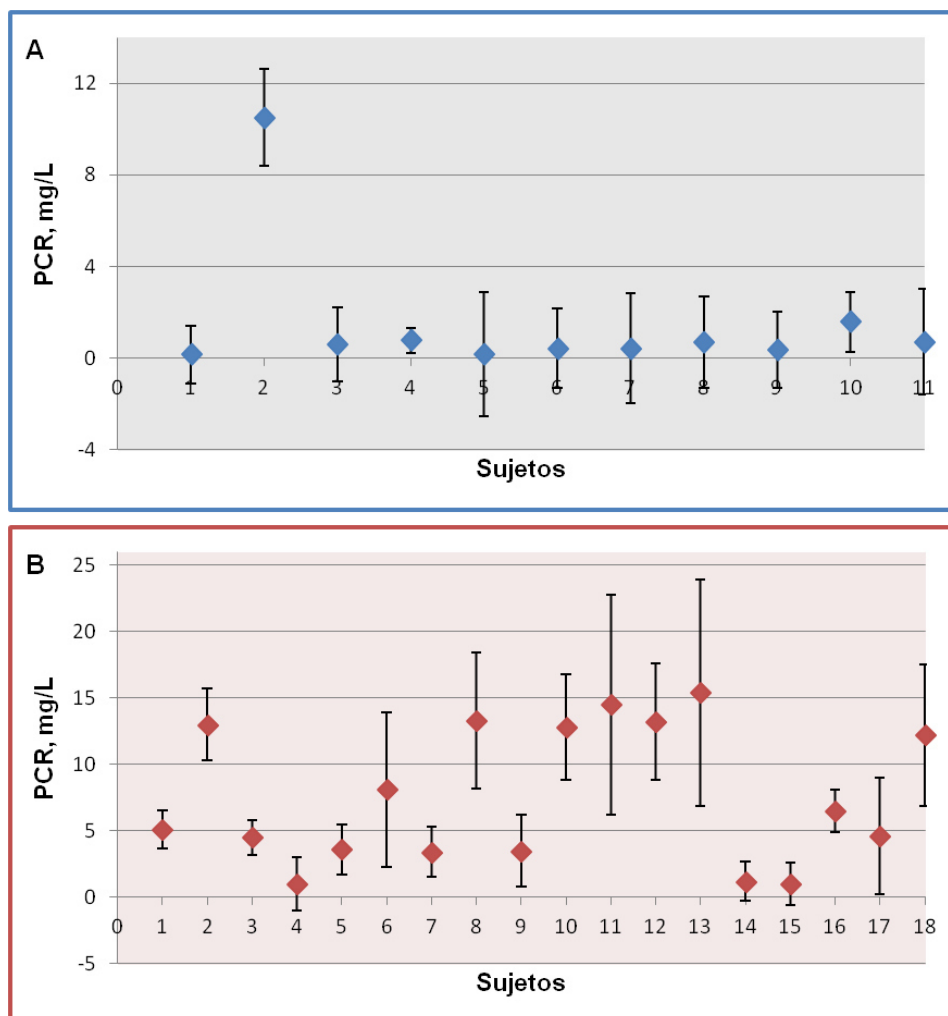


Figura 23. Concentraciones séricas de proteína C reactiva (PCR). Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses. Los datos presentados para individuos sanos fueron obtenidos mediante un método de alta sensibilidad.

Como es posible observar en la **Figura 23**, tanto los pacientes con ERCT como los individuos sanos, mostraron importantes variaciones en la concentración sérica de PCR durante el periodo de seguimiento; siendo la mediana y el rango intercuartílico (IQR) de las variaciones observadas en cada sujeto de 2,1 (1,9) mg/L para pacientes con ERCT, y de 1,7 (0,66) mg/L para individuos sanos. En consecuencia, los CV_I estimados en ambos grupos son relativamente amplios, así como los CV_G .

La mediana de la concentración sérica de PCR obtenida en pacientes con ERCT fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la observada en individuos sanos. Sin embargo, y de acuerdo a los IC95%, no se observaron diferencias significativas entre los

componentes de VB obtenidos para la PCR sérica en ambos grupos de sujetos, por lo que los VRC derivados de estos datos de VB son semejantes.

De acuerdo a lo esperado, los VRC positivo y negativo, calculados mediante la aproximación logarítmica fueron consistentes con los VRC obtenidos por el método convencional.

	Individuos sanos ^a	Pacientes con ERCT
	PCR, mg/L	PCR, mg/L
N^b	49	94
Mediana (IQR)^c	0,6 (0,5)	5,0 (4,3)*
Rango	0,2-2,4	1,0-25,6
CV_A^d, %	2,0	4,5
CV_I^e, % (IC95%)^f	45,5 (34,5-56,4)	48,9 (40,6-57,2)
CV_G^g, % (IC95%)^f	88,6 (59,9-117,3)	120,2 (86,7-140,6)
II^h	0,51	---
VRCⁱ, % (IC95%)^f	126,1 (84,0-178,3)	136,1 (94,8-177,4)
VRC_{pos}^j, % (IC95%)^f	248,6 (64,9-432,3)	304,5 (116,0-493,0)
VRC_{neg}^k, % (IC95%)^f	-71,3 (-51,8-94,3)	-75,3 (-59,9-90,7)
I^l, %	22,7	---
ES^m, %	24,9	---
ETⁿ, %	62,4	---
SD_A/SD_I	0,16	0,14

Tabla 24. Datos de variación biológica y parámetros derivados para la proteína C reactiva sérica (PCR) en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). ^aLos datos presentados para individuos sanos fueron obtenidos mediante un método de alta sensibilidad. [(---), datos no calculados]; N^b, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^c, rango intercuartílico; CV_A^d, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^e, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^f, intervalo de confianza al 95%; CV_G^g, coeficiente de variación inter-individual. II^h, índice de individualidad; VRCⁱ, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{pos}^j, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{neg}^k, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); I^l, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^m, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ETⁿ, especificaciones de calidad deseables para el error total. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney.

2.2. Datos de Variación Biológica de la Troponina T

En la **Figura 24** se muestra la variación de los resultados obtenidos para la us-TnT tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos. Los datos de concentración observados en ambos grupos de sujetos seguían una distribución que no se ajustaba a la normal.

Las concentraciones séricas de us-TnT obtenidas en todos los sujetos, ya fueran individuos sanos o pacientes con ERCT, fueron superiores al LB del método de determinación (3 ng/L), con la única excepción de una muestra de un individuo sano, la cual fue identificada como un valor aberrante por el test de Cochran y eliminada del estudio.

Cuatro de los pacientes con ERCT (sujetos 2, 8, 10 y 18) presentaban una concentración sérica de us-TnT significativamente más alta que el resto de pacientes ($p < 0,05$). Ninguno de estos sujetos tenía antecedentes clínicos de HTA, aterosclerosis o hallazgos ecocardiográficos sugerentes de ECV; no observándose, además, diferencias notables en el IMC, la mediana de la concentración de PCR, el tratamiento farmacológico o la etiología de la ERC. Dos de los sujetos, sin embargo, presentaban una mediana de la concentración sérica de TG, CT o c-LDL, ligeramente superior a la del resto de pacientes durante el periodo del estudio (45%, 30% y 30%, respectivamente).

En la **Tabla 25** se recogen los componentes de VB obtenidos para la us-TnT en pacientes con ERCT y en individuos sanos; así como la mediana y el rango, el CV_A intraserie, el ratio SD_A/SD_I y el número de datos disponible tras la eliminación de valores aberrantes; siendo el porcentaje de datos eliminado inferior al 2%, y el ratio entre la V_A intraserie y VB_I inferior a 1. Así mismo, en la **Tabla 25** se muestran el II y las especificaciones de calidad deseables derivados de los datos de VB obtenidos en individuos sanos; y los VRC bidireccionales ($Z = 1,96$; 95% probabilidad) y unidireccionales ($Z = 1,65$; 95% probabilidad) calculados para ambos grupos de sujetos.

Como es posible observar en la **Figura 24**, tanto los pacientes con ERCT como los individuos sanos incluidos en el estudio mostraron cambios moderados en la concentración de us-TnT durante el periodo de seguimiento; siendo la mediana (IQR) del rango de concentraciones medidas en cada uno de los sujetos, de 13,2 (11,5) ng/L, y 1,5 (0,3) ng/L, respectivamente.

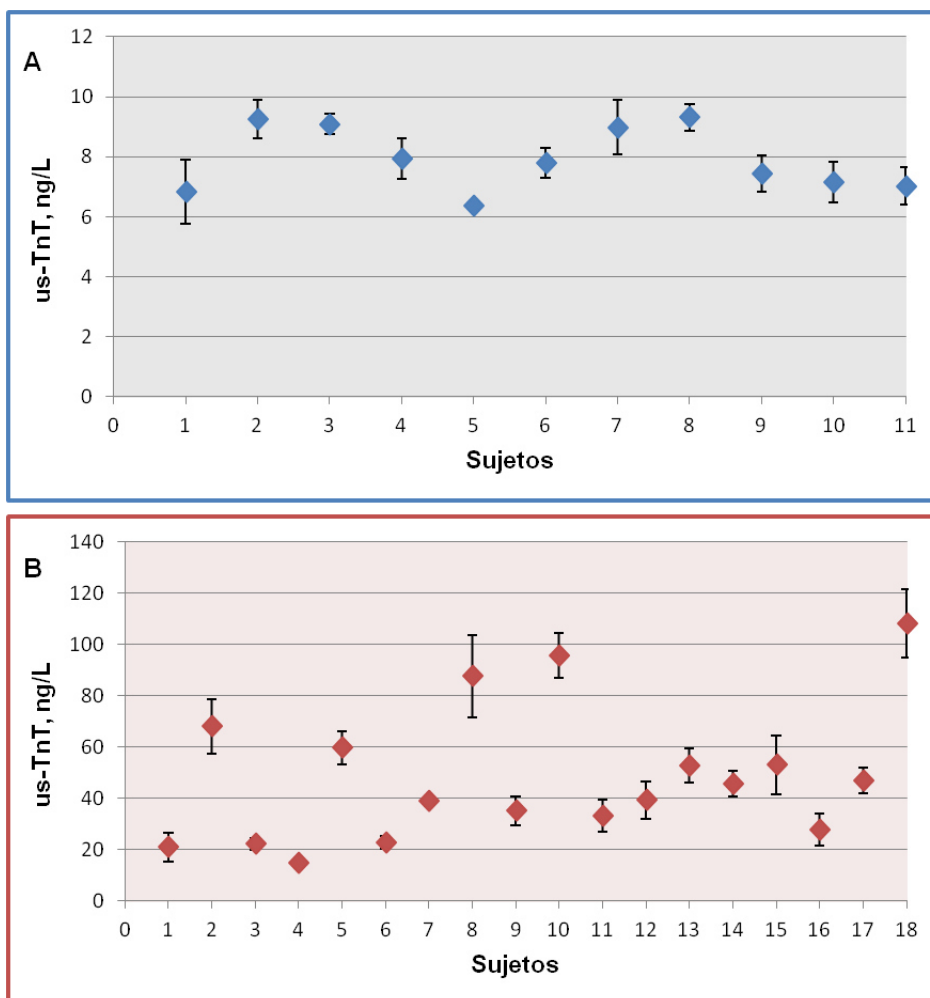


Figura 24. Concentraciones plasmáticas de troponina T ultrasensible (us-TnT). Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

La mediana de la concentración de us-TnT observada en pacientes con ERCT fue significativamente mayor que la obtenida para individuos sanos, así como los componentes de VB, de acuerdo a los IC95%. A consecuencia de las diferencias observadas entre los CV_i de ambos grupos de sujetos, los VRC estimados para pacientes con ERCT fueron más del doble que los calculados para individuos sanos. Los VRC asimétricos (positivo y negativo), tanto bidireccionales como unidireccionales, calculados mediante el método logarítmico fueron consistentes con los VRC estimados mediante la aproximación convencional.

	Individuos sanos	Pacientes con ERCT
	us-TnT, ng/L	us-TnT, ng/L
N^a	53	94
Mediana (IQR)^b	7,8 (2,0)	43,2 (33,5) [*]
Rango	4,6-10,2	11,6-123,3
CV_A^c, %	5,1	6,0
CV_I^d, % (IC95%)^e	5,9 (4,8-7,0)	14,7 (12,6-16,9) [*]
CV_G^f, % (IC95%)^e	30,4 (24,0-36,7)	77,8 (61,2-94,4) [*]
II^g	0,26	---
VRC bidireccional^h, % (IC95%)^e	21,6 (17,2-25,9)	44,1 (36,6-51,5) [*]
^{1,96}VRC_{pos}ⁱ, % (IC95%)^e	35,5 (27,9-43,1)	76,6 (60,4-92,8) [*]
^{1,96}VRC_{neg}^j, % (IC95%)^e	-26,2 -(20,8-31,6)	-43,4 -(36,1-50,7) [*]
VRC unidireccional^k, % (IC95%)^e	18,2 (14,6-21,8)	37,1 (31,1-43,1) [*]
^{1,65}VRC_{pos}ⁱ, % (IC95%)^e	29,1 (23,1-35,1)	61,4 (49,7-73,1) [*]
^{1,65}VRC_{neg}^j, % (IC95%)^e	-22,5 -(18,0-27,0)	-38,1 -(31,9-44,3) [*]
I^l, %	3,0	---
ES^m, %	7,7	---
ETⁿ, %	12,6	---
SD_A/SD_I	0,94	0,98

Tabla 25. Datos de variación biológica y parámetros derivados para la troponina T ultrasensible (us-TnT) sérica en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). [(- -), datos no calculados]; N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV_A^c, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^d, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^e, intervalo de confianza al 95%; CV_G^f, coeficiente de variación inter-individual. II^g, índice de individualidad; VRC^h, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{pos}ⁱ, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica; VRC_{neg}^j, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica; VRC^k, valor de referencia del cambio unidireccional (z=1,65, 95% de probabilidad); I^l, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^m, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ETⁿ, especificaciones de calidad deseables para el error total; ^{*}, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney. ^x, diferencias significativas según los IC95%.

3. Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular Específicos de la Uremia

3.1. Marcadores Bioquímicos del Desgaste Proteico Energético

3.1.1. Datos de Variación Biológica de la Albúmina y la Transferrina

La variación de los resultados obtenidos para la albúmina y la transferrina séricas tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, se muestra en la **Figura 25**. Los datos de concentración de albúmina y transferrina séricas presentaban una distribución gaussiana en ambos grupos de sujetos.

La concentración media de albúmina sérica obtenida en 16 de los pacientes con ERCT clínicamente estable se encontraba dentro del IR definido para la población general (3,5-5,2 g/dL). Por contra, la concentración media de transferrina sérica observada en 15 de los pacientes fue menor al límite inferior del IR (200 mg/dL). En individuos sanos, las concentraciones de albúmina y transferrina séricas obtenidas durante el periodo de seguimiento se encontraban dentro de los IR poblacionales.

La **Tabla 26** muestra los datos de VB, los VRC bidireccionales ($Z=1,96$; 95% probabilidad) obtenidos para la albúmina y la transferrina séricas y los VRC unidireccionales calculados para la albúmina ($Z=1,65$; 95% probabilidad), tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos; así como los II y las especificaciones de calidad deseables derivados de los datos de VB estimados en estos últimos. Así mismo, en esta tabla se recogen la media y el rango, el CV_A intraserie, el ratio SD_A/SD_I y el número de datos disponibles tras la eliminación de valores aberrantes. El porcentaje de datos eliminado para la albúmina fue inferior al 4%, distribuyéndose uniformemente entre los sujetos; mientras que para la transferrina sérica no se identificó ningún valor aberrante. El ratio entre la V_A intraserie y VB_I fue inferior a 0,6 para ambas magnitudes, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos.

Como puede observarse en la **Figura 25**, los pacientes con ERCT y los individuos sanos mostraron una moderada variabilidad en la concentración sérica de albúmina y transferrina durante el periodo de seguimiento, siendo la media y la desviación estándar (DS) del rango de concentraciones de cada sujeto de 0,51 (0,2) y 0,27 (0,1) g/dL para la albúmina, y 34 (12) y 24 (9) mg/dL para la transferrina, respectivamente.

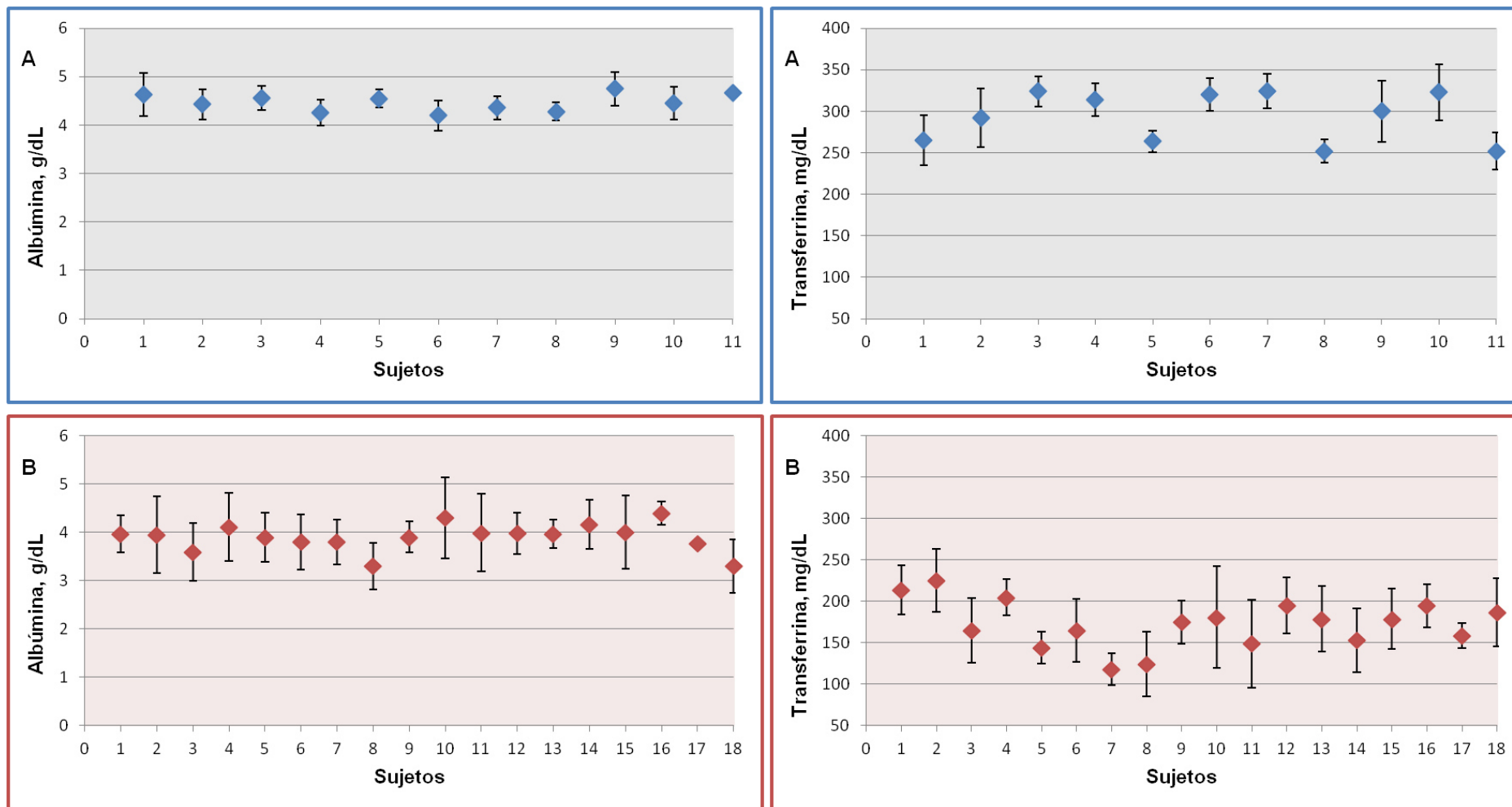


Figura 25. Concentraciones séricas de albúmina y transferrina. Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

Durante el periodo de seguimiento, los pacientes con ERCT presentaron una concentración media de albúmina y transferrina séricas significativamente menor a la observada en individuos sanos ($p < 0,05$). Sin embargo, y de acuerdo a los IC95%, no se observaron diferencias significativas entre los CV_I obtenidos en ambos grupos de sujetos. Por el contrario, tanto los CV_G como los VRC estimados para ambas magnitudes fueron significativamente más altos en pacientes con ERCT que en individuos sanos.

	Individuos sanos		Pacientes con ERCT	
	Albúmina	Transferrina	Albúmina	Transferrina
N^a	52	52	96	99
Media (DS)^b, mg/dl	4,5 (0,2)	300 (45)	3,9 (0,4) ⁺	172 (32) ⁺
Rango, mg/dL	4,0-4,9	230-349	3,5-4,9	105-244
CV_A^c, %	2,0	1,9	2,1	2,5
CV_I^d,% (IC95%)^e	3,7 (2,9-4,4)	3,8 (3,1-4,6)	5,6 (4,3-6,4)	5,5 (4,2-6,2)
CV_G^f,% (IC95%)^e	6,4 (5,1-7,7)	7,9 (6,3-9,5)	14,7 (12,5-16,8) ^x	16,7 (14,3-19,0) ^x
II^g	0,58	0,49	---	---
VRC BD^h,% (IC95%)^e	11,6 (9,3-14,7)	11,9 (9,5-14,2)	18,0 (15,0-20,6) ^x	16,7 (14,3-19,0) ^x
VRC UDⁱ,% (IC95%)^e	9,8 (7,8-11,8)	---	15,2(13,0-17,3) ^x	---
I^j,%	1,8	1,9	---	---
ES^k,%	1,9	2,2	---	---
ET^l,%	5,0	5,4	---	---
SD_A/SD_I	0,55	0,49	0,55	0,45

Tabla 26. Datos de variación biológica y parámetros derivados para la albúmina y la transferrina sérica en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal. [(----), datos no calculados]; N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV_A^c, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^d, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^e, intervalo de confianza al 95%; CV_G^f, coeficiente de variación inter-individual. II^g, índice de individualidad; VRC BD^h, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC UDⁱ, valor de referencia del cambio unidireccional (Z=1,65, 95% probabilidad); I^j, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^k, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ET^l, especificaciones de calidad deseables para el error total. ⁺, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) según la prueba t de Student. ^x, diferencias significativas según los IC95%.

3.1.2. Datos de Variación Biológica de los Aminoácidos Libres Plasmáticos

Para la estimación de los datos de VB del perfil de aminoácidos libres plasmáticos en pacientes con ERCT, debido al elevado tiempo requerido por determinación (65 min/muestra), no era posible el estudio de todas las muestras en una única serie analítica. Por lo tanto, y con el fin de mantener el diseño experimental aplicado para el resto de magnitudes bioquímicas, se analizaron únicamente las muestras procedentes de 11 pacientes seleccionados aleatoriamente (7 mujeres, 4 hombres; rango de edad 34-75 años); siendo éste el número máximo de muestras abarcable en cuanto a carga analítica.

En ambos grupos de sujetos, las concentraciones observadas para los aminoácidos libres plasmáticos seguían una distribución gaussiana, con la excepción de ácido α -aminobutírico, asparragina, citrulina, fenilalanina, hidroxiprolina, metionina, prolina, taurina y tiroxina, para los cuales la distribución observada no se ajustaba a la normal.

Las **Tablas 27 y 28-29**, recogen los componentes de VB estimados para los aminoácidos libres plasmáticos esenciales y no esenciales, respectivamente, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos. Así mismo, en estas tablas se muestran la mediana y el rango de concentraciones plasmáticas observadas durante el periodo de seguimiento, el CV_A intraserie, el ratio SD_A/SD_I , y el número de datos disponibles tras la eliminación de los valores aberrantes. El porcentaje de datos eliminado fue inferior al 10%, distribuyéndose uniformemente entre los sujetos y las muestras; y el ratio entre la V_A intraserie y VB_I fue inferior a 0,7 para todos los aminoácidos libres plasmáticos, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos.

En las **Tablas 30-32**, se muestran los VRC calculados para los aminoácidos libres plasmáticos en pacientes con ERCT e individuos sanos; así como los II y las especificaciones de calidad deseables derivadas de los datos de VB estimados en estos últimos.

Los valores obtenidos para los aminoácidos libres plasmáticos durante el periodo de seguimiento en todos los individuos sanos, se encontraban dentro de los IR poblacionales. En pacientes con ERCT, las concentraciones observadas para el perfil de aminoácidos fueron, en general, superiores a las encontradas en individuos sanos; observándose un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la

concentración plasmática de histidina, fenilalanina, glicina, lisina, isoleucina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutámico, hidroxiprolina, prolina, taurina, triptófano y ornitina, así como en la concentración global tanto de aminoácidos libres esenciales como de no esenciales. La mediana de la concentración de alanina y tirosina, por el contrario, fue significativamente inferior en pacientes con ERCT que en individuos sanos; mientras que el ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales fue similar en ambos grupos. Sin embargo, y de acuerdo a los IC95%, no se observaron diferencias significativas entre los datos de VB estimados en pacientes con ERCT e individuos sanos y, por lo tanto, los VRC obtenidos en ambos grupos de sujetos son equivalentes.

En la **Figura 26** se muestra, como ejemplo, la variación de los resultados obtenidos para los aminoácidos esenciales y no esenciales totales, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT.

Aminoácidos Esenciales	Individuos sanos						Pacientes con ERCT							
	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV _A ^c , %	CV _I ^d , % (IC95%) ^e	CV _G ^f , % (IC95%) ^e	R ^g	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV _A ^c , %	CV _I ^d , % (IC95%) ^e	CV _G ^f , % (IC95%) ^e	R ^g
His	53	63,0 (11,5)	40,6-81,5	5,5	9,7 (7,8-11,6)	27,2 (21,6-32,8)	0,54	58	93,0 (24,9) ⁺	46,7-125,2	6,6	9,0 (7,2-10,6)	35,4 (28,0-42,8)	0,69
Ile	53	44,8 (18,0)	27,6-79,4	6,5	15,3 (12,3-18,3)	45,5 (35,1-55,9)	0,41	59	70,1 (27,6) ⁺	31,0-134,7	6,0	19,1 (15,5-22,8)	58,0 (44,1-71,9)	0,32
Leu	53	135,1 (48,8)	85,7-248,4	6,5	14,5 (11,7-17,3)	44,0 (34,0-54,0)	0,43	57	137,0 (52,5)	66,9-261,9	4,4	16,7 (13,5-19,9)	60,1 (45,3-75,0)	0,27
Lys	53	164,0 (50,6)	102,7-231,0	4,0	11,5 (9,3-13,7)	38,2 (29,9-46,5)	0,33	58	180,1 (56,4) ⁺	96,4-297,1	3,7	13,6 (11,0-16,2)	50,5 (38,9-62,0)	0,29
Met^{NG}	53	27,9 (9,2)	12,2-42,7	3,6	14,7 (11,8-17,6)	43,4 (33,6-53,2)	0,25	58	27,7 (9,4)	13,5-51,8	4,0	13,8 (11,1-16,4)	68,3 (50,5-86,0)	0,30
Phe^{NG}	52	61,6 (19,3)	38,7-96,1	5,9	9,5 (7,6-11,4)	40,6 (31,5-49,7)	0,62	58	77,1 (33,6) [*]	40,5-125,2	6,0	10,6 (8,6-12,7)	64,7 (48,3-81,0)	0,61
Thr	54	141,5 (37,2)	82,3-127,5	5,4	17,5 (14,1-20,9)	33,1 (26,1-40,1)	0,29	59	134,1 (27,9)	65,9-175,3	4,1	15,0 (12,2-18,0)	41,0 (32,2-49,8)	0,27
Trp	52	17,7 (26,1)	7,9-81,9	10,7	22,7 (18,1-27,3)	108,4 (66,8-146,9)	0,45	57	26,2 (7,3) ⁺	12,5-42,7	5,0	11,5 (9,3-13,7)	53,7 (41,0-69,6)	0,49
Val	51	219,4 (71,8)	128,1-324,9	6,4	9,8 (7,9-11,7)	40,1 (31,1-49,1)	0,65	57	210,1 (79,3)	117,6-343,8	6,7	11,6 (9,4-13,8)	38,8 (30,4-47,1)	0,57
AAE^h	53	901,9 (165,5)	578-1376	3,7	10,7 (8,6-12,7)	35,5 (27,9-43,1)	0,34	56	985,6 ⁺ (205,2)	588-1517	3,5	10,0 (7,9-11,9)	32,5 (25,4-39,6)	0,35

Tabla 27. Datos de variación biológica obtenidos para los aminoácidos libres plasmáticos esenciales en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV_A^c, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^d, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^e, intervalo de confianza al 95%; CV_G^f, coeficiente de variación inter-individual; R^g, SD_A/SD_I. ^{NG}, los datos obtenidos no siguen una distribución gaussiana; AAE^h, aminoácidos esenciales totales * , diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney; + , diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según la prueba t de Student.

Aminoácidos No Esenciales	Individuos sanos							Pacientes con ERCT						
	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV _A ^c , %	CV _I ^d , % (IC95%) ^e	CV _G ^f , % (IC95%) ^e	R ^g	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV _A ^c , %	CV _I ^d , % (IC95%) ^e	CV _G ^f , % (IC95%) ^e	R ^g
Ala	54	380,0 (206,4)	215,8-597,7	2,7	14,7 (11,8-17,6)	55,8 (42,3-69,3)	0,31	58	308,7* (84,8)	195,0-546,2	4,1	10,0 (8,1-12,9)	46,5 (36,1-57,0)	0,42
Arg	51	62,9 (27,3)	45,3-130,1	3,0	19,3 (15,4-23,2)	34,1 (26,7-41,5)	0,16	59	93,0* (36,0)	53,8-162,2	2,7	19,2 (15,6-22,9)	51,2 (39,5-63,0)	0,16
Asn	54	128,1 (32,5)	85,6-177,4	3,1	12,3 (9,9-14,7)	28,0 (22,3-33,7)	0,25	58	109,3 (26,3)	56,6-147,8	2,4	13,8 (11,1-16,4)	39,5 (31,0-48,0)	0,16
Asp^{NG}	50	2,8 (1,6)	0,8- 5,3	8,3	31,2 (24,4-38,0)	55,1 (41,3-68,9)	0,25	59	15,0* (9,9)	5,2-29,8	9,6	23,3 (18,7-27,8)	85,2 (60,4-109,9)	0,38
Glu	47	50,7 (25,1)	25,1-95,6	2,6	25,0 (20,1-30,0)	49,3 (38,2-60,4)	0,16	59	88,0* (37,4)	46,8-137,9	3,4	19,7 (15,9-23,5)	50,2 (38,8-61,7)	0,20
Gln	52	551,0 (121,3)	350,2-676,6	2,1	12,1 (9,7-14,5)	22,0 (17,5-26,5)	0,18	58	570,2 (102,6)	389,7-825,3	3,6	10,1 (8,2-12,0)	30,5 (24,2-36,7)	0,32
Gly	54	211,3 (53,8)	117,9-338,9	1,4	11,8 (9,5-14,1)	40,3 (31,5-49,1)	0,12	57	231,3* (71,1)	132,0-358,8	2,1	13,5 (10,9-16,1)	45,3 (35,1-55,4)	0,15
Pro^{NG}	52	210,1 (149,8)	137,3-620,2	1,5	17,0 (13,6-20,4)	104,4 (68,3-140,5)	0,10	59	399,2* (125,1)	224,8-735,1	1,8	14,0 (11,3-16,6)	58,8 (44,7-73,0)	0,13
Ser	52	113,2 (30,1)	56,1-158,0	2,3	12,8 (10,3-15,3)	42,8 (33,1-52,5)	0,17	57	112,2 (24,3)	60,4-134,4	2,3	11,8 (9,6-14,1)	38,2 (30,0-46,3)	0,19
Tyr^{NG}	52	67,0 (32,4)	40,4-81,9	3,9	10,5 (8,4-12,6)	61,0 (45,4-76,6)	0,35	57	62,3* (17,9)	32,0-116,2	4,6	13,5 (10,9-16,1)	63,1 (47,1-79,0)	0,32

Tabla 28. Datos de variación biológica obtenidos para los aminoácidos libres plasmáticos no esenciales proteinogénicos en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV_A^c, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^d, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^e, intervalo de confianza al 95%; CV_G^f, coeficiente de variación inter-individual; R^g, SD_A/SD_I.^{NG}, los datos obtenidos no siguen una distribución gaussiana. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney; +, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según la prueba t de Student.

Aminoácidos	Individuos sanos							Pacientes con ERCT							
	No Esenciales	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV _A ^c , %	CV _I ^d , % (IC95%) ^e	CV _G ^f , % (IC95%) ^e	R ^g	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV _A ^c , %	CV _I ^d , % (IC95%) ^e	CV _G ^f , % (IC95%) ^e	R ^g
Aab ^{NG}		52	21,6 (206,4)	9,2-33,2	9,3	24,7 (19,6-29,8)	32,3 (25,4-39,2)	0,38	57	22,9 (11,6)	10,5-40,9	9,0	19,2 (15,4-23,0)	49,2 (37,9-60,5)	0,46
Cit ^{NG}		52	61,8 (20,3)	11,7-84,5	6,4	20,1 (16,1-24,1)	42,2 (32,7-51,8)	0,34	56	160,8 (37,2) ⁺	121,6-201,9	7,0	22,8 (18,2-27,5)	56,2 (42,3-70,1)	0,31
2Cys		53	20,0 (12,7)	5,5-44,1	13,3	38,3 (29,9-46,7)	48,5 (37,2-59,8)	0,33	59	40,3 (17,5) ⁺	13,4-79,7	13,5	31,1 (24,8-37,5)	50,5 (39,0-62,0)	0,43
Hyp ^{NG}		49	11,3 (5,4)	0,8-28,6	4,3	34,5 (26,8-42,2)	56,7 (42,2-71,2)	0,13	57	37,4 (21,3) [*]	15,6-84,7	5,2	24,4 (19,5-29,4)	87,6 (61,1-114,1)	0,28
Orn		53	46,5 (20,8)	25,5-99,9	4,4	18,4 (14,7-22,1)	54,9 (41,5-68,3)	0,24	57	89,1 (32,1) [*]	46,3-148,7	3,4	19,4 (15,6-23,2)	51,3 (39,4-63,3)	0,15
Tau ^{NG}		53	55,6 (35,1)	32,2-120,9	3,5	30,6 (24,2-37,0)	44,0 (34,0-54,0)	0,12	57	87,6 (33,2) [*]	31,8-183,6	4,2	23,7 (19,0-28,4)	75,6 (52,7-96,5)	0,19
AANE ^h		52	2074,8 (379,5)	1441-2795	3,3	13,5 (10,9-16,1)	30,5 (24,2-36,9)	0,26	56	2238,8 ⁺ (281,6)	1622-2780	3,1	12,8 (10,3-15,3)	36,9 (28,8-45,0)	0,26
AAE/AANE ⁱ		52	0,44 (0,06)	0,36-0,60	3,0	9,8 (7,9-11,7)	23,8 (19,0-28,6)	0,34	56	0,42 (0,07)	0,31-0,62	2,9	10,3 (8,3-12,4)	27,1 (21,4-32,9)	0,35

Tabla 29. Datos de variación biológica obtenidos para los aminoácidos libres plasmáticos no esenciales no proteínogénicos en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT): ácido α-aminobutírico (Aab), citrulina (Cit), cistina (2Cys), hidroxiprolina (Hyp), ornitina (Orn), taurina (Tau). N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV_A^c, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^d, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^e, intervalo de confianza al 95%; CV_G^f, coeficiente de variación inter-individual; R^g, SD_A/SD_I; AANE^h, aminoácidos no esenciales totales; AAE/AANEⁱ, ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales. ^{NG}, los datos obtenidos no siguen una distribución gaussiana. ^{*}, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney; ⁺, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según la prueba t de Student.

Aminoácidos Esenciales	Individuos sanos							Pacientes con ERCT		
	II ^a	VRC ^b , % (IC95%) ^c	VRC _{pos} ^d , % (IC95%) ^c	VRC _{neg} ^e , % (IC95%) ^c	I ^f , %	ES ^g , %	ET ^h , %	VRC ^b , % (IC95%) ^c	VRC _{pos} ^d , % (IC95%) ^c	VRC _{neg} ^e , % (IC95%) ^c
His	0,41	36,2 (25,1-36,7)	----	----	4,9	7,2	15,2	30,8 (25,0-36,5)	----	----
Ile	0,37	46,0 (37,5-54,6)	----	----	7,6	12,0	24,6	55,6 (45,3-65,9)	----	----
Leu	0,36	44,1 (35,7-52,4)	----	----	7,3	11,6	23,6	47,9 (38,8-56,9)	----	----
Lys	0,32	33,7 (27,4-40,1)	----	----	5,7	10,0	19,4	39,0 (31,7-46,3)	----	----
Met ^{NG}	0,35	41,9 (34,1-49,8)	65,4 (48,1-82,7)	-39,5 (-30,7-48,3)	7,3	11,5	23,6	43,0 (34,9-51,0)	77,0 (54,9-99,1)	-43,5 (-33,6-53,4)
Phe ^{NG}	0,27	30,9 (25,2-36,8)	57,9 (43,4-72,4)	-36,7 (-28,7-44,7)	4,7	10,4	18,2	33,9 (27,5-40,2)	86,4 (58,4-108,4)	-46,3 (-35,6-57,0)
Thr	0,55	50,7 (41,4-60,2)	----	----	8,7	9,4	23,8	43,2 (35,2-51,2)	----	----
Trp	0,22	69,6 (56,4-82,7)	----	----	11,4	27,7	46,4	34,7 (28,2-41,3)	----	----
Val	0,29	32,4 (26,3-38,6)	----	----	4,9	10,3	18,4	37,1 (30,1-44,1)	----	----
AAE ⁱ	0,31	30,1 (24,3-35,8)	----	----	5,3	9,3	18,1	28,0 (22,5-33,6)	----	----

Tabla 30. Parámetros derivados de los datos de variación biológica obtenidos para los aminoácidos libres plasmáticos esenciales en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). II^a, índice de individualidad; VRC^b, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); IC95%^c, intervalo de confianza al 95%; VRC_{pos}^d, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{neg}^e, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); I^f, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^g, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ET^h, especificaciones de calidad deseables para el error total; AAEⁱ, aminoácidos esenciales totales. ^{NG}, los datos obtenidos no siguen una distribución gaussiana.

Aminoácidos No Esenciales	Individuos sanos							Pacientes con ERCT		
	II ^a	VRC ^b , % (IC95%) ^c	VRC _{pos} ^d , % (IC95%) ^c	VRC _{neg} ^e , % (IC95%) ^c	I ^f , %	ES ^g , %	ET ^h , %	VRC ^b , % (IC95%) ^c	VRC _{pos} ^d , % (IC95%) ^c	VRC _{neg} ^e , % (IC95%) ^c
Ala	0,26	41,3 (33,7-49,2)	----	----	7,3	14,4	26,5	32,5 (26,4-38,5)	----	----
Arg	0,56	54,3 (44,1-64,2)	----	----	9,7	9,8	25,8	53,8 (43,8-63,7)	----	----
Asn	0,45	35,0 (28,6-41,7)	----	----	6,1	7,6	17,7	38,7 (31,5-45,9)	----	----
Asp^{NG}	0,59	88,2 (72,9-106,1)	187,3 (84,4-290,2)	-65,3 (-48,1-82,5)	15,6	15,8	41,7	70,9 (57,8-84,0)	149,5 (81,6-210,4)	-59,5 (-37,8-61,2)
Glu	0,51	69,8 (56,8-82,6)	----	----	12,5	13,8	34,5	57,5 (46,8-68,1)	----	----
Gln	0,54	34,0 (27,7-40,4)	----	----	6,0	6,3	16,2	29,4 (26,8-38,1)	----	----
Gly	0,29	33,0 (26,7-40,4)	----	----	5,9	10,5	20,2	37,8 (23,9-34,9)	----	----
Pro^{NG}	0,16	58,1 (38,5-56,1)	66,3 (48,7-83,9)	-39,9 (-31,0-48,8)	10,4	26,4	40,1	39,0 (31,8-46,2)	54,7 (41,3-68,1)	-35,3 (-27,6-43,0)
Ser	0,29	36,0 (29,2-42,8)	----	----	6,4	11,2	21,7	33,4 (27,1-39,7)	----	----
Tyr^{NG}	0,16	31,1 (25,2-36,9)	48,8 (37,3-60,3)	-32,8 (-33,1-52,5)	5,2	15,5	24,1	41,7 (33,9-49,6)	73,7 (53,0-94,4)	-42,4 (-32,8-52,0)

Tabla 31. Parámetros derivados de los datos de variación biológica obtenidos para los aminoácidos libres plasmáticos esenciales proteinogénicos en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). II^a, índice de individualidad; VRC^b, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); IC95%^c, intervalo de confianza al 95%; VRC_{pos}^d, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{neg}^e, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); I^f, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^g, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ET^h, especificaciones de calidad deseables para el error total. ^{NG}, los datos obtenidos no siguen una distribución gaussiana.

Aminoácidos No Esenciales	Individuos sanos							Pacientes con ERCT		
	II ^a	VRC ^b , % (IC95%) ^c	VRC _{pos} ^d , % (IC95%) ^c	VRC _{neg} ^e , % (IC95%) ^c	I ^f , %	ES ^g , %	ET ^h , %	VRC ^b , % (IC95%) ^c	VRC _{pos} ^d , % (IC95%) ^c	VRC _{neg} ^e , % (IC95%) ^c
Aab ^{NG}	0,76	73,0 (59,4-87,0)	158,1 (82,2-233,3)	-60,0 (-44,7-75,3)	12,3	10,2	30,5	58,8 (47,7-69,9)	115,5 (72,6-158,5)	-53,6 (-40,5-66,7)
Cit ^{NG}	0,50	58,5 (43,8-73,3)	106,1 (69,0-143,2)	-51,5 (-39,1-63,9)	10,1	11,7	28,3	65,7 (48,3-83,1)	121,2 (74,5-167,9)	-54,8 (-41,3-68,3)
2Cys	0,78	112,3 (91,6-133,2)	-----	-----	19,1	15,4	47,0	94,1 (76,6-111,5)	-----	-----
Hyp ^{NG}	0,61	96,5 (78,0-114,7)	182,4 (84,5-280,3)	-64,6 (-47,6-81,6)	17,3	16,6	45,1	70,7 (57,3-84,2)	135,7 (78,7-192,7)	-57,6 (-27,9-43,3)
Orn ^{NG}	0,33	52,5 (42,5-62,3)	-----	-----	9,2	14,5	29,7	54,7 (44,4-65,0)	-----	-----
Tau ^{NG}	0,69	85,3 (69,3-101,5)	150,8 (81,9-219,7)	-60,1 (-44,8-75,4)	15,3	13,4	38,6	66,7 (54,1-79,3)	109,7 (70,4-149,0)	-53,3 (-40,3-66,3)
AAANE ⁱ	0,46	38,8 (31,4-46,2)	-----	-----	6,7	8,3	19,5	37,0 (29,8-44,2)	-----	-----
AAE/AAANE ⁱ	0,43	28,4 (23,0-33,8)	-----	-----	4,9	6,4	14,6	29,7 (23,8-35,5)	-----	-----

Tabla 32. Parámetros derivados de los datos de variación biológica obtenidos para los aminoácidos libres plasmáticos no esenciales no proteínogénicos en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT): ácido α -aminobutírico (Aab), citrulina (Cit), cistina (2Cys), hidroxiprolina (Hyp), ornitina (Orn), taurina (Tau). II^a, índice de individualidad; VRC^b, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); IC95%^c, intervalo de confianza al 95%; VRC_{pos}^d, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{neg}^e, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); I^f, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^g, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ET^h, especificaciones de calidad deseables para el error total; AAANEⁱ, aminoácidos no esenciales totales; AAE/AAANEⁱ, ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales. ^{NG}, los datos obtenidos no siguen una distribución gaussiana.

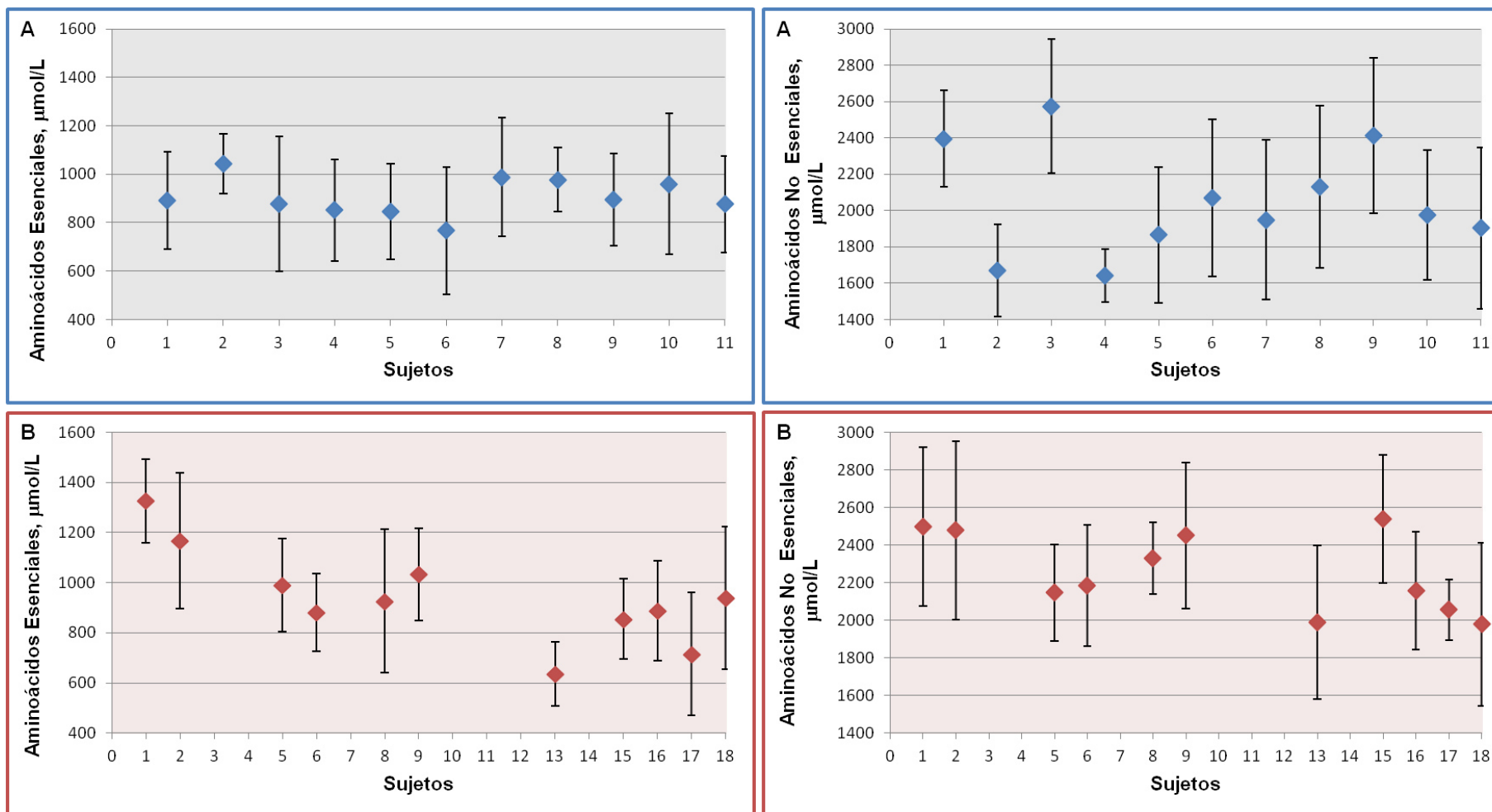


Figura 26. Concentraciones plasmáticas de aminoácidos esenciales y no esenciales. Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 11 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses (Para el estudio de la variación biológica del perfil de aminoácidos libres plasmáticos en la enfermedad renal crónica terminal, debido al tiempo requerido por determinación, la cohorte de pacientes a estudio fue reducida de forma aleatorizada de 18 a 11 sujetos).

3.2. Marcadores Bioquímicos de Anemia

3.2.1. Datos de Variación Biológica de la Ferritina

En la **Figura 27** se muestra la distribución de los resultados de ferritina sérica derivados del estudio de VB en pacientes con ERCT e individuos sanos. Los datos de concentración observados durante el periodo de seguimiento presentaban una distribución no gaussiana en ambos grupos de sujetos.

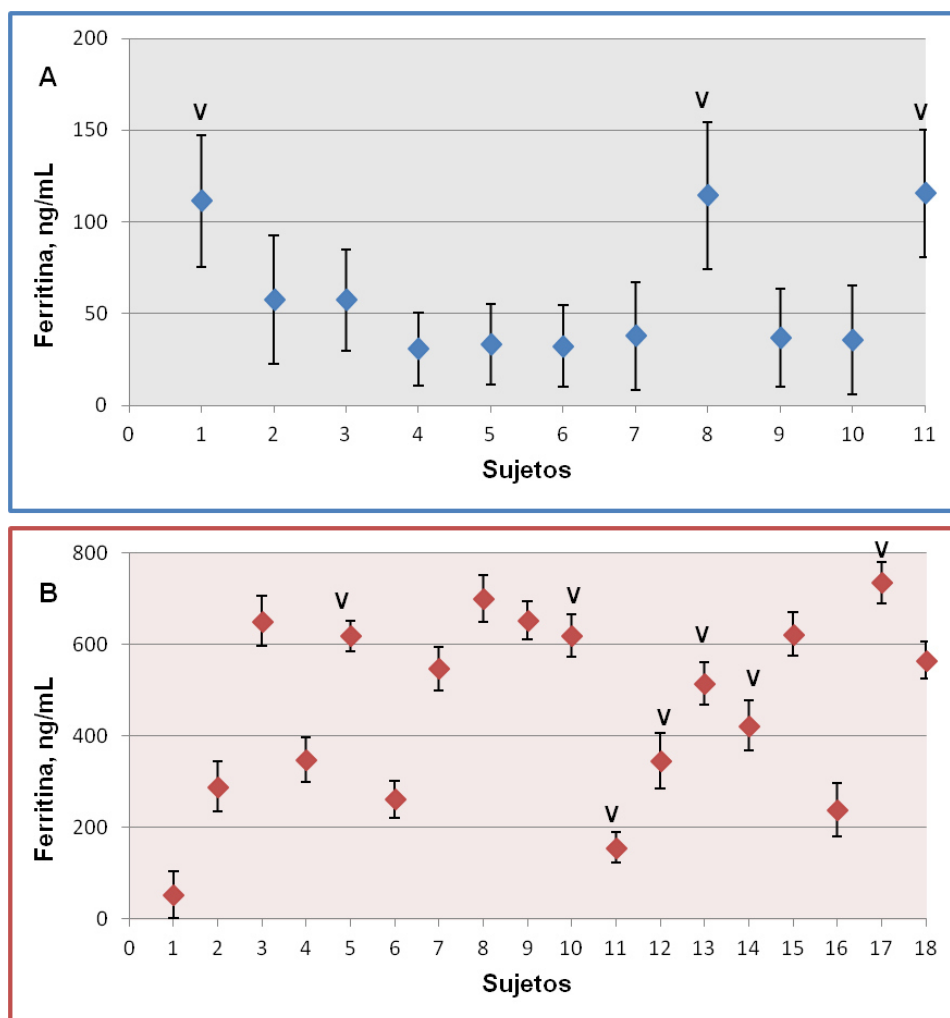


Figura 27. Concentraciones de ferritina sérica. Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses. V: varón.

Las concentraciones de ferritina sérica obtenidas para todos los individuos sanos se encontraban dentro de IR definido para una población libre de enfermedad (15-150 ng/mL mujeres; 30-400 ng/mL hombres). Por el contrario, todos los pacientes con ERCT, con la excepción de tres sujetos, presentaron una mediana de la concentración de ferritina sérica superior al IR poblacional.

Las mujeres incluidas en la cohorte de individuos sanos presentaban una mediana de la concentración sérica de ferritina significativamente menor ($p < 0,05$) a la observada en varones. Sin embargo, debido al bajo tamaño muestral, la estratificación de los datos de VB por sexo sería insuficiente para obtener estimaciones fiables, por lo que solo se presentan los datos globales.

En la **Tabla 33** se recogen los componentes de VB y los VRC estimados para la ferritina sérica en pacientes con ERCT y en individuos sanos; así como el II y las especificaciones de calidad deseables derivadas de los datos de VB de estos últimos. En esta tabla se muestran también la mediana y el rango de concentraciones de ferritina sérica, el CV_A intraserie, el ratio SD_A/SD_I , y el número de datos del estudio, al no haberse identificado ningún valor aberrante. El ratio entre la V_A intraserie y la VB_i fue inferior a 0,25 en ambos grupos de sujetos.

Como es posible observar en la **Figura 27**, tanto los pacientes con ERCT como los individuos sanos, mostraron una moderada variabilidad en la concentración sérica de ferritina durante el periodo del estudio; siendo la mediana (IQR) del rango de concentraciones de cada sujeto de 37,5 (7,7) y 29,2 (6,5) ng/mL, respectivamente.

La mediana de la concentración sérica de ferritina observada durante el periodo de seguimiento en los pacientes con ERCT, fue significativamente más alta ($p < 0,05$) que la obtenida en individuos sanos. Sin embargo, y de acuerdo a los IC95%, no se observan diferencias significativas entre los componentes de VB y, en consecuencia, los VRC derivados son semejantes en individuos sanos y pacientes con ERCT.

	Individuos sanos ^a	Pacientes con ERCT
	Ferritina, ng/mL	Ferritina, ng/mL
N^b	54	99
Mediana (IQR)^c	39,6 (45,7)	669 (442)*
Rango	10,7-140,3	40-991
CV_A^d, %	3,2	1,1
CV_I^e, % (IC95%)^f	12,2 (9,7-14,8)	14,7 (11,8-16,6)
CV_G^g, % (IC95%)^f	45,0 (34,2-55,7)	54,5 (45,0-63,9)
II^h	0,27	---
VRCⁱ, % (IC95%)^f	34,5 (28,7-42,3)	38,1 (32,8-43,3)
VRC_{pos}^j, % (IC95%)^f	50,4 (37,9-62,9)	44,0 (33,3-54,7)
VRC_{neg}^k, % (IC95%)^f	-33,5 -(26,0-41,0)	-30,5 -(23,1-37,9)
I^l, %	6,1	---
ES^m, %	11,7	---
ETⁿ, %	21,7	---
SD_A/SD_I	0,21	0,12

Tabla 33. Datos de variación biológica y parámetros derivados para la ferritina sérica en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal. [(----), datos no calculados]; N^b, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^c, rango intercuartílico; CV_A^d, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^e, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^f, intervalo de confianza al 95%; CV_G^g, coeficiente de variación inter-individual. II^h, índice de individualidad; VRCⁱ, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{pos}^j, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{neg}^k, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); I^l, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^m, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ETⁿ, especificaciones de calidad deseables para el error total.*, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney.

3.2.2. Datos de Variación Biológica de la Vitamina B12 y el Folato

La variación de los resultados de vitamina B12 y folato derivados del estudio de VB realizado en pacientes con ERCT e individuos sanos, se muestran en la **Figura 28**. Los datos de concentración obtenidos para estas magnitudes bioquímicas seguían una distribución no gaussiana en ambos grupos de sujetos.

Todos los sujetos incluidos en el estudio, ya fueran pacientes con ERCT o individuos sanos, presentaban una concentración plasmática de vitamina B12 y folato dentro del IR definido para una población no deficitaria (vitamina B12: 191-663; folato: 3,1-17,5 ng/mL).

En la **Tabla 34** se recogen los componentes de VB obtenidos para la vitamina B12 y el folato en pacientes con ERCT y en individuos sanos; así como la mediana y el rango de concentraciones plasmáticas, el CV_A intraserie, el ratio SD_A/SD_I y el número de datos disponible tras la eliminación de valores aberrantes. El porcentaje de datos eliminado fue inferior al 4%, distribuyéndose uniformemente entre sujetos y muestras. El ratio entre la V_A intraserie y la VB_I obtenido para la vitamina B12 y el folato fue inferior a 0,5 y a 0,1, respectivamente, en ambos grupos de sujetos.

Así mismo, en la **Tabla 34** se muestran los VRC bidireccionales ($Z = 1,96$; 95% probabilidad) y unidireccionales ($Z = 1,65$; 95% probabilidad) calculados en ambos grupos de sujetos; junto con los II y las especificaciones de calidad deseables derivadas de los datos de VB estimados en individuos sanos.

Como puede observarse en la **Figura 28**, tanto los pacientes con ERCT como los individuos sanos, mostraron cambios moderados en la concentración sérica de vitamina B12 y folato durante el periodo del estudio; siendo la mediana (IQR) del rango de concentraciones de cada sujeto de 72,0 (25,3) y 75,5 (23,4) pg/mL para la vitamina B12, y de 3,3 (1,3) y 2,6 (1,3) para el folato, respectivamente.

No se observaron diferencias significativas entre las medianas de la concentración plasmática de vitamina B12 y folato obtenidas durante el periodo de seguimiento en pacientes con ERCT e individuos sanos, así como en la estimación de los datos de VB en ambos grupos de sujetos, de acuerdo a los IC95%. En consecuencia, los VRC derivados de estos datos de VB son equivalentes.

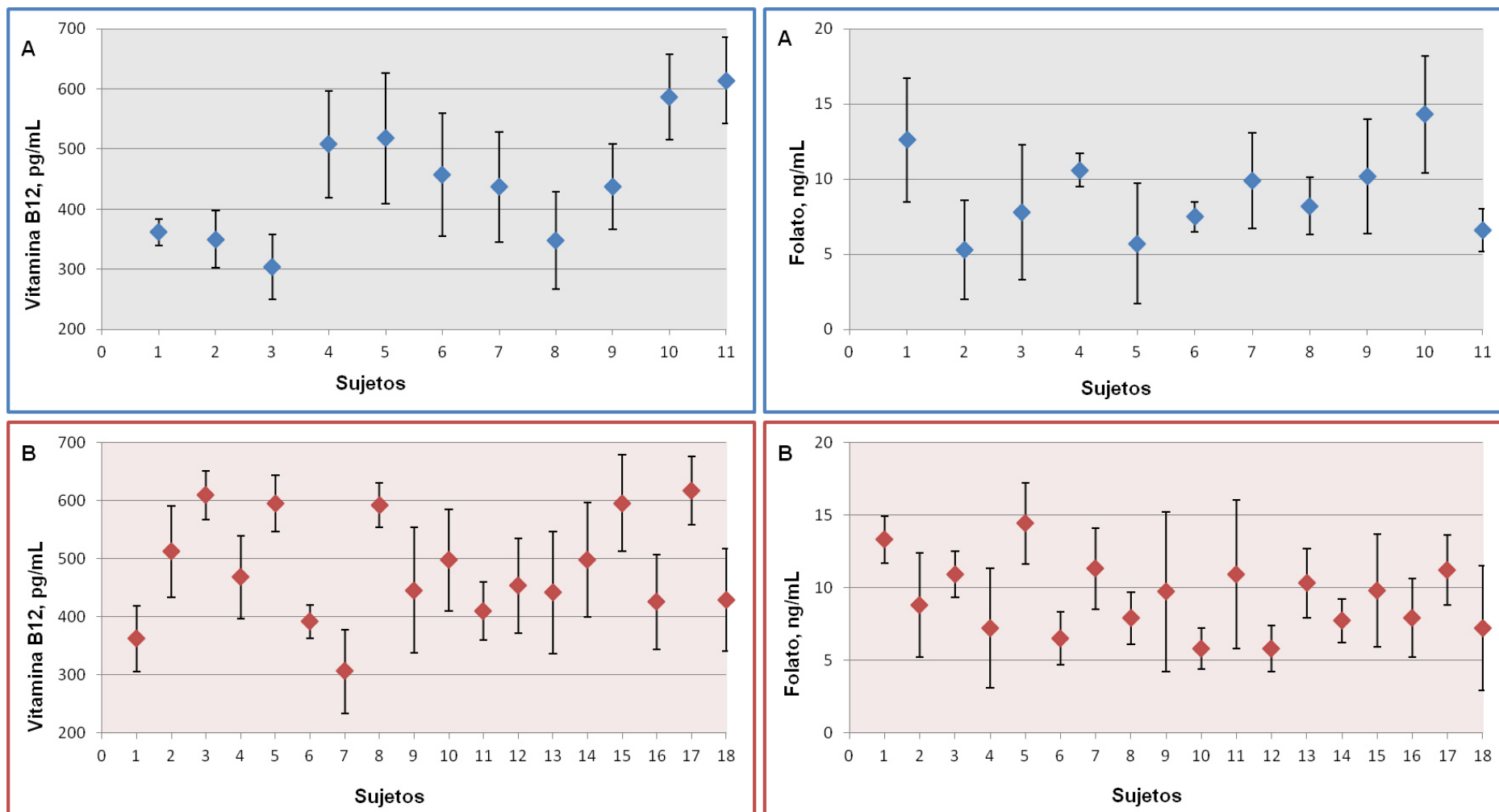


Figura 28. Concentraciones plasmáticas de vitamina B12 y folato. Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

	Individuos sanos		Pacientes con ERCT	
	B12, pg/mL	FOL, ng/mL	B12, pg/mL	FOL, ng/mL
N^a	52	53	98	96
Mediana (IQR)^b	437,5 (223,2)	9,5 (4,7)	468,2 (193,9)	9,3 (5,5)
Rango	289,8-687,3	5,1-16,6	276,8-682,9	4,4-17,3
CV_A^c, %	1,1	2,0	2,2	1,3
CV_I^d, % (IC95%)^e	8,5 (6,9-10,1)	19,3 (15,4-23,1)	9,1 (7,7-10,4)	18,6 (15,7-21,4)
CV_G^f, % (IC95%)^e	68,8 (50,5-87,1)	50,4 (38,5-62,3)	71,4 (56,3-86,4)	52,4 (42,7-62,0)
II^g	0,12	0,27	---	---
VRC BD^h, % (IC95%)^e	23,8 (19,0-28,6)	53,7 (40,8-66,7)	25,9 (21,8-30,0)	51,6 (42,2-61,0)
^{1,96}VRC_{pos}ⁱ, % (IC95%)^e	30,5 (24,2-36,8)	79,2 (56,3-102,1)	36,7 (30,6-42,8)	72,4 (57,1-87,7)
^{1,96}VRC_{neg}^j, % (IC95%)^e	-23,4 (-18,7-28,1)	-44,2 (-34,2-54,2)	-26,9 (-22,6-31,2)	-42,0 (-34,8-49,2)
VRC UD^k, % (IC95%)^e	20,0 (16,1-24,0)	45,2 (34,9-55,6)	21,8 (18,4-25,2)	43,4 (35,9-51,0)
^{1,65}VRC_{pos}ⁱ, % (IC95%)^e	25,1 (20,0-30,2)	63,4 (47,0-79,8)	30,1 (25,2-35,0)	58,1 (47,0-69,2)
^{1,65}VRC_{neg}^j, % (IC95%)^e	-20,1 (-16,1-24,1)	-38,8 (-30,3-47,3)	-23,2 (-19,6-26,8)	-36,8 (-30,7-42,9)
I^l, %	4,3	9,6	---	---
ES^m, %	17,3	18,3	---	---
ETⁿ, %	24,4	34,2	---	---
SD_A/SD_I	0,34	0,11	0,43	0,10

Tabla 34. Datos de variación biológica y parámetros derivados para la vitamina B12 (B12) y el folato (FOL) en plasma de individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). [(---), datos no calculados]; N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV_A^c, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^d, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^e, intervalo de confianza al 95%; CV_G^f, coeficiente de variación inter-individual. II^g, índice de individualidad; VRC BD^h, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{pos}ⁱ, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica; VRC_{neg}^j, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica; VRC UD^k, valor de referencia del cambio unidireccional (Z=1,65. 95% de probabilidad); I^l, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^m, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ETⁿ, especificaciones de calidad deseables para el error total.

3.3. Marcadores Bioquímicos de las Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral

3.3.1. Datos de Variación Biológica del Calcio y el Fosfato

La variación de las concentraciones de calcio y fosfato séricos, obtenidas en pacientes con ERCT clínicamente estable e individuos sanos, se muestran en la **Figura 29**. Los datos de concentración obtenidos para estas magnitudes presentaban una distribución gaussiana en ambos grupos. Debido a la hipoalbuminemia relativa observada en 2 de los pacientes con ERCT, los valores de calcio sérico obtenidos en ambos grupos de sujetos, fueron corregidos en función de la concentración sérica de albúmina mediante la fórmula:

$$\text{Calcio total corregido} = \text{Calcio total (mmol/L)} + 0,2 \times [4 - \text{Albúmina (g/dL)}]$$

Durante los seis meses de seguimiento, la concentración media de calcio corregido observada en 13 de los pacientes con ERCT se encontraban dentro del IR definido para la población general (2,15-2,50 mmol/L); mientras que únicamente 7 de los pacientes presentaban una concentración media de fosfato sérico entre los rangos establecidos para una población libre de enfermedad (0,87-1,45 mmol/L). Las concentraciones medias de calcio corregido y fosfato séricos obtenidas en la cohorte de individuos sanos durante el periodo de seguimiento se encontraban dentro de los IR poblacionales.

Uno de los pacientes incluidos en el estudio (sujeto 11), mostraba una concentración media de calcio sérico corregido significativamente menor ($p < 0,05$) que la del resto de pacientes con ERCT; mientras que la concentración media de fosfato sérico fue más alta, aunque sin alcanzar la significación estadística. El estudio de la historia clínica de este paciente no reveló la presencia de diferencias notables en la etiología de la ERC, los antecedentes clínicos, el tratamiento farmacológico, o en la concentración de albúmina, PTHi o 25-OH-vitamina D.

La **Tabla 35** muestra los datos de VB y los VRC obtenidos para el calcio corregido y el fosfato sérico en pacientes con ERCT e individuos sanos; así como los II y las especificaciones de calidad deseables derivadas de estos últimos. Así mismo, en esta tabla se muestran la media y el rango, el CV_A intraserie, el ratio SD_A/SD_I y el número de datos disponibles tras la eliminación de valores aberrantes; siendo el porcentaje de

datos eliminado inferior al 1%, y el ratio entre la V_A intraserie y la VB_I inferior a 0,50 para ambas magnitudes bioquímicas y grupos de sujetos.

Los pacientes con ERCT presentaron una concentración media de fosfato sérico significativamente más alta que la observada en individuos sanos; mientras que para la concentración media de calcio corregido no se observaron diferencias significativas. Como puede observarse en la **Figura 29**, tanto los pacientes con ERCT como los individuos sanos mostraron una moderada variabilidad en la concentración sérica de calcio y fosfato durante el periodo de seguimiento; siendo la media (DS) del rango de concentraciones intrasujeto de 0,30 (0,12) y 0,11 (0,05) mmol/L para el calcio; y 0,54 (0,16) y 0,17 (0,07) mmol/L para el fosfato, respectivamente. En consecuencia, los CV_I estimados en ambos grupos de sujetos para estas magnitudes son relativamente estrechos; así como los CV_G .

De acuerdo a los IC95%, las diferencias observadas en los CV_I de pacientes con ERCT e individuos sanos no alcanzaban significación estadística. Sin embargo, los VRC derivados de estos datos de VB eran significativamente más elevados; así como los CV_G obtenidos para ambas magnitudes bioquímicas.

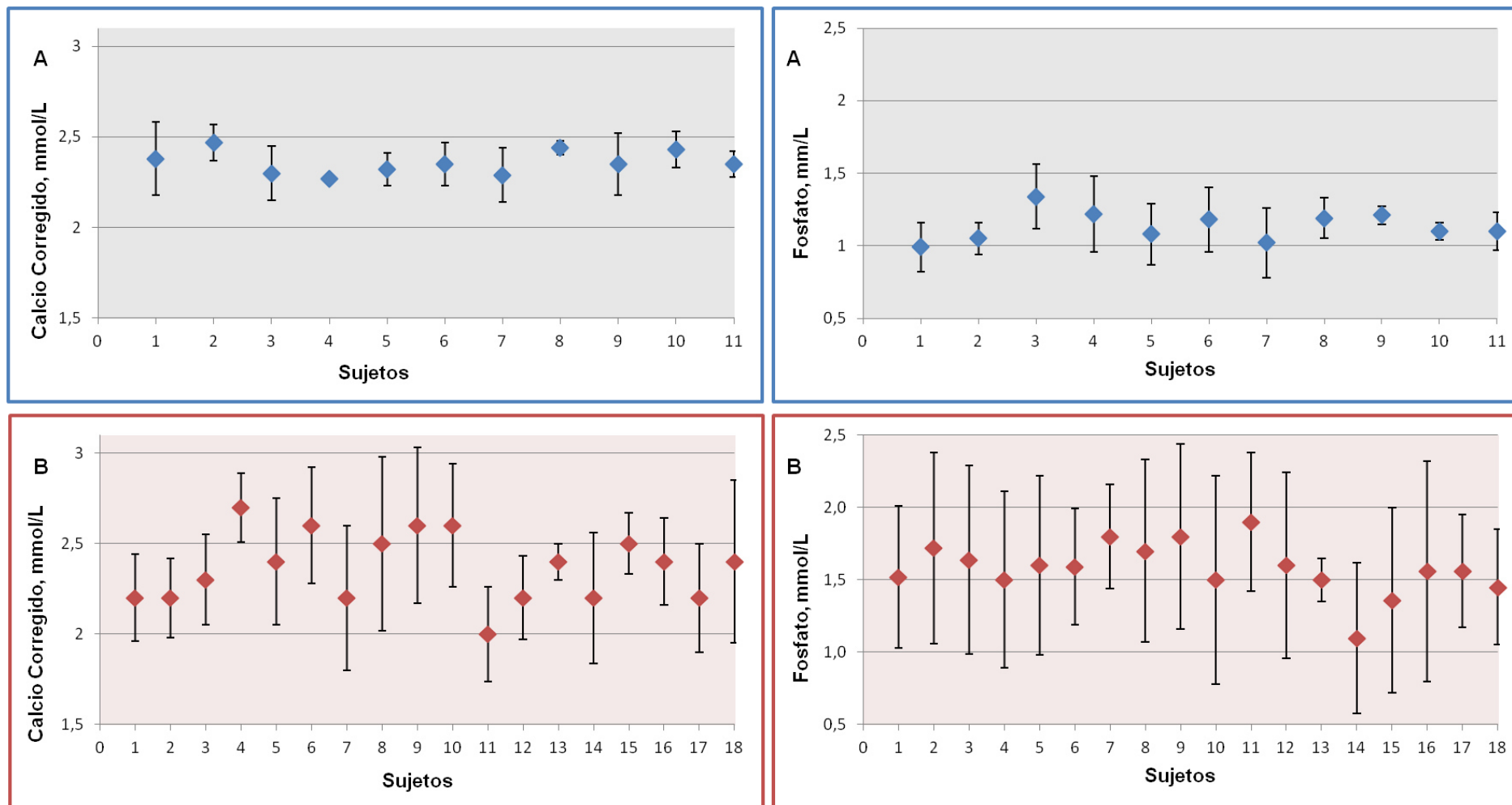


Figura 29. Concentraciones séricas de calcio corregido y fosfato. Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

	Individuos sanos		Pacientes con ERCT	
	Calcio ^a	Fosfato	Calcio ^a	Fosfato
N^b	54	54	98	99
Media (DS)^c, mmol/L	2,4 (0,08)	1,1 (0,2)	2,4 (0,22)	1,6 (0,3) ⁺
Rango, mmol/L	2,2-2,5	0,88-1,46	1,8-2,9	0,8-2,3
CV_A^d, %	1,5	1,9	2,5	4,8
CV_I^e, % (IC95%)^f	2,9 (2,4-3,8)	8,3 (6,7-10,3)	5,3 (3,7-6,1)	12,8 (10,0-14,6)
CV_G^g, % (IC95%)^f	5,4 (4,4-6,4)	24,1 (19,3-29,5)	18,9 (16,2-21,6) ^x	34,5 (29,6-39,7) ^x
II^h	0,54	0,34	---	---
VRCⁱ, % (IC95%)^f	9,1 (7,4-10,8)	23,5 (18,8-28,2)	16,1 (13,9-18,4) ^x	38,0 (32,8-43,2) ^x
II^j, %	1,5	4,1	---	---
ES^k, %	1,5	6,4	---	---
ET^l, %	3,9	13,2	---	---
SD_A/SD_I	0,49	0,23	0,47	0,40

Tabla 35. Datos de variación biológica y parámetros derivados para el calcio y el fosfato séricos en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal. [(----), datos no calculados]; ^a, calcio corregido por la concentración de albúmina sérica [Calcio Total corregido = Calcio Total (mmol/L) + 0,2 x [4-Albúmina (g/dL)]]; N^b, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; DS^c, desviación estándar; CV_A^d, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^e, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^f, intervalo de confianza al 95%; CV_G^g, coeficiente de variación inter-individual. II^h, índice de individualidad; VRCⁱ, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); II^j, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^k, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ET^l, especificaciones de calidad deseables para el error total. ⁺, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según la prueba t de Student. ^x, diferencias significativas según los IC95%.

3.3.2. Datos de Variación Biológica de la Hormona Paratiroidea y la 25-OH-Vitamina D

La **Figura 30** muestra la variación de los resultados obtenidos para la PTHi plasmática y la 25-OH-vitamina D sérica en pacientes con ERCT e individuos sanos durante el periodo de seguimiento. Las concentraciones obtenidas para estas magnitudes en ambos grupos de sujetos seguían una distribución no gaussiana.

La totalidad de los valores de PTHi plasmática obtenidos en individuos sanos se encontraban dentro del IR definido para una población normal (15-65 pg/mL), mientras que 12 de los pacientes con ERCT presentaban una mediana de la concentración de PTHi por encima del límite superior del IR. Durante el periodo de seguimiento, la totalidad de los pacientes con ERCT y 7 de los individuos sanos, presentaron una mediana de la concentración sérica de 25-OH-vitamina D inferior al límite recomendado para un correcto equilibrio del metabolismo óseo-mineral (30 ng/mL); pudiendo considerarse esta concentración como deficiente (< 20 ng/mL) en 9 pacientes y 3 individuos sanos.

Cinco de los pacientes con ERCT (sujetos 1, 12, 13, 14 y 15) presentaban una concentración de PTHi significativamente superior a la del resto de sujetos del estudio ($p < 0,05$), mientras que la mediana de la concentración sérica de 25-OH-vitamina D observada en cuatro de los pacientes con ERCT (sujetos 4, 5, 6 y 7) fue significativamente inferior ($p < 0,05$); no observándose diferencias relevantes en el tratamiento farmacológico pautado o en la concentración de calcio o fosfato. Uno de estos pacientes (sujeto 13), sin embargo, presentaba una mediana de la concentración sérica de PCR significativamente más alta que el resto de pacientes con ERCT.

Así mismo, y como puede observarse en la **Figura 30**, las concentraciones séricas de 25-OH-vitamina D medidas en tres de los individuos sanos (sujetos 3, 8 y 10) fueron superiores a las del resto de sujetos, si bien estas diferencias no alcanzaban significación estadística. Ninguno de estos pacientes estaba sometido a tratamiento farmacológico con análogos de la vitamina D, pudiendo atribuirse las diferencias observadas a una mayor exposición solar.

En la **Tabla 36** se recogen los componentes de VB y los VRC estimados para la PTHi plasmática y la 25-OH-vitamina D sérica, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT; así como el II y las especificaciones de calidad deseables derivados de los datos de VB de estos últimos. En esta tabla se muestran también la mediana y el

rango, el CV_A intraserie, el ratio entre la V_A intraserie y la VB_i , y el número de datos disponible tras la eliminación de valores aberrantes. El porcentaje de datos eliminado fue inferior al 5%, distribuyéndose uniformemente entre los sujetos; y el ratio SD_A/SD_i fue inferior a 0,50 para ambas magnitudes y grupos de sujetos.

La mediana de la concentración plasmática de PTHi observada en los pacientes con ERCT fue significativamente superior a la obtenida en individuos sanos ($p < 0,05$). Así mismo, y como se puede observar en la **Figura 30**, la variabilidad observada en la concentración de PTHi durante el periodo del estudio fue significativamente mayor en los pacientes con ERCT que en los individuos sanos ($p < 0,05$), siendo la mediana del rango de concentraciones intrasujeto 53,4 (22,0) y 9,2 (4,0) ng/mL, respectivamente. En consecuencia, y de acuerdo a los IC95%, el CV_i estimado en pacientes con ERCT fue significativamente mayor al obtenido para individuos sanos y, por tanto, los VRC calculados a partir de estos datos de VB fueron prácticamente el doble.

Los pacientes con ERCT presentaban una mediana de la concentración sérica de 25-OH-vitamina D significativamente inferior ($p < 0,05$) a la obtenida en individuos sanos. Sin embargo, la variabilidad observada durante el periodo de seguimiento fue similar en ambos grupos; siendo la mediana (IQR) del rango de concentraciones de cada sujeto, de 12,0 (3,5) ng/mL para pacientes con ERCT, y 9,3 (2,7) ng/mL para individuos sanos. Por lo tanto, y de acuerdo a los IC95%, no se observaron diferencias entre los datos de VB estimados en ambos grupos de sujetos y, en consecuencia, los VRC derivados de estos datos de VB fueron semejantes.

Los VRC asimétricos (positivo y negativo) calculados para ambas magnitudes bioquímicas muestran valores consistentes con el VRC obtenido a partir del enfoque tradicional, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos.

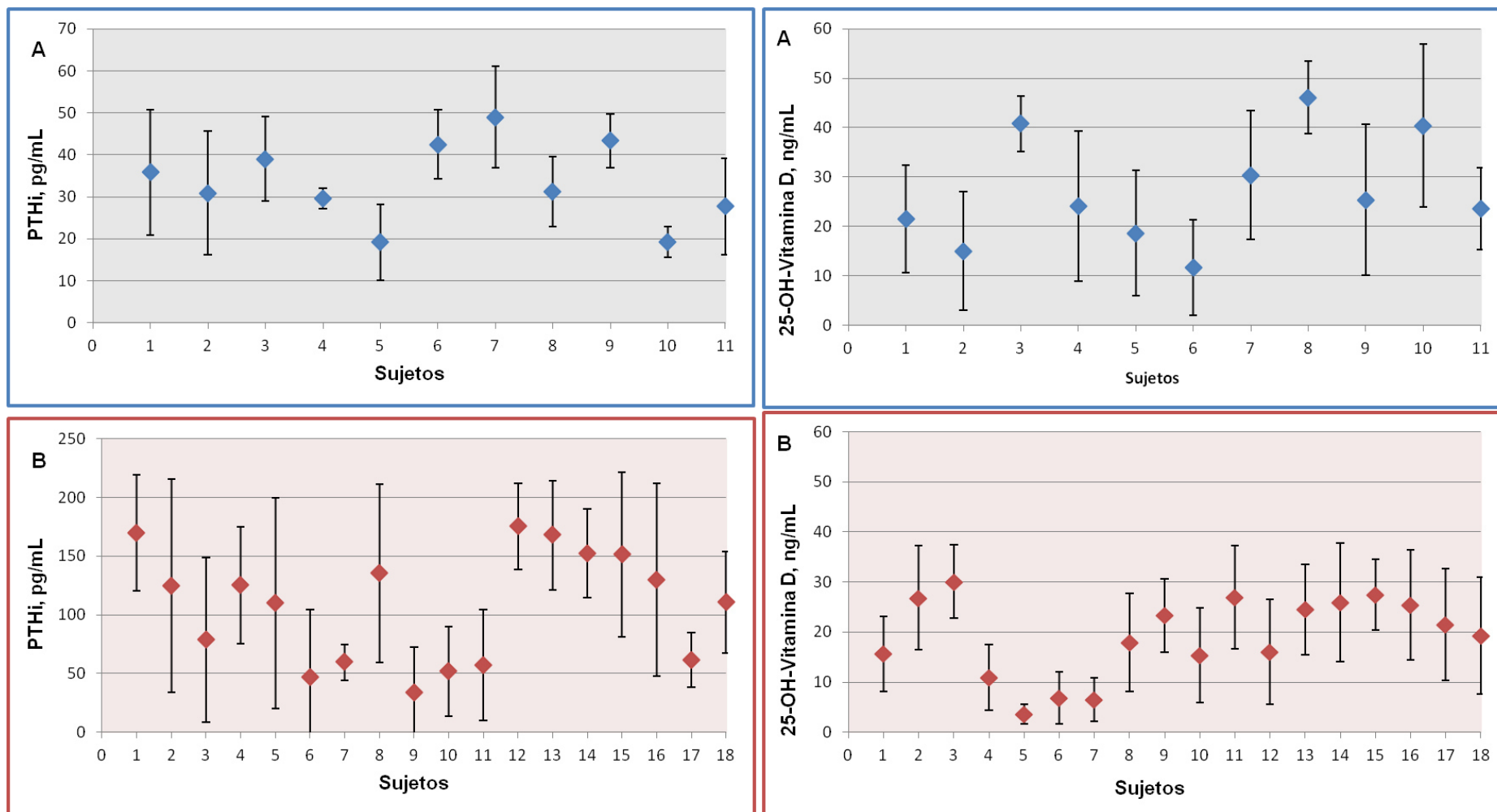


Figura 30. Concentraciones de hormona paratiroidea intacta (PTHi) y 25-OH-vitamina D. Los datos se muestran como mediana y rango. A, Variación biológica observada en 11 sujetos sanos en un periodo de seguimiento de 5 semanas; B, Variación biológica observada en 18 pacientes con enfermedad renal crónica terminal durante un periodo de seguimiento de 6 meses.

	Individuos sanos		Pacientes con ERCT	
	PTHi, ng/mL	VitD, ng/mL	PTHi, ng/mL	VitD, ng/mL
N^a	51	52	94	96
Mediana (IQR)^b	31,1 (15,0)	24,5 (10,9)	140,0 (101,0)*	19,6 (15,7)*
Rango	14,8-50,1	9,4-48,6	21,1-236,0	3,3-29,0
CV_A^c, %	4,5	3,9	4,2	5,3
CV_I^d,% (IC95%)^e	10,4 (8,3-12,5)	19,1 (15,2-22,9)	19,3 (16,3-22,3)*	19,7 (16,7-22,7)
CV_G^f,% (IC95%)^e	49,8 (44,4-75,1)	85,7 (59,5-111,8)	72,3 (56,5-88,0)	88,3 (67,4-109,1)
II^g	0,19	0,23	0,27	---
VRC BD^h, %	31,4	53,9	54,6	56,5
(IC95%)^e	(24,7-38,2)	(40,8-67,1)	(44,1-65,1)*	(45,8-67,1)
^{1,96}VRC_{pos}ⁱ, %	50,8	87,5	90,2	97,5
(IC95%)^e	(38,5-63,1)	(60,5-114,5)	(68,0-112,4)*	(73,0-122,0)
^{1,96}VRC_{neg}^j, %	-33,7	-46,7	-47,4	-49,4
(IC95%)^e	-(26,4-41,0)	-(35,8-57,6)	-(38,7-56,1)	-(40,5-58,3)
VRC UD^k, %	---	45,4	---	47,5
(IC95%)^e	---	(34,9-55,9)	---	(39,1-56,0)
^{1,65}VRC_{pos}ⁱ, %	---	69,8	---	77,4
(IC95%)^e	---	(50,8-88,8)	---	(60,4-94,4)
^{1,65}VRC_{neg}^j, %	---	-41,1	---	-43,6
(IC95%)^e	---	-(31,9-50,3)	---	-(36,0-51,2)
I^l, %	5,2	9,5	---	---
ES^m, %	12,7	21,9	---	---
ETⁿ, %	21,3	37,7	---	---
SD_A/SD_I	0,43	0,20	0,26	0,24

Tabla 36. Datos de variación biológica y parámetros derivados para la hormona paratiroidea intacta (PTHi) plasmática y la 25-OH-vitamina D sérica en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). [(---), datos no calculados]; N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV_A^c, coeficiente de variación analítico intra-serie; CV_I^d, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^e, intervalo de confianza al 95%; CV_G^f, coeficiente de variación inter-individual. II^g, índice de individualidad; VRC BD^h, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); VRC_{pos}ⁱ, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica; VRC_{neg}^j, valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica; VRC UD^k, valor de referencia del cambio unidireccional (z=1,65. 95% de probabilidad); I^l, especificaciones de calidad deseables para la imprecisión; ES^m, especificaciones de calidad deseables para el error sistemático (sesgo); ETⁿ, especificaciones de calidad deseables para el error total. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney. *, diferencias significativas según los IC95%.

Capítulo 11. Efecto del Tiempo en Tratamiento de Hemodiálisis sobre los Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular

Con el fin de evaluar el efecto potencial del tiempo en tratamiento de HD sobre la concentración de los FBRCV incluidos en el estudio, así como sobre la estimación de sus componentes de VB, la cohorte de pacientes con ERCT se dividió en dos grupos:

- ❖ **Grupo 1:** en este grupo se incluyeron aquellos pacientes con un tiempo en HD inferior a 1 año (8 mujeres, 1 hombre; rango de edad: 31-75 años).
- ❖ **Grupo 2:** en este grupo se incluyeron aquellos pacientes en tratamiento de HD desde hacía más de 1 año (3 mujeres, 6 hombres; rango de edad: 34-75 años).

Para la evaluación del efecto del tiempo en HD sobre la concentración del perfil de aminoácidos libres plasmáticos, al haberse reducido el número de pacientes incluidos en el estudio de VB, los grupos se componían de:

- ❖ **Grupo 1:** 4 mujeres y 1 hombre (rango de edad 40-75 años)
- ❖ **Grupo 2:** 3 mujeres y 3 hombres (rango de edad 34-75 años).

Las **Tablas 37-41**, muestran la mediana y el rango, el número de datos disponibles tras la eliminación de valores aberrantes, y los componentes de VB (CV_I y CV_G) obtenidos para todos los FBRCV en los dos grupos de pacientes.

La comparación de las medianas de los dos grupos, mostró un incremento estadísticamente significativo en la concentración de PCR, us-TnT y PTHi con el tiempo en HD ($p < 0,05$); mientras que para el CT y el c-HDL se observó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Para los aminoácidos libres se observó, en general, un incremento de la mediana de su concentración plasmática con el tiempo en HD, aunque estas diferencias solo alcanzaban significación estadística ($p < 0,05$) para His, Leu, Lys, Val, Glu, Orn y Pro. Por contra, y de acuerdo a los IC95%, no se observaron diferencias significativas en los datos de VB obtenidos para ambos grupos en ninguna de las magnitudes bioquímicas evaluadas.

Lípidos y Lipoproteínas	Tiempo en programa de HD <1 año					Tiempo en programa de HD >1 año				
	N ^h	Mediana (IQR) ⁱ ,mg/dL	Rango, mg/dL	CV ⁱ ,% (IC95%) ^k	CV ^g ,% (IC95%) ^k	N ^h	Mediana (IQR) ⁱ ,mg/dL	Rango, mg/dL	CV ⁱ ,% (IC95%) ^k	CV ^g ,% (IC95%) ^k
TG^a	50	119(87)	47-339	18,2 (15,6-20,9)	76,9 (60,9-92,9)	48	138(96)	34-414	22,2 (18,9-25,5)	86,2 (67,1-95,3)
CT^b	50	197(97)	116-334	8,9 (7,7-10,2)	50,4 (41,7-59,1)	48	166(81) [*]	126-286	8,3 (7,1-9,5)	55,7 (45,8-65,7)
c-HDL^c	50	48(13)	24-74	15,9 (12,6-19,1)	46,3 (35,3-57,2)	48	40(15) [*]	21-62	14,4 (11,5-17,4)	53,5 (40,0-67,1)
c-LDL^d	50	122(86)	58-212	10,6 (9,1-12,1)	77,6 (61,4-93,4)	48	99(50)	55-195	11,1 (9,5-12,7)	79,4 (62,6-96,2)
c-LDLc^e	33	90(47)	58-167	11,4 (8,6-14,3)	72,1 (46,9-97,4)	40	95(44)	55-195	12,3 (9,5-15,1)	78,9 (52,7-99,5)
c-VLDL^f	50	23(27)	9-68	22,8 (19,4-26,2)	85,0 (66,2-99,7)	48	28(19)	7-83	23,0 (19,6-26,5)	80,9 (63,5-98,3)
c-noHDL^g	50	148(105)	71-273	8,2 (7,0-9,3)	71,0 (56,8-85,1)	48	125,5(73)	76-246	8,4 (7,2-9,6)	69,6 (55,8-83,3)

Tabla 37. Efecto del tiempo en hemodiálisis en la concentración de lípidos y lipoproteínas séricas y en los datos de variación biológica. TG^a, triglicéridos; CT^b, colesterol total; c-HDL^c, colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; c-LDL^d, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-LDLc^e, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad calculado mediante la fórmula de Friedwald [c-LDLc = CT - c-HDL - (TG/5)]; c-VLDL^f, colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad estimadas mediante la fórmula [c-VLDL = CT-c-LDL-c-HDL]; c-noHDL^g, colesterol no HDL calculado mediante la fórmula [c-noHDL = CT-c-HDL]; N^h, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)ⁱ, rango intercuartílico; CVⁱ, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^k, intervalo de confianza al 95%; CV^g, coeficiente de variación inter-individual. ^{*}, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney.

Factores No Convencionales y Específicos Uremia	Tiempo en programa de HD <1 año					Tiempo en programa de HD >1 año				
	N ^a	Mediana (IQR) ^b	Rango	CV ^c ,% (IC95%) ^d	CV _G ^e ,% (IC95%) ^d	N ^a	Mediana (IQR) ^b	Rango	CV ^c ,% (IC95%) ^d	CV _G ^e ,% (IC95%) ^d
PCR, mg/dL	51	0,4 (0,70)	0,1-4,2	51,4 (42,5-60,3)	108,7 (80,8-136,6)	43	0,8 (1,8) *	0,1-3,7	47,2 (39,3-55,1)	105,1 (78,7-131,5)
us-TnT, ng/L	49	35,6 (22,1)	11,6-101,7	16,4 (13,1-19,8)	89,4 (60,6-118,2)	45	47,6 (23,1) *	24,0-123,3	13,1 (10,3-15,9)	60,7 (44,0-77,4)
Alb, g/dL	50	3,95 (0,32)	3,02-4,71	4,9 (4,2-5,6)	15,9 (13,6-18,2)	45	4,03 (0,34)	3,33-4,89	5,9 (5,0-6,7)	12,3 (10,5-14,0)
Transf, mg/dL	50	169 (40)	105-244	6,7 (5,7-7,6)	28,0 (23,0-32,1)	49	174 (22)	123-216	5,8 (5,0-6,6)	24,4 (20,9-27,9)
Fer, ng/mL	50	650 (584)	41-990	12,1 (9,7-14,5)	97,3 (6,5-129,4)	49	669 (597)	69-966	12,4 (9,9-15,0)	91,6 (61,6-121,5)
B12, pg/mL	49	451,8 (206,1)	276,8-682,9	8,7 (6,9-10,5)	68,4 (48,5-88,3)	49	478,2 (281,9)	295,3-675,8	9,0 (7,0-10,9)	75,1 (51,6-98,5)
Fol, ng/mL	48	9,6 (2,1)	4,4-15,4	18,3 (14,4-22,3)	51,8 (38,5-65,0)	47	9,1 (4,3)	4,7-17,3	18,9 (14,7-23,1)	63,8 (45,4-82,2)
Ca, mmol/L	49	2,4 (0,2)	1,9-2,8	5,4 (4,3-6,5)	22,6 (17,8-27,4)	49	2,3 (0,2)	1,8-2,8	5,4 (4,4-6,5)	20,7 (16,6-25,0)
P, mmol/L	50	1,7 (0,2)	1,1-2,3	12,4 (10,0-14,9)	38,6 (30,2-47,1)	49	1,6 (0,3)	0,8-2,3	13,1 (10,4-15,8)	31,0 (24,1-37,8)
PTHi, ng/mL	48	95,5 (113,4)	25,4-232,4	23,1 (17,7-28,5)	72,4 (49,4-95,3)	46	160,6 (150) *	21,1-236,0	22,6 (15,8-31,5)	72,3 (52,0-92,6)
VitD, ng/mL	49	20,9 (16,6)	9,5-25,1	20,3 (15,9-24,7)	81,9 (56,0-107,8)	46	19,6 (21,9)	3,3-29,0	19,1 (14,9-23,3)	89,5 (58,6-120,4)

Tabla 38. Efecto del tiempo en hemodiálisis en la concentración plasmática de proteína C reactiva (PCR), troponina T ultrasensible (us-TnT), albúmina (Alb), transferrina (Transf), ferritina (Fer), vitamina B12 (B12), folato (Fol), calcio (Ca), fosfato (P), hormona paratiroidea intacta (PTHi) y 25-OH-vitamina D (VitD), y en sus datos de variación biológica. N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV^c, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^d, intervalo de confianza al 95%; CV_G^e, coeficiente de variación inter-individual. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney.

Aminoácidos Esenciales	Tiempo en programa de HD <1 año					Tiempo en programa de HD >1 año				
	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV ^c , % (IC95%) ^d	CV _G ^e , % (IC95%) ^d	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV ^c , % (IC95%) ^d	CV _G ^e , % (IC95%) ^d
His	27	87,1 (35,2)	46,7-106,6	11,2 (7,2-15,3)	48,1 (27,3-68,9)	31	99,1 (25,6) ⁺	80,3-125,2	9,4 (7,3-11,4)	34,9 (26,4-43,4)
Ile	27	51,5 (37,0)	31,0-91,9	17,2 (10,9-23,6)	66,4 (33,8-99,1)	32	72,2 (23,0)	38,6-134,7	20,3 (15,7-24,9)	60,1 (42,8-77,4)
Leu	27	104,0 (45,0)	66,9-141,6	16,9 (10,7-23,1)	63,7 (33,1-94,3)	30	146,0 (47,7) ⁺	67,6-261,9	17,2 (13,4-21,2)	60,1 (42,8-77,3)
Lys	27	167,7 (64,8)	109,7-211,8	12,4 (7,9-16,9)	49,8 (28,0-71,6)	31	187,7 (60,0) ⁺	115,7-297,1	14,8 (11,5-18,1)	58,7 (42,0-75,4)
Met^{NG}	27	22,0 (11,3)	15,0-31,2	11,8 (7,5-16,1)	56,5 (30,1-82,3)	31	29,0 (11,3)	13,5-51,8	13,7 (10,6-16,8)	71,1 (48,9-92,9)
Phe^{NG}	26	68,1 (22,1)	55,4-87,6	11,3 (7,2-15,4)	65,3 (33,5-97,2)	32	78,5 (51,3)	40,7-125,2	9,5 (7,4-11,6)	70,9 (15,0-33,3)
Thr	27	103,2 (62,0)	65,9-148,4	19,5 (12,2-26,7)	42,3 (24,7-60,0)	32	118,2 (47,0)	75,9-175,3	17,9 (13,9-21,9)	42,8 (31,8-53,7)
Trp	27	27,0 (12,2)	19,0-40,8	12,9 (8,2-17,6)	59,6 (31,7-87,5)	30	28,9 (9,8)	13,5-42,7	10,8 (8,4-13,2)	55,8 (40,2-71,3)
Val	26	164,2 (37,7)	117,6-217,6	12,2 (7,8-16,7)	31,2 (19,0-43,4)	31	222,0 (73,9) ⁺	156,6-343,8	15,1 (11,7-18,5)	42,2 (30,0-52,9)
AAE^f	26	802,7 (131,1)	577,8-979,3	10,3 (7,4-13,1)	35,8 (24,7-46,9)	30	895,8 (203,9)	646,1-1516,7	10,4 (8,1-12,7)	31,2 (23,7-38,7)

Tabla 39. Efecto del tiempo en hemodiálisis en la concentración plasmática de aminoácidos libres esenciales en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal. N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV^c, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^d, intervalo de confianza al 95%; CV_G^e, coeficiente de variación inter-individual; AAE^f, aminoácidos esenciales totales. ^{NG}, los datos obtenidos no siguen una distribución gaussiana. ^{*}, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney; ⁺, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según la prueba t de Student.

Aminoácidos No Esenciales	Tiempo en programa de HD <1 año					Tiempo en programa de HD >1 año				
	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV _I ^c , % (IC95%) ^d	CV _G ^e , % (IC95%) ^d	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV _I ^c , % (IC95%) ^d	CV _G ^e , % (IC95%) ^d
Ala	26	281,5 (90,9)	214,5-360,8	12,2 (7,8-16,7)	45,8 (26,3-65,4)	32	324,9 (103,2)	195,0-546,2	12,4 (9,6-15,1)	52,1 (37,9-66,2)
Arg	27	115,6 (62,7)	53,8-133,0	22,5 (14,1-31,0)	46,4 (26,6-66,3)	32	124,1 (33,4)	56,9-162,2	18,8 (14,5-23,0)	55,4 (40,0-70,8)
Asn	27	92,4 (42,3)	56,6-112,3	11,1 (7,1-15,1)	55,6 (30,3-81,0)	31	95,9 (25,0)	61,1-147,8	15,3 (11,9-18,7)	36,1 (27,2-44,9)
Asp^{NG}	27	18,2 (3,5)	13,5-29,8	24,2 (15,0-33,3)	24,2 (15,0-33,3)	32	17,5 (12,7)	5,2-27,0	22,6 (33,9-99,7)	80,7 (53,9-107,5)
Glu	27	74,7 (24,2)	54,9-107,5	16,9 (10,7-23,1)	60,8 (32,1-89,5)	32	91,7 (3,5) [*]	51,1-137,9	15,3 (11,9-18,8)	55,5 (40,0-70,9)
Gln	26	535,4 (278,9)	389,7-825,3	11,3 (7,2-15,5)	37,4 (22,2-52,6)	32	578,9 (65,3)	452,1-706,6	9,2 (7,2-11,7)	27,9 (21,4-34,5)
Gly	27	238,6 (137,5)	136,8-308,4	12,9 (10,0-15,7)	65,4 (45,9-84,5)	30	230,9 (65,2)	166,7-346,9	13,7 (10,7-16,8)	55,6 (40,1-71,1)
Pro^{NG}	27	303,2 (76,9)	227,6-444,6	14,1 (11,0-17,3)	47,8 (35,2-60,4)	32	402,7 (95,1) [*]	273,2-735,1	13,8 (10,7-16,9)	56,2 (40,4-71,9)
Ser	25	98,5 (50,6)	62,9-134,4	9,7 (6,2-13,1)	46,5 (26,6-66,3)	32	97,3 (17,5)	60,4-130,8	12,7 (9,8-15,5)	26,9 (20,6-33,2)
Tyr^{NG}	27	57,6 (10,2)	48,3-77,0	14,0 (8,9-19,1)	70,2 (34,8-105,7)	30	61,3 (25,4)	32,2-116,2	13,8 (10,7-16,8)	69,8 (48,3-91,4)

Tabla 40. Efecto del tiempo en hemodiálisis en la concentración plasmática de aminoácidos libres no esenciales proteínogénicos en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal. N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV_I^c, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^d, intervalo de confianza al 95%; CV_G^e, coeficiente de variación inter-individual. ^{NG}, los datos obtenidos no siguen una distribución gaussiana. ^{*}, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney; ^{*}, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según la prueba t de Student.

Aminoácidos No Esenciales	Tiempo en programa de HD <1 año				Tiempo en programa de HD >1 año					
	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV ^c , % (IC95%) ^d	CV _G ^e , % (IC95%) ^d	N ^a	Mediana (IQR) ^b , μmol/L	Rango, μmol/L	CV ^c , % (IC95%) ^d	CV _G ^e , % (IC95%) ^d
Aab ^{NG}	26	17,4 (9,6)	14,5-28,0	22,2 (13,9-30,5)	59,9 (31,8-88,0)	31	21,9 (11,3)	10,5-40,3	20,9 (16,2-25,7)	71,0 (48,9-93,0)
Cit ^{NG}	25	156,9 (43,1)	121,6-198,7	23,3 (18,5-28,1)	51,7 (39,3-64,1)	31	167,3 (25,2)	130,0-201,9	20,8 (16,6-25,0)	58,3 (43,6-73,0)
2Cys	27	44,9 (16,4)	23,7-57,0	33,2 (20,1-46,3)	59,3 (31,6-87,0)	32	46,3 (19,3)	13,4-79,7	31,3 (23,8-38,8)	52,7 (38,3-67,1)
Hyp ^{NG}	26	25,1 (18,9)	15,6-51,0	25,2 (15,6-34,8)	93,8 (38,0-149,5)	31	31,4 (17,4)	28,0-75,5	24,1 (18,5-29,7)	75,3 (51,2-99,4)
Orn ^{NG}	27	81,2 (22,3)	53,7-145,0	20,1 (15,6-24,7)	45,9 (36,5-63,3)	30	100,5 (16,4)*	67,2-133,8	19,0 (11,9-26,0)	47,9 (27,2-68,6)
Tau ^{NG}	26	78,1 (24,9)	63,6-112,5	19,7 (13,4-27,0)	80,2 (36,8-123,6)	31	86,8 (38,7)	31,8-183,6	20,6 (15,9-25,3)	87,4 (56,9-117,9)
AANE ^f	25	2167,1 (370,2)	1622-2732	13,6 (9,8-17,5)	36,3 (25,0-47,7)	30	2363,4 (245,9)	1659-2780	12,0 (9,3-14,6)	33,5 (25,4-41,6)
AAE/AANE ^g	25	0,40 (0,05)	0,31-0,49	10,8 (7,8-13,8)	33,5 (25,4-41,6)	30	0,41 (0,07)	0,31-0,62	10,1 (7,6-12,3)	28,5 (21,7-35,2)

Tabla 41. Efecto del tiempo en hemodiálisis en la concentración plasmática de aminoácidos libres no esenciales no proteinogénicos en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal: ácido α-aminobutírico (Aab), citrulina (Cit), cistina (2Cys), hidroxiprolina (Hyp), ornitina (Orn), taurina (Tau). N^a, número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR)^b, rango intercuartílico; CV^c, coeficiente de variación intra-individual; IC95%^d, intervalo de confianza al 95%; CV_G^e, coeficiente de variación inter-individual; AANE^f, aminoácidos no esenciales totales; AAE/AANE^g; ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales. ^{NG}, los datos obtenidos para estos aminoácidos no siguen una distribución gaussiana. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) según el test de Mann-Whitney.

Capítulo 12. Utilidad Práctica de los Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento de los Pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal

1. Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular en Pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal No Estable

En las **Tablas 42, 43 y 44-47**, se recogen las medianas (IQR) y los rangos de concentración obtenidos para los FBRCV convencionales, no convencionales y específicos de la uremia, respectivamente; tanto en la cohorte completa de pacientes con ERCT no estable, como en los subgrupos de pacientes establecidos en función de las comorbilidades diagnosticadas previamente al del periodo de seguimiento:

- ❖ **Grupo con ECV:** 17 pacientes (11 hombres, 6 mujeres); rango edad: 41-80 años
- ❖ **Grupo con DEP:** 5 pacientes (3 hombres, 2 mujeres); rango edad: 59-80 años
- ❖ **Grupo con Anemia:** 15 pacientes (7 hombres, 9 mujeres); rango de edad: 30-80 años
- ❖ **Grupo con Hiperparatiroidismo Secundario:** 10 pacientes (5 hombres, 7 mujeres); 31-80 años

La comparación de los resultados obtenidos en la totalidad de los pacientes con ERCT no estable, con los obtenidos en los pacientes clínicamente estables, mostró que la mediana de la concentración sérica de CT, c-HDL, c-LDL y c-noHDL era significativamente más baja ($p < 0,05$) en los primeros; mientras que la mediana de la concentración de PCR, us-TnT y PTHi, fue significativamente más alta ($p < 0,05$). La concentración de los aminoácidos libres plasmáticos observada en pacientes con ERCT no estable fue, en general, similar a la observada en pacientes clínicamente estables, con la excepción de los aminoácidos ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, ornitina y prolina, en los cuales se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

La mediana de la concentración de los FBRCV no convencionales observada en el subgrupo de pacientes con ECV, fue significativamente más alta ($p < 0,05$) que la observada tanto en pacientes clínicamente estables, como en el resto de subgrupos de pacientes no estables. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de los factores convencionales o específicos de la uremia.

En el subgrupo de pacientes con DEP, se observó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la mediana de la concentración de los lípidos y lipoproteínas séricas, la albúmina, la transferrina, la vitamina B12, el folato y, en general, de todos los aminoácidos libres plasmáticos, así como del ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales, con respecto a la obtenida tanto en pacientes clínicamente estables como no estables. La mediana de la concentración de PCR, sin embargo, fue significativamente más alta ($p < 0,05$).

Los pacientes diagnosticados de hiperparatiroidismo secundario previo al inicio del periodo de seguimiento, presentaban una mediana de la concentración de fosfato sérico y PTHi plasmática significativamente más elevada ($p < 0,05$) que la del resto de pacientes con ERCT, tanto estable como no estable; así como una concentración media de calcio sérico corregido y 25-OH-vitamina D sérica significativamente más baja ($p < 0,05$). Por el contrario, en el subgrupo de pacientes con anemia no se observaron diferencias en las concentraciones de ferritina, vitamina B12 o folato, con respecto al resto de pacientes con ERCT.

Factores Convencionales	TG ^a	CT ^b	c-HDL ^c	c-LDL ^d	c-LDLc ^e	c-VLDL ^f	c-noHDL ^g
Datos Pacientes con ERCT Estable							
N ^h	98	97	98	98	97	97	97
Mediana(IQR) ⁱ , mg/dL	123(94)	176(84)	44(15)	108(74)	107(48)	25(25)	132(84)
Rango, mg/dL	34-339	116-334	21-7421-74	55-212	55-212	7-83	71-273
Datos Globales Pacientes con ERCT No Estable							
N ^h	140	141	140	138	106	139	139
Mediana(IQR) ⁱ , mg/dL	116 (96)	140 (58)*	38 (11)*	69 (42)*	66 (30)*	23 (20)	97 (53)*
Rango, mg/dL	36-464	77-340	23-72	32-164	32-164	7-40	46-304
Datos Pacientes con ERCT y Enfermedad Cardiovascular							
N ^h	51	51	50	51	51	50	50
Mediana(IQR) ⁱ , mg/dL	111 (47)	134 (61)	36 (11)	67 (46)	67 (46)	22 (9)	96 (50)
Rango, mg/dL	42-193	77-208	21-55	32-126	32-126	8-39	46-164
Datos Pacientes con ERCT y Desgaste Proteico Energético							
N ^h	15	15	15	14	15	14	15
Mediana(IQR) ⁱ , mg/dL	70 (10)*	99 (11)*	30 (6)*	42 (7)*	42 (8)*	14 (2)*	55 (7)*
Rango, mg/dL	39-92	91-105	28-47	38-47	38-47	8-18	53-61
Datos Pacientes con ERCT y Anemia							
N ^h	48	47	48	48	48	47	47
Mediana(IQR) ⁱ , mg/dL	111 (51)	135 (108)	40 (24)	67 (23)	67 (24)	20 (10)	95 (26)
Rango, mg/dL	34-189	77-185	24-72	32-109	32-109	7-38	46-130
Datos Pacientes con ERCT e Hiperparatiroidismo							
N ^h	35	36	36	36	36	35	36
Mediana(IQR) ⁱ , mg/dL	102 (57)	164 (117)	44 (18)	99 (105)	99 (105)	20 (12)	117 (106)
Rango, mg/dL	39-196	91-286	24-80	38-195	38-195	8-39	53-225

Tabla 42. Lípidos y lipoproteínas séricas en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT) no estable, en función de las principales comorbilidades asociadas. TG^a, triglicéridos; CT^b, colesterol total; c-HDL^c, colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; c-LDL^d, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-LDLc^e, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad calculado mediante la fórmula de Friedwald [LDLc = CT - HDL - (TG/5)]; c-VLDL^f, colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad estimadas mediante la fórmula [VLDL = CT-LDL-HDL]; c-noHDL^g, colesterol no HDL calculado mediante la fórmula [noHDL = CT-HDL]; N^h, número de datos del estudio; IQRⁱ, rango intercuartílico. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según el test de Mann-Whitney.

Factores No Convencionales	PCR ^a , mg/dL	us-TnT ^b , ng/L
Datos Pacientes con ERCT Estable		
N ^c	94	94
Mediana(IQR) ^d	0,5 (1,3)	43,2 (33,5)
Rango	0,1-4,2	11,6-123,3
Datos Globales Pacientes con ERCT No Estable		
N ^c	139	140
Mediana(IQR) ^d	1,0 (2,0)*	50,3 (36,3)*
Rango	0,1-18,1	15,2-186,0
Datos Pacientes con ERCT y Enfermedad Cardiovascular		
N ^c	51	51
Mediana(IQR) ^d	3,0 (10,8)*	84,1 (54,3)*
Rango	0,8-17,0	40,3-186,0
Datos Pacientes con ERCT y Desgaste Proteico Energético		
N ^c	15	15
Mediana(IQR) ^d	8,7 (7,0)*	49,2 (11,1)
Rango	1,8-18,1	24,0-59,8
Datos Pacientes con ERCT y Anemia		
N ^c	48	48
Mediana(IQR) ^d	0,6 (1,1)	52,0 (26,5)
Rango	0,1-4,3	41,7-123,0
Datos Pacientes con ERCT e Hiperparatiroidismo		
N ^c	36	36
Mediana(IQR) ^d	1,4 (0,9)	48,7 (30,6)
Rango	0,2-4,3	33,2-95,8

Tabla 43. Factores de riesgo no convencionales en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT) no estable, en función de las principales comorbilidades asociadas. PCR^a, proteína C reactiva; us-TnT^b, troponina T ultrasensible. N^c, número de datos del estudio; IQR^d, rango intercuartílico. *, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según el test de Mann-Whitney.

Factores Uremia	Alb ^a , g/dL	Trf ^b , mg/dL	Fer ^c , ng/mL	B12 ^d ,pg/mL	Fol ^e ,ng/mL	Ca ^f ,mmol/L	P ^g , mmol/L	PTHi ^h ,pg/mL	VitD ⁱ ,ng/mL
Datos Pacientes con ERCT Estable									
N ^j	96	99	99	98	96	98	99	94	96
Mediana(IQR) ^k	3,9 (0,4)	172 (32)	669 (442)	468,2 (193,9)	9,3 (5,5)	2,4 (0,22)	1,6 (0,3)	140,0 (101,0)	19,6 (15,7)
Rango	3,5-4,9	105-244	40-991	276,8-682,9	4,4-17,3	1,8-2,9	0,8-2,3	21,1-236,0	3,3-29,0
Datos Globales Pacientes con ERCT No Estable									
N ^j	140	140	140	139	139	139	140	138	138
Mediana(IQR) ^k	3,9 (0,4)	169 (42)	657 (627)	488,7 (343,0)	9,7 (3,9)	2,2 (0,3)	1,7 (0,8)	192,3 (181) [*]	19,2 (29,1)
Rango	2,7-4,3	106-226	147-2118	260,0-1072,3	3,4-11,6	1,7-2,8	0,8-3,1	22,0-3250,0	3,5-32,6
Datos Pacientes con ERCT y Enfermedad Cardiovascular									
N ^j	51	51	51	51	50	50	51	51	51
Mediana(IQR) ^k	4,0 (0,3)	161 (38)	636 (410)	477,1 (323,1)	9,4 (5,8)	2,2 (0,4)	1,7 (0,7)	277,3 (610)	19,3 (18,1)
Rango	3,1-4,3	105-216	69-1257	269,5-927,4	5,3-11,2	1,7-2,7	0,8-3,1	40,0-3250,0	8,9-30,5
Datos Pacientes con ERCT y Desgaste Proteico Energético									
N ^j	15	15	15	15	15	15	15	14	15
Mediana(IQR) ^k	3,0 (0,2) ⁺	108 (23) ⁺	616 (833)	336,3 (219) [*]	5,8 (5,3) [*]	2,3 (0,2)	1,6 (0,5)	186,4 (501)	19,2 (12,2)
Rango	2,9-3,2	106-125	185-2118	260,0-645,2	3,4-7,1	2,1-2,8	0,8-1,6	22,0-1740,0	10,6-24,5
Datos Pacientes con ERCT y Anemia									
N ^j	48	48	48	47	48	48	48	47	47
Mediana(IQR) ^k	3,9 (0,5)	159 (34)	681 (872)	468,9 (215,4)	9,7 (3,7)	2,3 (0,2)	1,7 (0,6)	189,3 (490)	19,0 (21,7)
Rango	3,0-4,6	109-216	147-2000	319,2-1072,3	6,9-11,3	1,7-2,7	0,8-2,6	33,0-3250,0	10,1-22,9
Datos Pacientes con ERCT e Hiperparatiroidismo									
N ^j	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Mediana(IQR) ^k	3,9 (0,5)	160 (74)	695 (726)	479,1 (241,1)	9,7 (3,4)	2,1 (0,3) ⁺	1,9 (0,8) ⁺	330,8(757) [*]	18,8 (9,2)
Rango	2,9-4,2	105-216	147-2118	393,2-1049,0	6,9-10,8	1,7-2,8	0,8-3,1	165,2-1619	3,5-20,8

Tabla 44. Factores de riesgo no convencionales en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT) no estable, en función de las principales comorbilidades asociadas. Alb^a, albúmina; Trf^b, transferrina; Fer^c, ferritina; B12^d, vitamina B12; Fol^e, folato; Ca^f, calcio corregido por la concentración de albúmina sérica [Calcio Total corregido = Calcio Total (mmol/L) + 0,2 x [4-Albúmina (g/dL)]]; P^g, fosfato; PTHi^h, hormona paratiroidea intacta; VitDⁱ, 25-OH-vitamina D; N^j, número de datos del estudio; IQR^k, rango intercuartílico. ^{*}, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según el test de Mann-Whitney. ⁺, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según la prueba t de Student.

	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Tyr	Val	AAE ^a
Datos Pacientes con ERCT Estable										
N^b	58	59	57	58	58	58	59	57	57	56
Mediana(IQR)^c, μmol/L	93,0(24,9)	70,1(27,6)	137,0(52,5)	180,1(56,4)	27,7(9,4)	77,1(33,6)	134,1(27,9)	26,2(7,3)	210,1(79,3)	945,6(205,2)
Rango, μmol/L	46,7-125,2	31,0-134,7	66,9-261,9	96,4-297,1	13,5-51,8	40,5-125,2	65,9-175,3	12,5-42,7	117,6-343,8	577,7-1516,7
Datos Globales Pacientes con ERCT No Estable										
N^b	138	137	140	139	140	140	139	138	138	137
Mediana(IQR)^c, μmol/L	78,8(26,3)	68,0(37,4)	154,2(49,8)	187,0(139)	26,4(25,0)	71,2(48,8)	139,1(69,0)	18,5(7,3)	234,5(109,2)	977,7(74,0)
Rango, μmol/L	59,8-125,2	28,6-134,7	67,6-261,9	105,7-297,1	13,5-51,8	40,7-125,2	73,6-175,3	14,6-42,7	156,6-343,8	560,7-1557,7
Datos Pacientes con ERCT y Enfermedad Cardiovascular										
N^b	50	51	51	50	51	51	51	51	51	50
Mediana(IQR)^c, μmol/L	89,1(17,7)	65,4(44,5)	154,4(82,7)	187,3(54,2)	24,2(17,2)	77,8(26,6)	135,2(8,9)	20,1(8,2)	244,8(52,7)	978,3(75,5)
Rango, μmol/L	76,0-125,2	45,6-134,7	134,3-261,9	175,4-297,1	16,5-51,8	63,2-125,2	126,6-175,3	14,8-42,7	165,2-343,8	817,6-1557,7
Datos Pacientes con ERCT y Desgaste Proteico Energético										
N^b	15	14	15	15	15	15	15	14	15	14
Mediana(IQR)^c, μmol/L	62,1(10,0) ⁺	49,9(21,9) ⁺	78,4(63,2) ⁺	128,1(28,0) ⁺	16,3(7,6) [*]	58,2(24,6) [*]	92,5(15,2) ⁺	15,5(9,4) ⁺	181,5(93,8) ⁺	682,5(53,1) ⁺
Rango, μmol/L	50,3-98,8	38,6-66,9	67,6-135,9	115,7-150,0	13,5-22,2	40,7-73,5	84,4-102,1	14,6-25,4	156,6-261,1	560,7-935,9
Datos Pacientes con ERCT y Anemia										
N^b	48	48	48	48	48	48	47	48	48	47
Mediana(IQR)^c, μmol/L	86,8(52,3)	66,2(29,3)	156,5(58,4)	183,8(87,4)	24,5(14,2)	74,0(31,0)	137,5(65,6)	20,3(9,6)	243,8(45,2)	983,4(75,3)
Rango, μmol/L	46,7-123,1	31,0-84,5	66,9-172,0	96,4-248,2	15,0-40,5	40,5-87,6	65,9-149,7	12,5-35,4	117,6-281,1	592,5-1222,1
Datos Pacientes con ERCT e Hiperparatiroidismo										
N^b	36	36	36	36	36	36	35	36	36	35
Mediana(IQR)^c, μmol/L	72,7(5,8)	66,4(12,1)	156,5(49,1)	195,1(49,5)	24,8(12,2)	71,6(15,8)	125,2(13,9)	18,4(16,4)	246,7(44,4)	977,4(78,0)
Rango, μmol/L	78,0-108,8	38,6-76,9	67,6-185,9	115,7-255,9	13,5-30,7	40,7-95,9	84,4-148,2	14,6-37,0	156,5-261,1	609,6-1200,4

Tabla 45. Aminoácidos libres plasmáticos esenciales en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT) no estable en función de las principales comorbilidades asociadas. AAE^a, aminoácidos esenciales totales; N^b, número de datos del estudio; IQR^c, rango intercuartílico. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según el test de Mann-Whitney. +, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según la prueba t de Student.

	Ala	Arg	Asn	Asp	Glu	Gln	Gly	Pro	Ser	Tyr
Datos Pacientes con ERCT Estable										
N ^a	58	59	58	59	59	58	57	59	57	57
Mediana(IQR) ^b , μmol/L	308,7(84,8)	93,0 (36,0)	109,3(26,3)	15,0 (9,9)	88,0 (37,4)	570,2(102,6)	231,3 (71,1)	399,2 (125,1)	112,2(24,3)	62,3 (17,9)
Rango, μmol/L	195,0-546,2	53,8-162,2	56,6-147,8	5,2-29,8	46,8-137,9	389,7-825,3	132,0-358,8	224,8-735,1	60,4-134,4	32,0-116,2
Datos Globales Pacientes con ERCT No Estable										
N ^a	139	140	140	139	138	140	140	138	138	140
Mediana(IQR) ^b , μmol/L	362,0(176,8)	138,7(34,9) ⁺	111,0(35,6)	11,1(9,6) [*]	82,3(39,1) ⁺	545,2(82,5)	219,4(39,4)	413,7(157,1) [*]	85,4(157,1)	63,3(47,6)
Rango, μmol/L	195,0-546,2	71,1-162,2	71,9-147,8	5,2-29,7	46,8-137,9	398,5-641,3	132,0-289,7	153,7-445,0	77,0-143,9	32,0-116,2
Datos Pacientes con ERCT y Enfermedad Cardiovascular										
N ^a	51	51	51	51	50	51	51	50	50	51
Mediana(IQR) ^b , μmol/L	357,9(79,5)	129,3(48,3)	117,2(25,8)	9,8(2,4)	85,8(44,6)	541,2(93,6)	231,2(61,5)	398,0(159,1)	90,5(27,9)	60,9(46,9)
Rango, μmol/L	314,7-546,2	87,4-162,2	74,7-147,8	5,2-10,4	51,1-117,6	452,1-574,5	166,6-264,0	366,1-643,9	65,4-130,8	53,3-116,2
Datos Pacientes con ERCT y Desgaste Proteico Energético										
N ^a	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Mediana(IQR) ^b , μmol/L	215,0(34,1) ⁺	79,5(13,9) ⁺	97,4(17,4)	8,5(13,3) [*]	72,3(19,3) ⁺	545,2(84,8)	209,9(42,4) ⁺	391,2(68,4)	80,7(9,0) ⁺	46,6(28,9) [*]
Rango, μmol/L	195,0-248,8	64,3-88,7	96,7-117,4	3,1-29,7	63,9-83,2	500,9-611,3	178,4-249,4	349,8-452,4	76,5-92,4	42,5-93,9
Datos Pacientes con ERCT y Anemia										
N ^a	48	48	48	48	48	47	48	48	46	48
Mediana(IQR) ^b , μmol/L	376,6(121,0)	138,0(24,3)	101,5(27,1)	12,6(5,3)	79,3(13,1)	547,2(196,0)	220,1(187,3)	394,1(98,6)	84,2(39,6)	66,2(16,0)
Rango, μmol/L	213,8-398,1	53,8-160,6	56,6-125,4	8,1-18,2	75,4-107,5	389,7-706,6	136,8-358,8	291,9-422,6	62,9-113,2	40,1-209,0
Datos Pacientes con ERCT e Hiperparatiroidismo										
N ^a	36	36	36	36	36	36	36	35	36	36
Mediana(IQR) ^b , μmol/L	358,0(109)	129,7(20,0)	103,4(41,2)	10,8(9,4)	86,2(42,5)	547,7(40,7)	220,7(28,4)	426,6(66,0)	83,9(16,6)	67,5(42,1)
Rango, μmol/L	195,0-376,4	57,9-158,7	63,2-117,4	8,7-29,7	63,9-119,9	500,9-667,3	176,0-253,0	273,2-452,4	76,5-106,6	42,5-104,3

Tabla 46. Aminoácidos libres plasmáticos no esenciales proteínogénicos en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT) no estable, en función de las principales comorbilidades asociadas. N^a, número de datos del estudio; IQR^b, rango intercuartílico. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según el test de Mann-Whitney. +, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según la prueba t de Student.

	Aab	Cit	2Cys	Hyp	Orn	Tau	AAANE ^a	AAE/AAANE ^b
Datos Globales Pacientes con ERCT Estable								
N ^c	57	56	59	57	57	57	56	56
Mediana(IQR) ^d , μmol/L	22,9(11,6)	160,8(37,2)	40,3(17,5)	37,4(21,3)	89,1(32,1)	87,6(33,2)	2238,8(281,6)	0,42(0,07)
Rango, μmol/L	10,5-40,9	121,6-201,9	13,4-79,7	15,6-84,7	46,3-148,7	31,8-183,6	1621,6-2780,3	0,31-0,62
Datos Globales Pacientes con ERCT No Estable								
N ^c	140	137	139	140	140	139	137	137
Mediana(IQR) ^d , μmol/L	21,7(9,2)	165,5(49,2)	48,1(16,9)	33,5(18,1)	86,6(23,8)*	77,5(50,1)	2465,0(155,4)	0,40(0,05)
Rango, μmol/L	12,6-93,3	96,7-223,9	22,2-79,7	22,4-137,2	53,7-145,0	31,8-111,4	1422,6-3350,4	0,29-0,60
Datos Pacientes con ERCT y Enfermedad Cardiovascular								
N ^c	51	50	51	51	51	51	50	50
Mediana(IQR) ^d , μmol/L	22,5(8,8)	163,1(41,1)	48,0(28,1)	30,3(9,2)	84,3(21,1)	78,6(34,4)	2448,6(153,1)	0,40(0,05)
Rango, μmol/L	15,7-33,3	120,9-223,9	22,2-79,7	23,1-44,5	64,2-107,6	72,1-111,4	1954,8-3350,4	0,37-0,53
Datos Pacientes con ERCT y Desgaste Proteico Energético								
N ^c	15	15	14	15	15	15	14	14
Mediana(IQR) ^d , μmol/L	22,0(4,4)	156,7(29,6)	47,0(13,2)	33,4(66,5)	66,8(22,0)*	79,5(34,0)	1951,7(146,1) ⁺	0,35(0,04) ⁺
Rango, μmol/L	18,5-25,0	96,7-187,3	36,5-54,4	26,1-137,2	53,7-91,2	61,0-105,7	1422,6-2668,0	0,29-0,37
Datos Pacientes con ERCT y Anemia								
N ^c	48	44	48	48	48	47	44	44
Mediana(IQR) ^d , μmol/L	22,6(23,8)	164,9(40,2)	46,2(24,2)	34,4(47,1)	82,0(33,6)	78,4(22,0)	2448,3(155,3)	0,40(0,06)
Rango, μmol/L	14,5-46,4	101,8-219,8	20,4-54,1	15,6-75,5	46,3-148,2	63,6-163,3	1591,3-3327,3	0,31-0,58
Datos Pacientes con ERCT e Hiperparatiroidismo								
N ^c	36	35	36	36	36	36	35	35
Mediana(IQR) ^d , μmol/L	22,3(12,6)	162,2(38,3)	48,4(11,1)	32,7(22,2)	83,5(24,6)	79,4(30,0)	2463,0(157,0)	0,40(0,06)
Rango, μmol/L	18,5-40,4	128,7-222,5	20,9-54,4	25,7-137,2	53,7-104,4	61,0-136,9	1766,3-3081,5	0,35-0,60

Tabla 47. Aminoácidos libres plasmáticos no esenciales no proteínogénicos en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT) no estable en función de las principales comorbilidades asociadas: ácido α-aminobutírico (Aab), citrulina (Cit), cistina (2Cys), hidroxiprolina (Hyp), ornitina (Orn), taurina (Tau). AAANE^a, aminoácidos no esenciales totales; AAE/AAANE^b, ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales; N^c, número de datos del estudio; IQR^d, rango intercuartílico. *, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según el test de Mann-Whitney. ⁺, diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al grupo de pacientes con ERCT estable, según la prueba t de Student.

2. Aplicación Práctica de los Valores de Referencia del Cambio

En este estudio se ha evaluado la utilidad práctica de los VRC en el seguimiento del estado cardiovascular, nutricional y del metabolismo óseo-mineral de los pacientes con ERCT; aquellos en los que se detectaron alteraciones clínicamente relevantes durante el periodo del estudio.

2.1. Rendimiento Diagnóstico de los Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento del Estado Cardiovascular

El seguimiento del estado cardiovascular de los pacientes con ERCT no estable se realizó a través de los VRC calculados para la us-TnT sérica; seleccionándose esta magnitud por ser aquella considerada como el mejor predictor de la aparición de eventos cardiovasculares a corto plazo¹⁹².

De acuerdo a su historia clínica, 8 de los pacientes presentaron eventos de tipo vascular durante el periodo del estudio, los cuales fueron diagnosticados mediante angiografía, tomografía computarizada craneal, electrocardiograma o ecocardiograma. Estos eventos fueron: isquemia femoral (1 sujeto), ACV (2 sujetos), insuficiencia cardiaca descompensada (3 sujetos) o SCA (2 sujetos).

En la **Figura 31** se muestra la variación de la concentración sérica de us-TnT observada en estos pacientes. Como era de esperar, únicamente aquellos pacientes en los que se había diagnosticado un SCA presentaron un porcentaje de cambio en la concentración de us-TnT superior al VRC asimétrico unidireccional estimado para esta magnitud en pacientes con ERCT. Así mismo, se puede observar que el empleo de los VRC asimétricos unidireccionales calculados en individuos sanos para el seguimiento de los pacientes con ERCT conllevaría un importante incremento del número de falsos positivos en la detección de necrosis miocárdica.

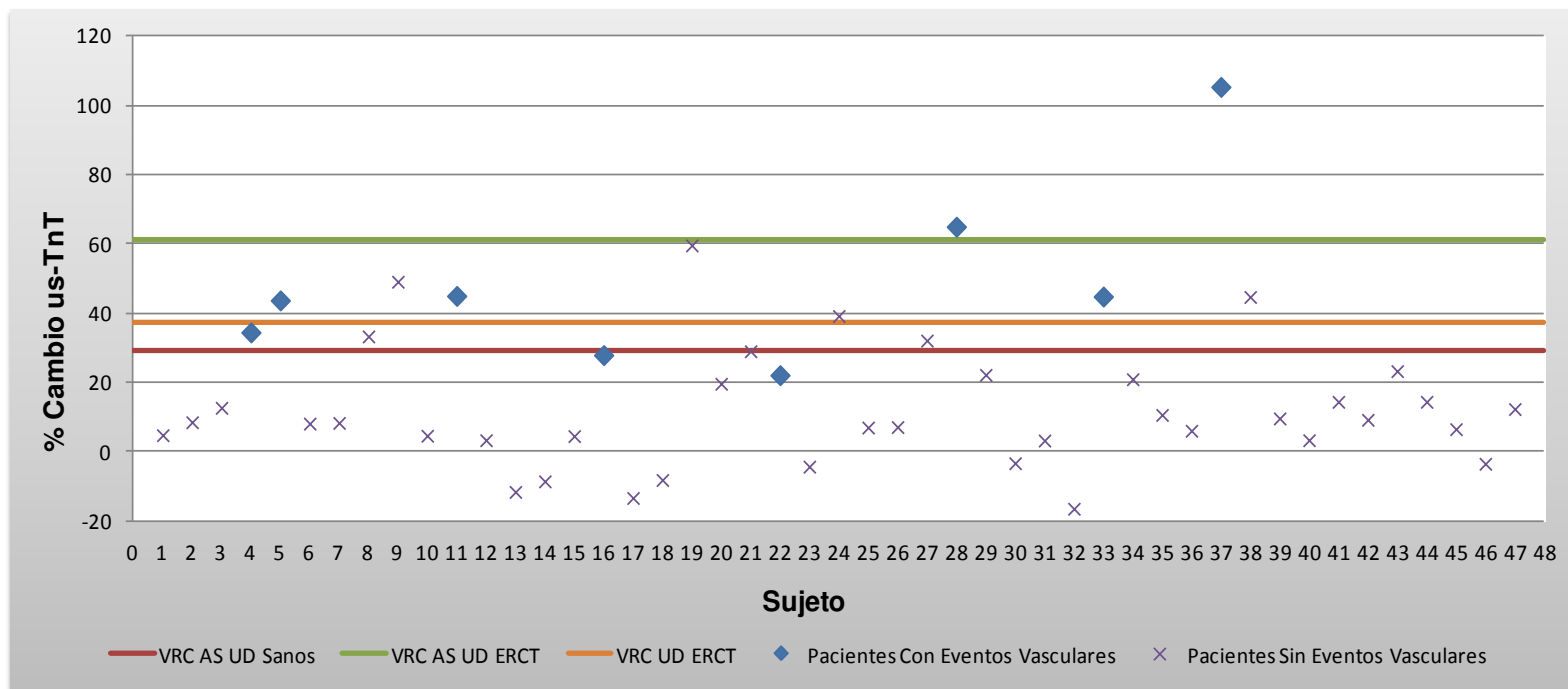


Figura 31. Variación de la concentración de troponina T ultrasensible (us-TnT) observada en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable en los que se detectaron eventos de tipo vascular durante el periodo de seguimiento. VRC AS UD, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) unidireccional obtenido mediante aproximación logarítmica ($Z = 1,65$; 95% probabilidad); ERCT, enfermedad renal crónica terminal; VRC UD, valor de referencia del cambio unidireccional ($z=1,65$. 95% de probabilidad); SCA, síndrome coronario agudo.

En la **Tabla 48** se muestran los valores de Sp y VPN obtenidos en el diagnóstico de SCA para los VRC convencionales y asimétricos unidireccionales calculados para la us-TnT sérica en pacientes con ERCT. Debido al limitado tamaño muestral del estudio y a la baja prevalencia de SCA observada durante el periodo de seguimiento, en esta **Tabla** no se recogen los valores de Se y VPP al carecer de robustez estadística.

El VPN y la Sp estimadas para la us-TnT fueron superiores al 98% y al 87%, respectivamente. El empleo de los VRC asimétricos unidireccionales proporciona una Sp diagnóstica significativamente superior a la obtenida para los VRC calculados mediante el enfoque tradicional.

	us-TnT, ng/L
VRC ^a , %	37,1
VRCpositivo ^b , %	61,4
Rendimiento Diagnóstico de los VRC^a	
Sp ^c (IC95%) ^d , %	86,7 (75,6-92,7)
VPN ^e (IC95%) ^d , %	99,9 (96,9-100,0)
Rendimiento Diagnóstico de los VRC asimétricos^b	
Sp ^c (IC95%) ^d , %	99,9 (98,9-100,0) ^x
VPN ^e (IC95%) ^d , %	99,9 (98,9-100,0)

Tabla 48. Rendimiento diagnóstico estimado para los valores de referencia del cambio de la troponina T ultrasensible (us-TnT) en la detección de SCA en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable. VRC^a, valor de referencia del cambio unidireccional ($z=1,65$. 95% de probabilidad);^b, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) unidireccional obtenido mediante aproximación logarítmica ($z=1,65$. 95% de probabilidad); Sp^c, especificidad; IC95%^d, intervalo de confianza al 95% de probabilidad; VPN^e, valor predictivo negativo. ^x, diferencias significativas según los IC95%.

2.2. Rendimiento Diagnóstico de los Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento del Estado Nutricional

De acuerdo a su seguimiento clínico, 5 pacientes con ERCT no estable presentaron alteraciones nutricionales durante el periodo del estudio, tales como deterioro y pérdida de peso; siendo uno de estos sujetos diagnosticado de DEP *de novo* mediante parámetros antropométricos y dietéticos.

En las **Figuras 32-34** se muestra el porcentaje de cambio en la concentración sérica de albúmina y transferrina, y en el ratio entre las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos libres esenciales y no esenciales en estos pacientes. Como puede observarse, únicamente uno de los sujetos presentaba un cambio en la concentración de albúmina o transferrina superior a los VRC calculados en pacientes con ERCT; mientras que el cambio en el ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales alcanzaba la significación clínica en dos de los sujetos. Sin embargo, empleando los VRC estimados en individuos sanos estos dos pacientes eran correctamente identificados por las tres magnitudes.

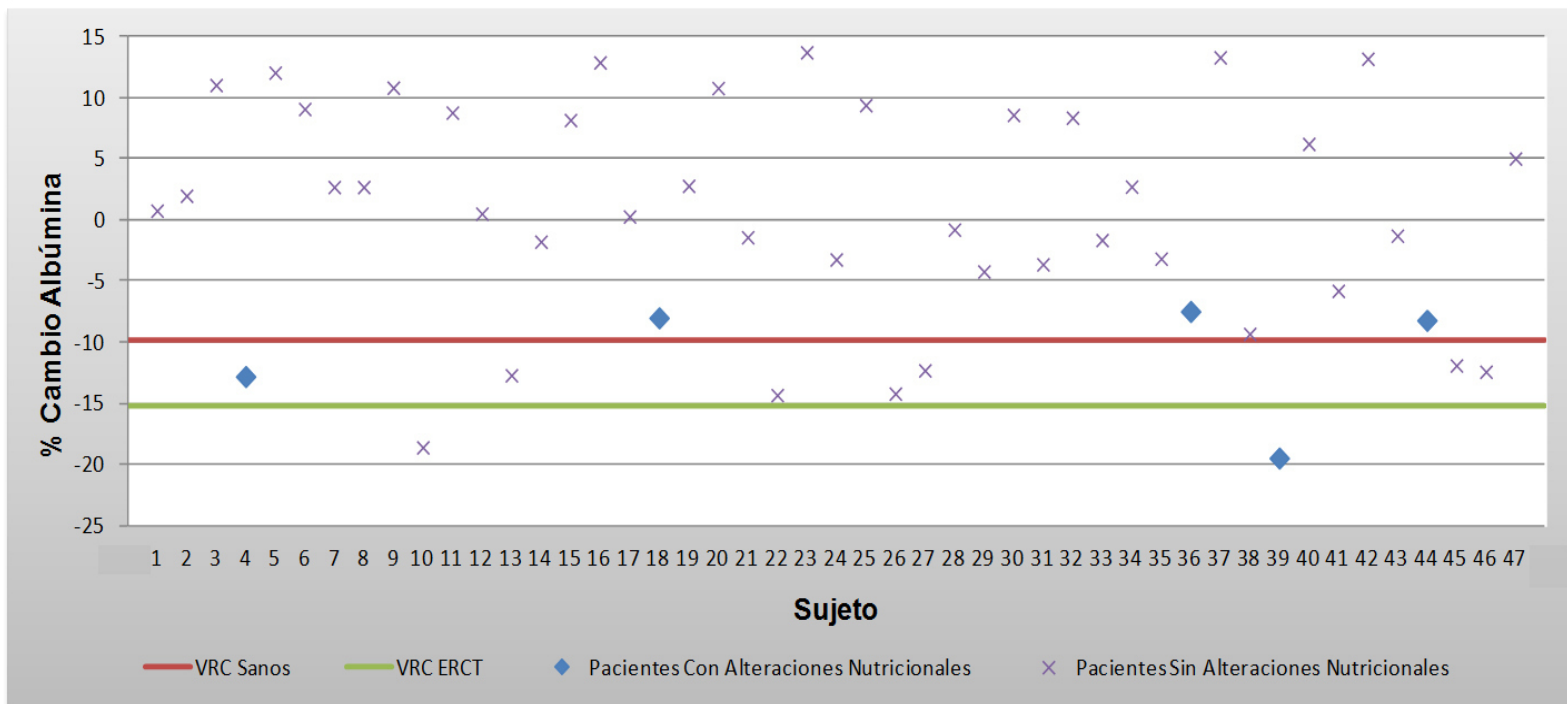


Figura 32. Variación de la concentración de albúmina observada en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable en los que se detectaron alteraciones nutricionales durante el periodo de seguimiento. VRC, valor de referencia del cambio unidireccional ($Z = 1,65$; 95% probabilidad); ERCT, enfermedad renal crónica terminal.

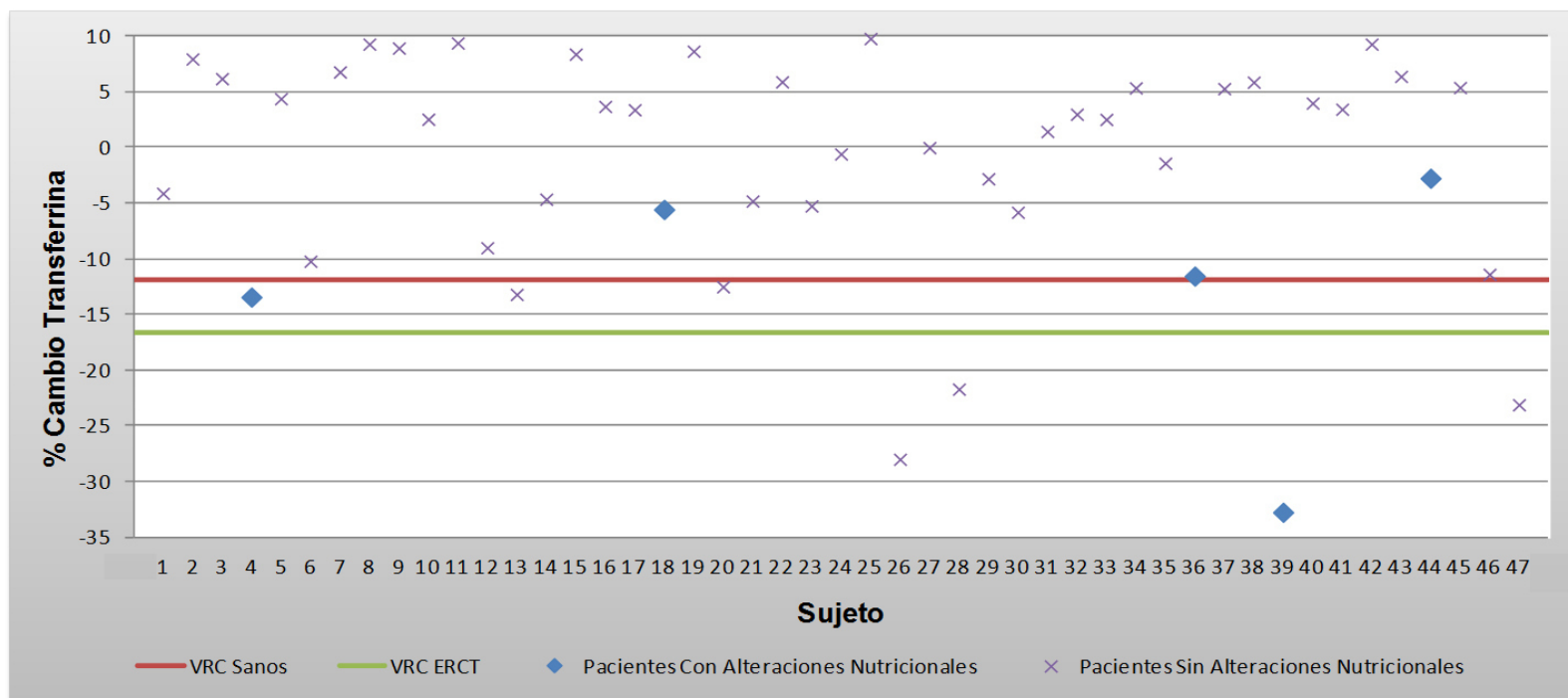


Figura 33. Variación de la concentración de transferrina observada en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable en los que se detectaron alteraciones nutricionales durante el periodo de seguimiento. VRC, valor de referencia del cambio bidireccional ($Z = 1,96$; 95% probabilidad); ERCT, enfermedad renal crónica terminal.

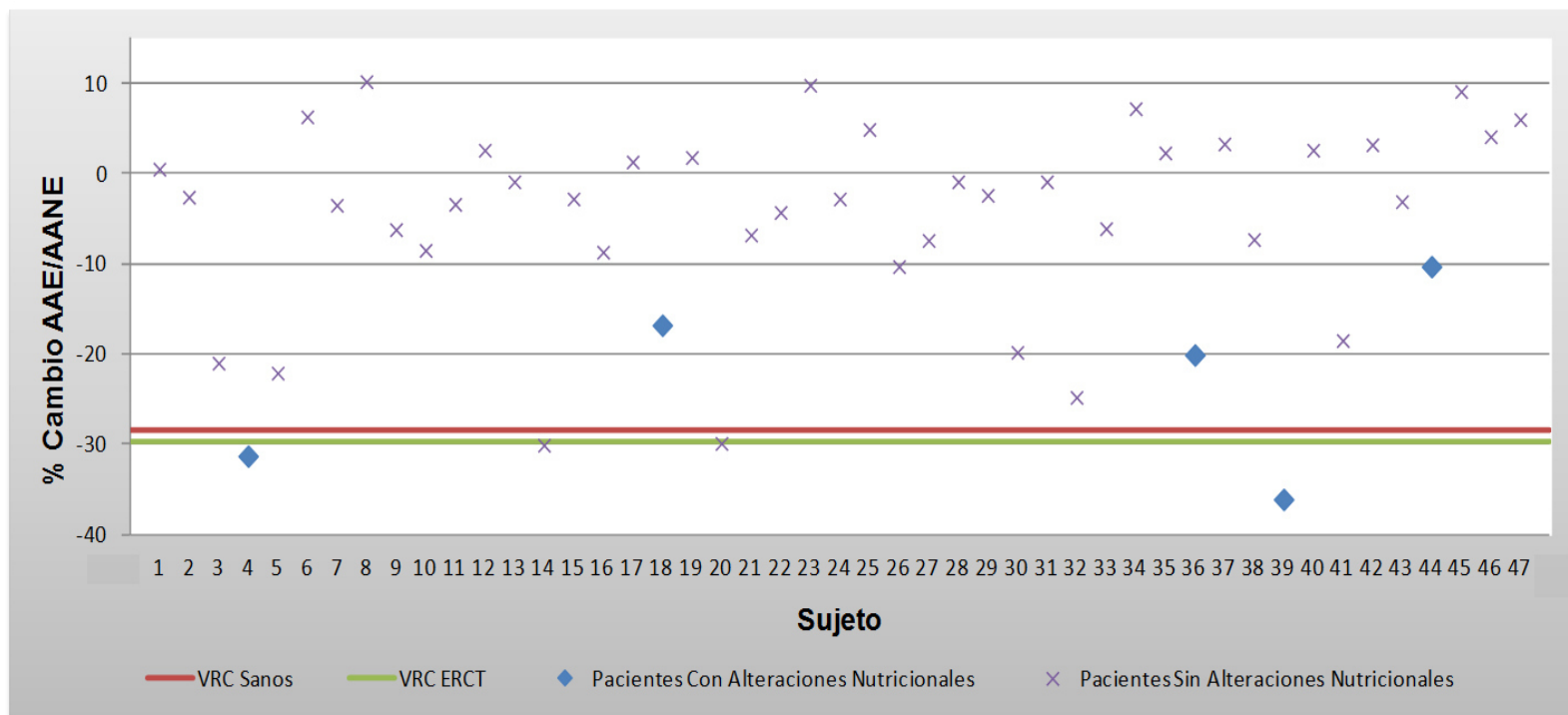


Figura 34. Variación de la concentración del ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales (AAE/AANE) observada en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable en los que se detectaron alteraciones nutricionales durante el periodo de seguimiento.

VRC, valor de referencia del cambio bidireccional ($Z = 1,96$; 95% probabilidad); ERCT, enfermedad renal crónica terminal.

En la **Tabla 49** se muestra el rendimiento diagnóstico (Se, Sp, VPN, VPP) obtenido para los VRC bidireccionales calculados en individuos sanos para la albúmina, la transferrina y el ratio entre aminoácidos libres esenciales y no esenciales. Los valores de Sp y VPN fueron superiores al 83% y al 91%, respectivamente; mientras que, probablemente a consecuencia de la baja prevalencia de alteraciones de tipo nutricional, la Se diagnóstica fue de tan solo el 40% para todas las magnitudes evaluadas.

	Albúmina, g/dL	TRF, mg/dL	AAE/AANE
VRC^a, %	9,8 ^b	11,9	28,4
Rendimiento Diagnóstico de los VRC^{a,b}			
Se^c (IC95%)^d,%	40,0 (18,6-82,9)	40,0 (18,6-82,9)	40,0 (18,6-82,9)
Sp^e (IC95%)^d,%	88,1 (77,1-99,1)	83,3 (70,8-95,2)	93,2 (80,6-99,0)
VPP^f (IC95%)^d,%	28,6 (9,5-69,2)	22,2 (8,3-54,9)	33,3 (6,5-99,9)
VPN^g (IC95%)^d,%	92,5 (83,1-99,9)	92,1 (82,2-99,9)	90,9 (81,3-99,9)

Tabla 49. Rendimiento diagnóstico estimado para los valores de referencia del cambio de la albúmina, la transferrina (TRF) y el ratio entre aminoácidos libres esenciales y no esenciales (AAE/AANE) en la detección de cambios en el estado nutricional de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable. VRC^a, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); ^b, VRC unidireccional (Z=1,65, 95% probabilidad); Se^c, sensibilidad; IC95%^d, intervalo de confianza al 95% de probabilidad; Sp^e, especificidad; VPP^f, valor predictivo positivo; VPN^g, valor predictivo negativo.

2.3. Rendimiento Diagnóstico de los Valores de Referencia del Cambio en el Seguimiento del Estado del Metabolismo Óseo-Mineral

De acuerdo a su historia y seguimiento clínico, durante el periodo del estudio 5 de los pacientes con ERCT presentaron un agravamiento del hiperparatiroidismo secundario previamente diagnosticado o una falta de respuesta al tratamiento farmacológico. En todos los casos, los cambios en el estado clínico fueron establecidos en función de la sintomatología y los resultados de técnicas de imagen complementarias como las radiologías simples o la densitometría ósea.

En las **Figuras 35-38** se muestra el cambio en la concentración de calcio corregido, fosfato, PTHi y 25-OH-vitamina D observada en estos pacientes. Como era de esperar, la PTHi fue el marcador bioquímico que mejor se correlacionaba con la lesiones observadas en los pacientes con ERCT no estable; permitiendo confirmar el diagnóstico correctamente a 4 de los 5 sujetos. Por el contrario, mientras que en tres pacientes la hiperfosfaturia alcanzaba significación clínica, únicamente un paciente presentaba un cambio en la concentración de calcio corregido o en la de 25-OH-vitamina D superior al VRC estimado en pacientes con ERCT.

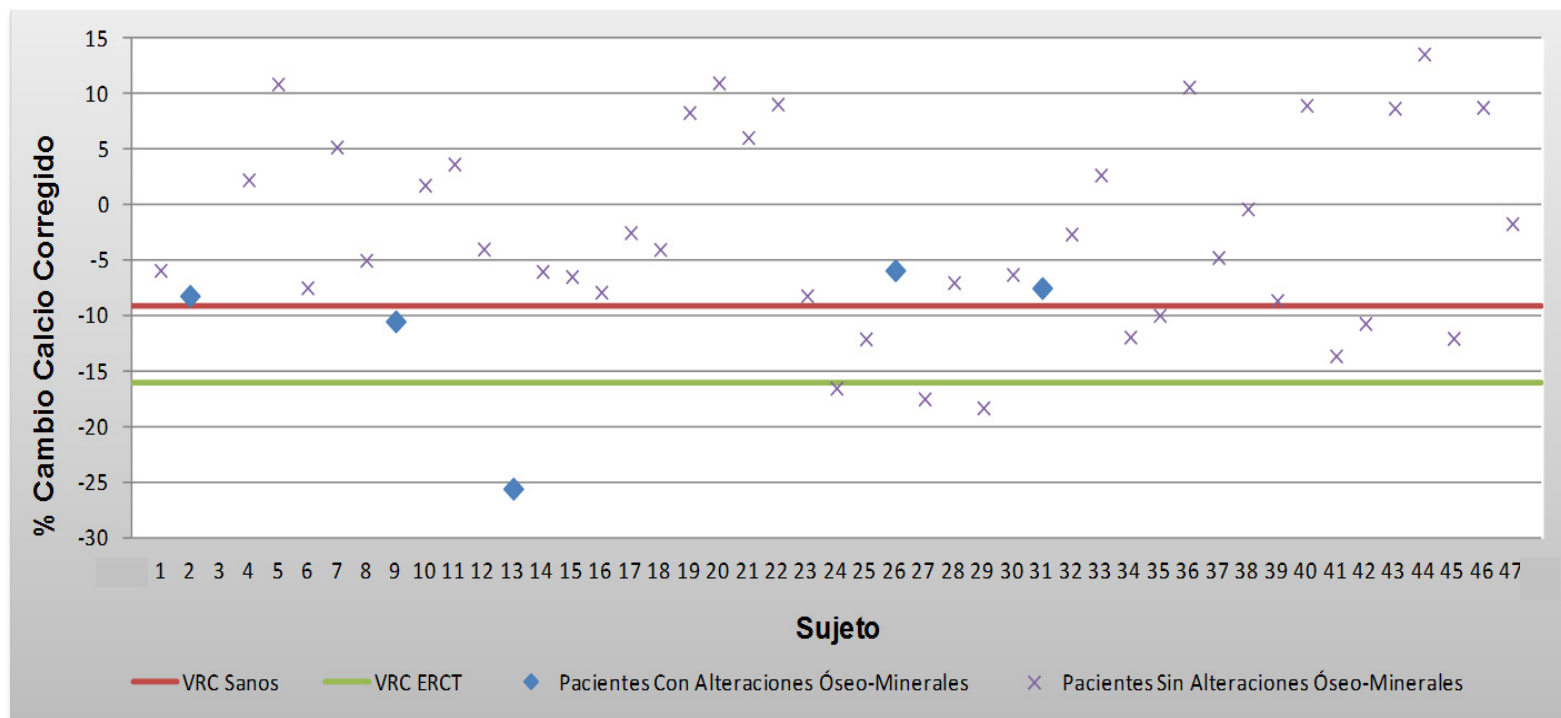


Figura 35. Variación de la concentración de calcio corregido observada en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable en los que se detectaron alteraciones del metabolismo óseo-mineral durante el periodo de seguimiento. VRC, valor de referencia del cambio bidireccional ($Z = 1,96$; 95% probabilidad); ERCT, enfermedad renal crónica terminal.

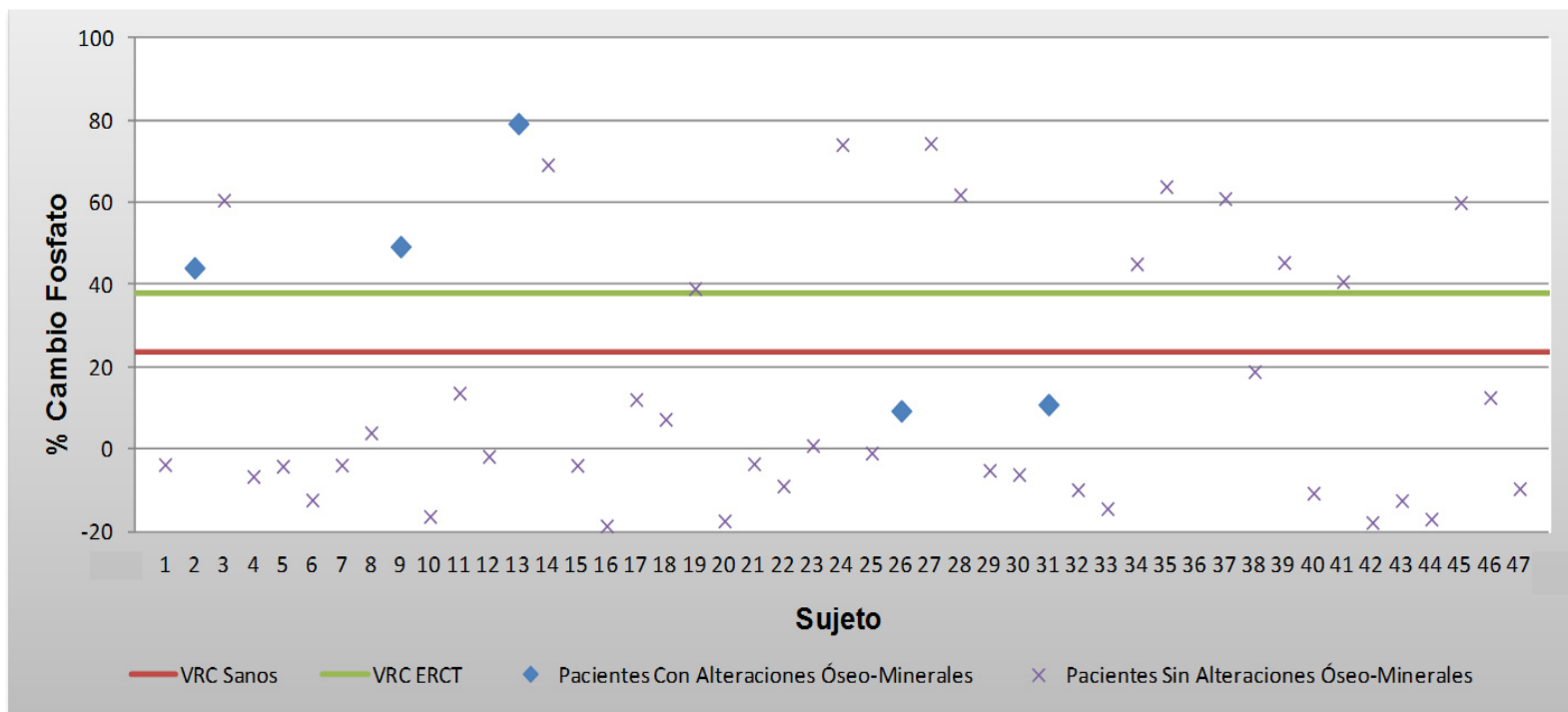


Figura 36. Variación de la concentración de fosfato observada en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable en los que se detectaron alteraciones del metabolismo óseo-mineral durante el periodo de seguimiento. VRC, valor de referencia del cambio bidireccional ($Z = 1,96$; 95% probabilidad); ERCT, enfermedad renal crónica terminal.

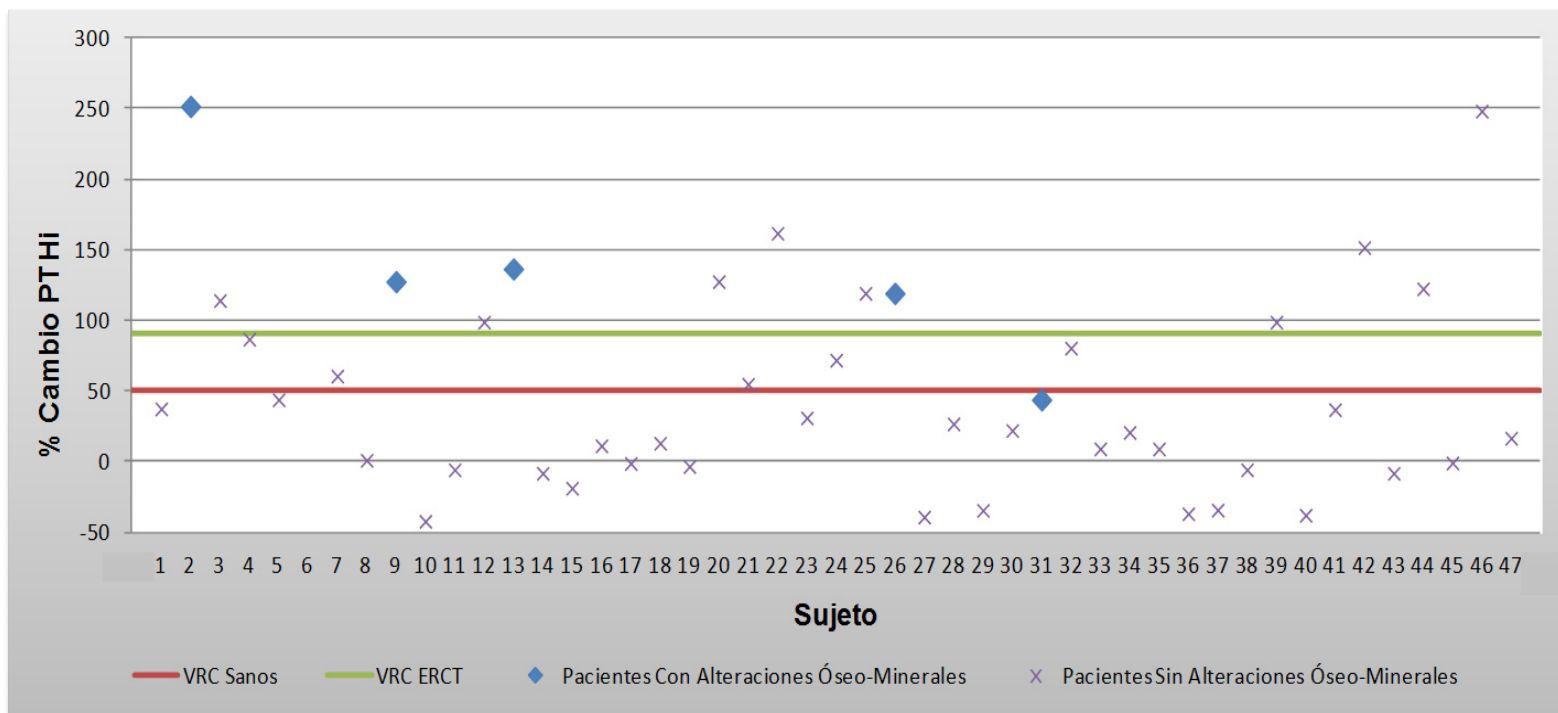


Figura 37. Variación de la concentración de hormona paratiroidea intacta (PTHi) observada en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable en los que se detectaron alteraciones del metabolismo óseo-mineral durante el periodo de seguimiento. VRC, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) bidireccional ($Z = 1,96$; 95% probabilidad) obtenidos mediante aproximación logarítmica; ERCT, enfermedad renal crónica terminal.

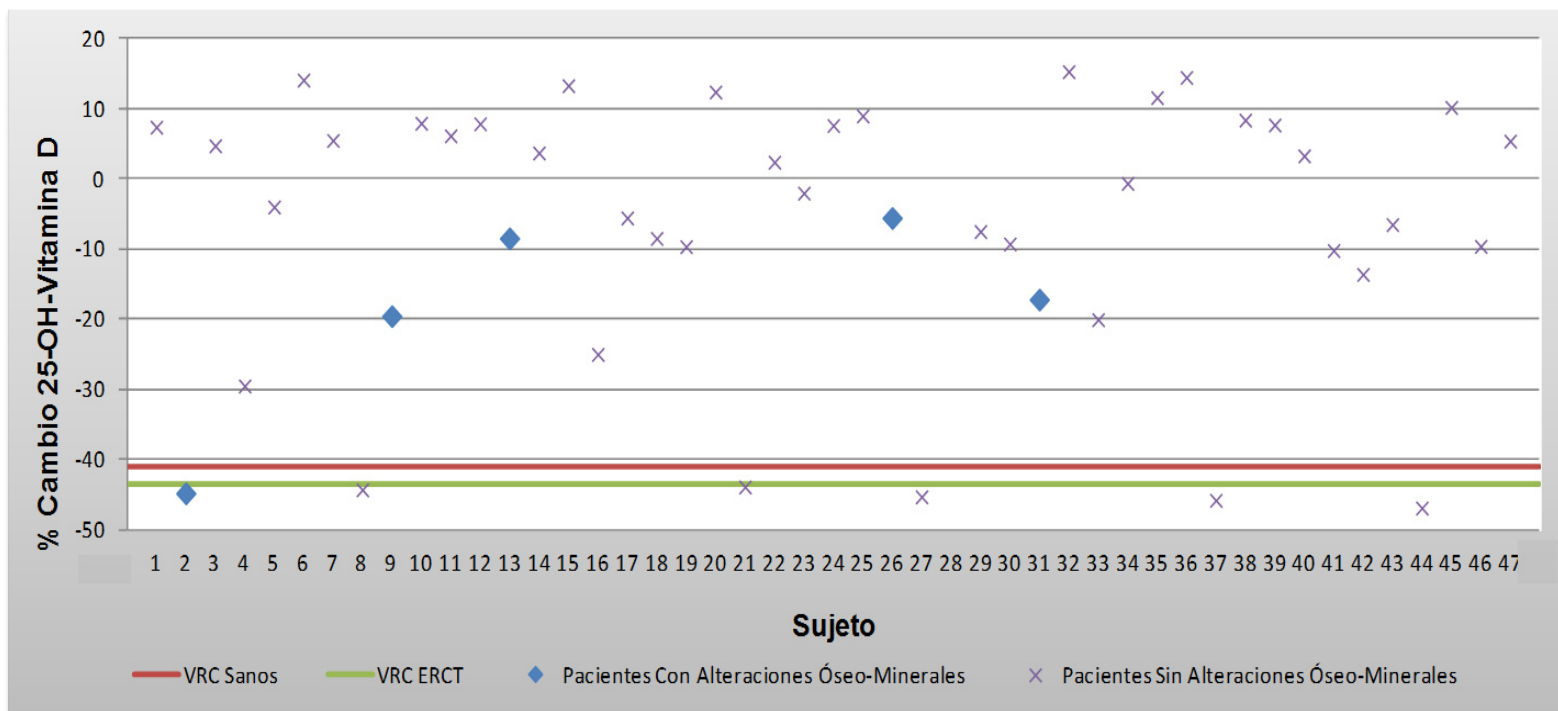


Figura 38. Variación de la concentración de 25-OH-vitamina D observada en los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estable en los que se detectaron alteraciones del metabolismo óseo-mineral durante el periodo de seguimiento. VRC, valor de referencia del cambio ascendente (positivo) unidireccional ($Z = 1,65$; 95% probabilidad) obtenidos mediante aproximación logarítmica; ERCT, enfermedad renal crónica terminal.

En la **Tabla 50** se muestra el rendimiento diagnóstico obtenido para los VRC bidireccionales (calcio, fosfato y PTHi) y unidireccionales (25-OH-vitamina D) calculados en pacientes con ERCT. Los valores de Sp y VPN estimados fueron superiores al 70% y al 90%, respectivamente, para todas las magnitudes evaluadas; observándose además que la PTHi plasmática presentaba una Se diagnóstica significativamente superior a la calculada para el resto de marcadores bioquímicos del metabolismo óseo-mineral.

	Calcio, mmol/L	P, mmol/L	PTHi, pg/mL	Vit D, ng/mL
VRC^{a,b,c}, %	16,3	38,0	90,2/-47,4	77,4/-43,6
Rendimiento Diagnóstico del VRC^{a,b,c}				
Se^d(IC95%)^e,%	20,0 (1,6-49,1)	60,2 (35,1-99,9)	80,8 (55,0-99,9) ^x	20,0 (1,6-49,1)
Sp^f(IC95%)^e,%	90,9 (80,8-99,9)	71,4 (56,6-86,3)	79,8 (53,9-84,2)	88,1 (77,1-99,1)
VPP^g(IC95%)^e,%	25,0 (6,5-53,7)	20,4 (6,2-43,6)	30,8 (8,3-59,8)	16,7 (1,3-54,8)
VPN^h(IC95%)^e,%	90,7 (80,9-99,9)	90,9 (79,6-99,9)	90,6 (79,0-99,9)	90,0 (79,5-99,9)

Tabla 50. Rendimiento diagnóstico estimado para los valores de referencia del cambio del calcio corregido, el fosfato (P), la hormona paratiroidea intacta (PTHi) y la 25-OH-vitamina D (Vit D) en la detección de cambios en el estado del metabolismo óseo-mineral de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal no estables. VRC^a, valor de referencia del cambio bidireccional (Z=1,96, 95% de probabilidad); ^b, para la PTHi se empleó el valor de referencia del cambio ascendente (positivo) bidireccional obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,96, 95% de probabilidad); ^c, para la Vit D se empleó el valor de referencia del cambio descendente (negativo) unidireccional obtenido mediante aproximación logarítmica (Z=1,65, 95% de probabilidad); Se^d, sensibilidad; IC95%^e, intervalo de confianza al 95% de probabilidad; Sp^f, especificidad; VPP^g, valor predictivo positivo; VPN^h, valor predictivo negativo. ^x, diferencias significativas según los IC95%.

Discusión

Capítulo 13. Diseño Experimental y Limitaciones del Estudio de Variación Biológica

La ERC se asocia con un importante incremento de la morbi-mortalidad en relación a la población general, siendo las ECV la principal causa de muerte tanto en pacientes en diálisis, como en estadios previos de la enfermedad. Por ello, los pacientes con ERC, y particularmente aquellos con ERCT, son considerados como sujetos de alto riesgo, recomendándose la aplicación de un plan integral y sistematizado para el control y reducción del RCV. Este plan integral deberá incluir, entre otros, la abstención de fumar, la realización de ejercicio físico, el control óptimo de la diabetes y de la PA, y la identificación y seguimiento de los principales FBRCV, tanto convencionales, como no convencionales y específicos de la uremia.

Los VRC, derivados de los datos de VB, se consideran actualmente la mejor herramienta disponible para el seguimiento y monitorización de pacientes con patologías crónicas. Sin embargo, si la enfermedad subyacente altera la naturaleza de la VB de la magnitud bioquímica evaluada, el empleo de los VRC estimados a partir de los datos de VB de individuos sanos, puede no ser apropiado. En los últimos años se ha publicado un número creciente de estudios con el objeto de examinar esta hipótesis, como, por ejemplo, en pacientes trasplantados renales para la detección precoz de rechazo³⁰⁸ o en pacientes con hepatopatía crónica para detectar carcinoma hepatocelular³⁰⁹. Estos estudios, los primeros en aplicar datos de VB estimados en pacientes con patologías crónicas estables, han demostrado que este enfoque permite la detección de cambios en el estado de salud del paciente antes de que estos se manifiesten clínicamente.

Por otra parte, las importantes limitaciones identificadas en los últimos años en las bases de datos internacionales de VB para individuos sanos, debidas fundamentalmente a la marcada heterogeneidad de los métodos de estimación empleados y al reducido número de publicaciones disponibles^{248,261,262}, han puesto de manifiesto la necesidad de disponer de nuevos trabajos que permitan completar, validar o rectificar los datos recogidos en estas bases de datos.

En este estudio, hemos generado datos de VB para los principales FBRCV, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, y, a partir de ellos, hemos calculado los VRC, el II y las especificaciones de calidad analítica deseables. El modelo experimental aplicado para la estimación de los datos de VB, ha tenido en

cuenta las recientes recomendaciones en cuanto a estandarización de los términos y abreviaturas que definen los componentes de VB²⁶⁶; así como los principales requisitos metodológicos descritos para asegurar la transferibilidad y fiabilidad de los datos proporcionados^{250,266}. Sin embargo, dado que el elevado tiempo de análisis de los aminoácidos libres plasmáticos impedía el estudio por duplicado de todas las muestras en la misma serie analítica según los protocolos clásicos^{247,251}, se desarrolló un procedimiento experimental alternativo basado en duplicar únicamente la primera muestra extraída en cada sujeto, lo que permitió estimar la VB_i en las condiciones reales de matriz y concentración de las muestras, eliminando la V_A interserie y manteniendo un número de especímenes y sujetos aceptable en términos estadísticos. Con el fin de mantener la homogeneidad y facilitar la comparación de los resultados obtenidos, este diseño experimental fue aplicado también al resto de FBRCV evaluados.

La selección de los pacientes con ERCT para su inclusión en el estudio de VB, se realizó siguiendo un estricto protocolo para asegurar su estabilidad clínica, evitando de esta forma que las variaciones fisiopatológicas asociadas a cambios en el estado de salud interfirieran en la estimación de los datos^{287,295}. Por otra parte, es necesario destacar que el cálculo de los IC95% de los componentes de VB estimados, ha permitido realizar una valoración objetiva, tanto de la influencia de la ERCT sobre la naturaleza de la VB de las magnitudes a estudio, como de la similitud de nuestros datos con los publicados en la bibliografía.

Clásicamente se consideraba que las estimaciones de los componentes de VB eran similares, independientemente del número de sujetos y muestras incluidos en el estudio, así como del intervalo de tiempo transcurrido entre la extracción de las muestras²⁴⁷. Sin embargo, Røraas et al²⁵⁰, en un estudio diseñado para la evaluación de la influencia de estos factores en la estimación de los componentes de VB, concluyeron que tanto el diseño del estudio, como el número de muestras y, fundamentalmente, la V_A del método de medida, afectaban considerablemente a la fiabilidad de los datos generados. Para la evaluación de las estimaciones de los CV_i y los VRC, estos autores utilizaron la amplitud de los IC95% (cuanto menor sea la amplitud mejor será la estimación) y el ratio entre la SD_A intraserie y la SD_i; observando que cuando este ratio era inferior a 1, la potencia estadística de los datos generados se aproximaba al 100%.

La fiabilidad de los estimados de la VB presentados en esta tesis doctoral ha sido evaluada de acuerdo con estos criterios; obteniéndose un ratio entre la SD_A y la SD_i

inferior a 1 para todas las magnitudes bioquímicas a estudio, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos. Las amplitudes de los IC95%, calculados como porcentaje del CV_I , oscilaron entre el 27% y el 48%; siendo los IC95% más amplios aquellos obtenidos para los CV_I del calcio corregido y la PCR sérica en individuos sanos. De acuerdo a las simulaciones publicadas por Røraas et al²⁵⁰, estos datos reflejan que el diseño experimental aplicado para el estudio de la VB puede estimar de forma fiable tanto los CV_I como los VRC; permitiendo, además, obtener unas adecuadas amplitudes normalizadas para los IC95%. Es necesario tener en cuenta, sin embargo, que las simulaciones desarrolladas por estos autores se basan en diseños experimentales en los que todas las muestras son analizadas, al menos, por duplicado; si bien señalan que, en aquellos casos en los que el ratio entre la SD_A y la SD_I sea inferior a 0,25, la anchura de los IC95% sería independiente del número de replicas analizadas²⁵⁰. Teniendo en cuenta los ratios obtenidos en el presente trabajo, la anchura de los IC95% de los CV_I generados para los lípidos y lipoproteínas séricas, la PCR, la ferritina, el folato, la 25-OH-vitamina D y la mayor parte de los aminoácidos libres plasmáticos no esenciales, no se reducirían más por incrementar el número de réplicas. Para el resto de FBRCV evaluados, la amplitud de los IC95% y, por tanto, la estimación de los CV_I podría mejorar mediante la aplicación de un modelo experimental en el que se incluyeran un mayor número de replicas, así como de sujetos y de muestras por sujeto²⁵⁰.

En cuanto a los VRC, aunque estos están considerados como una herramienta de gran utilidad en el seguimiento y monitorización de pacientes^{246,285,287}, su implantación en la práctica clínica habitual presenta limitaciones; las cuales han sido discutidas recientemente por Cooper et al³¹⁰, y abordadas en esta tesis doctoral. Entre estas limitaciones, destaca la dependencia de los VRC de la distribución de los datos, ya que el enfoque clásico para su cálculo asume una distribución gaussiana tanto para la V_A como para la V_B . Sin embargo, al estudiar la distribución de los datos de un número considerable de magnitudes de interés clínico, se ha observado que estas no se ajustan a un modelo normal o gaussiano²⁸⁷. Fokkema et al³⁰⁷, en un estudio diseñado para la estimación de los VRC de los péptidos natriuréticos en individuos sanos, observaron que los datos analíticos presentaban una distribución no gaussiana; por lo que, para su adecuada estimación, desarrollaron un nuevo método logarítmico para el cálculo de los VRC. Este método ha sido ampliamente validado, recomendándose actualmente su aplicación en todas aquellas magnitudes en las que la distribución observada sea sesgada o no gaussiana^{250,287,288}. Los datos de concentración observados para la mayoría de las magnitudes bioquímicas incluidas en

el presente estudio seguían una distribución no gaussiana, por lo que, con fines de comparación, se calcularon tanto los VRC convencionales como los VRC asimétricos derivados de la aproximación logarítmica.

Otra importante restricción observada en la aplicación de los VRC, está relacionada con el empleo generalizado de las puntuaciones Z bidireccionales, independientemente de las características de las magnitudes a estudio. Estas puntuaciones Z solo deberían ser empleadas cuando tanto el incremento como el descenso en la concentración de la magnitud evaluada van a ser consideradas como clínicamente significativas. En aquellos casos en los que la toma de decisiones clínicas requieran únicamente la detección de un incremento o la de un descenso significativo, las puntuaciones Z empleadas para el cálculo de los VRC deberían ser las unidireccionales o unilaterales. Katzmann et al³¹¹ fueron los primeros en aplicar esta hipótesis en un estudio sobre la VB de las proteínas monoclonales en suero y orina, en un grupo de pacientes con gammapatías monoclonales estables. Estos autores constataron que la mejor herramienta para la monitorización de la respuesta al tratamiento en este grupo de pacientes, eran los VRC unilaterales con una probabilidad del 95%. En consecuencia, y teniendo en cuenta las principales aplicaciones clínicas de los FBRCV evaluados, en este estudio se han calculado los VRC unidireccionales ($Z = 1,65$; 95% probabilidad) para la us-TnT sérica, la albúmina y las vitaminas plasmáticas B12, folato y 25-OH-vitamina D.

A la hora de evaluar los resultados presentados en esta tesis doctoral, es necesario tener en cuenta ciertas limitaciones en cuanto al diseño del estudio. La edad media de los sujetos incluidos en la cohorte de individuos sanos fue menor que la de los pacientes con ERCT, por lo que la comparación directa de los datos de VB debe realizarse con precaución. Así mismo, tanto el número de sujetos y muestras, como el periodo de seguimiento y el intervalo entre extracciones, fue distinto en individuos sanos y pacientes con ERCT. Sin embargo, teniendo en cuenta que ambos grupos se encontraban en una situación de estabilidad clínica, la influencia de las diferencias en el periodo de seguimiento podría considerarse menor. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que nuestros datos solo reflejan la situación pre-HD de los pacientes con ERCT, por lo que podrían ser necesarios más estudios que evalúen el efecto agudo de la ultrafiltración o de la DP, tanto en la concentración de los FBRCV evaluados, como en los datos de VB.

Capítulo 14. Variación Biológica de los Lípidos y las Lipoproteínas Séricas

Las dislipemias se consideran un factor mayor o causal, tanto del desarrollo de ECV¹³⁵, como de la aparición y progresión de la ERC8. En consecuencia, las principales guías clínicas para la Prevención Cardiovascular^{51,142}, y la Evaluación y Manejo de la ERC4, recomiendan el estudio y seguimiento del perfil lipídico desde estadios tempranos de la enfermedad; estableciéndose como principales objetivos terapéuticos, la disminución de la concentración sérica de c-LDL y c-noHDL.

Las concentraciones de los lípidos y lipoproteínas séricas observadas durante el periodo de seguimiento en los pacientes con ERCT clínicamente estable, muestran un limitado grado de cumplimiento de las recomendaciones establecidas por las guías NCEP ATP III¹⁴⁴ y ESC/EAS^{51,142} para la prevención cardiovascular en individuos de muy alto riesgo; siendo el porcentaje de pacientes con una mediana de la concentración de c-LDL superior a 70 mg/dL, y de c-noHDL superior a 100 mg/dL, del 83% y del 67%, respectivamente. Por contra, las concentraciones observadas en individuos sanos, podrían considerarse como óptimas según las recomendaciones establecidas por estas guías clínicas para individuos de bajo RCV.

Los pacientes con ERCT mostraron una mediana de la concentración sérica de TG y c-VLDL significativamente superior a la observada en individuos sanos; mientras que la mediana de la concentración de CT fue más baja, si bien esta diferencia no alcanzaba significación estadística. Estos hallazgos concuerdan con los estudios publicados sobre dislipemia en pacientes con ERCT, en los que la HD generalmente se asocia con concentraciones de CT normales o bajas, atribuidas a la elevada prevalencia de DEP en pacientes en HD²⁰²; e hipertrigliceridemia, consecuencia de una acumulación de lipoproteínas ricas en TG, como el c-VLDL¹³⁹. Así mismo, nuestro estudio muestra que un mayor periodo en el programa de HD parece estar relacionado con una disminución en la concentración sérica de CT y c-HDL, posiblemente debido a un mayor deterioro del estado nutricional²⁰².

A pesar de las diferencias observadas en las concentraciones de los lípidos y las lipoproteínas séricas, los componentes de VB estimados en pacientes con ERCT e individuos sanos, fueron semejantes. Los CV_i obtenidos para el CT, el c-HDL, el c-LDL y el c-noHDL en ambos grupos de sujetos, fueron significativamente menores a los

estimados para los TG y el c-VLDL. Estas diferencias parecen indicar la presencia de unos mecanismos de regulación homeostática menos estrictos para TG y c-VLDL, por lo que sus concentraciones estarían más influenciadas por variaciones fisiológicas o dietéticas. Por otra parte, el CV_I obtenido para el c-LDL directo fue similar al estimado para el c-LDL calculado mediante la fórmula de Friedewald; pudiendo explicarse esta similitud por el hecho de que la totalidad de los sujetos estudiados presentaban una concentración sérica de TG inferior a 400 mg/dL, valor a partir del cual la fórmula de Friedewald pierde validez³¹². Es necesario tener en cuenta que la relativamente baja concentración de TG observada en ambos grupos de sujetos, también limita los resultados obtenidos para el c-noHDL, ya que las principales guías clínicas recomiendan emplear su estimación como objetivo terapéutico en aquellos pacientes con dislipemias mixtas o hipertrigliceridemia^{51,142,144}. Por lo tanto, para validar definitivamente los datos de VB estimados para el c-LDL y el c-noHDL, serían necesarios estudios adicionales en los que se incluyeran sujetos con concentraciones séricas de TG que cubrieran un más amplio rango de concentraciones.

La comparación de los valores de VB publicados en la base de datos internacional²⁵⁶ para lípidos y lipoproteínas séricas, con los IC95% de los componentes de VB obtenidos en nuestro estudio, muestra que los CV_I son equivalentes a los publicados; mientras que los CV_G son significativamente más altos, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos. La estimación de los CV_G, a diferencia de la de los CV_I, es independiente del número de replicas analizadas o del número de muestras obtenidas por individuo, por lo que las diferencias encontradas podrían ser atribuidas al relativamente bajo número de sujetos incluidos en el estudio.

Los II derivados de los componentes de VB, revelan que los lípidos y las lipoproteínas séricas presentan una fuerte individualidad^{241,242,247}, lo que pone de manifiesto la escasa utilidad de los VR poblacionales en la interpretación del perfil lipídico, y apoya las recomendaciones internacionales sobre el empleo de valores discriminatorios fijos para el diagnóstico de dislipemia^{51,142,144}.

Al no encontrarse diferencias entre los datos de VB, los VRC obtenidos en individuos sanos podrían ser aplicados en el seguimiento del perfil lipídico de los pacientes con ERCT. Cabe destacar que el empleo de los VRC asimétricos permitiría evaluar de una forma más precisa la respuesta al tratamiento de los pacientes con dislipemia, tanto en la población general como en pacientes con ERCT. De acuerdo con esto, para el c-LDL y el c-noHDL, objetivos terapéuticos claves en la prevención y seguimiento de la dislipemia^{51,142,144}, una adecuada adhesión al tratamiento hipolipemiante se pondría de

manifiesto con una reducción en su concentración sérica de, al menos, un 21,5% y un 24,3%, respectivamente. En pacientes con ERCT, debido a su característico perfil lipídico¹³⁹, pueden cobrar especial importancia los VRC asimétricos obtenidos para los TG y el c-VLDL.

El consenso europeo establece que las mejores especificaciones de calidad para un laboratorio clínico son aquellas obtenidas a partir de los datos de VB²⁷¹. A consecuencia de los bajos CV_I estimados para el CT, el c-HDL y el c-LDL, las especificaciones de calidad analítica deseables calculadas para la imprecisión fueron relativamente estrictas (2,7, 4,7 y 3,7%, respectivamente), aunque éstas son habitualmente alcanzables por la mayoría de laboratorios clínicos. Por contra, las especificaciones de calidad deseables para la imprecisión obtenidas para los TG y el c-VLDL fueron considerablemente más permisibles (12,4 y 14,7%, respectivamente), por lo que para estas magnitudes el objetivo para la imprecisión debería ser el cumplimiento de las especificaciones óptimas ($0,25 CV_I = 6,2$ y $7,3\%$, respectivamente). Por otra parte, debido a los relativamente elevados CV_G obtenidos, las especificaciones de calidad deseables derivadas para el ES y el ET fueron superiores a las publicadas en la base de datos internacional de VB para los lípidos y lipoproteínas séricas²⁵⁶. Los criterios para la implantación de un tratamiento hipolipemiante están basados en valores discriminantes fijos, por lo que el empleo de estas especificaciones de calidad podría dar lugar a una deficitaria aplicación del tratamiento o a un inadecuado seguimiento de la respuesta al mismo. Por lo tanto, tanto para el ES como para el ET, serían necesarias unas metas analíticas más estrictas, como, por ejemplo, las recomendadas por la NCEP (3,0% y 8,9% para el CT; 4,0% y 12,0% para el c-LDL, respectivamente)²⁹⁹.

Capítulo 15. Variación Biológica de los Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular No Convencionales

1. Proteína C Reactiva

La inflamación desempeña un papel esencial tanto en la iniciación como en la progresión del proceso aterosclerótico, representando un vínculo fisiopatológico entre la formación de la placa y su rotura aguda^{85,86}. Esta relación se ve acentuada en la ERCT, ya que ésta se caracteriza por un estado inflamatorio crónico^{125,126}. La PCR sérica se considera un potente predictor independiente de morbi-mortalidad cardiovascular, no solo en pacientes con ERCT^{155,156,160}, sino también en la población general^{313,314}; asociándose al desarrollo de IAM, ACV, enfermedad arterial periférica o muerte súbita cardíaca³¹³.

Durante el periodo del estudio, el 44% de los pacientes con ERCT clínicamente estable presentaron una mediana de la concentración sérica de PCR superior a 5,0 mg/L, límite superior del IR definido para la población general. Estos resultados concuerdan con los datos publicados en la bibliografía sobre el estado inflamatorio en la ERCT, en los que la prevalencia de concentraciones elevadas de PCR se estima en torno al 50%^{125,126}. La etiología de este estado inflamatorio crónico se relaciona con factores tan diversos como la disminución del aclaramiento renal de citoquinas proinflamatorias, el estrés oxidativo, el DEP o las infecciones crónicas^{14,161}. Sin embargo, una de las cuestiones más interesantes en la investigación sobre la relación entre ERC e inflamación es, probablemente, la posibilidad de que la uremia se comporte como un estado proinflamatorio¹⁶¹. Mientras que en la población general un 15-20% de los monocitos circulantes son capaces de producir citoquinas, hasta el 50% de los monocitos de pacientes en HD producen estas moléculas proinflamatorias³¹⁵. Por otra parte, se ha observado que el ambiente urémico y la exposición a las membranas de diálisis, inducen la activación de los monocitos circulantes contribuyendo al proceso inflamatorio^{161,315}; lo que permitiría explicar el incremento en la concentración sérica de PCR observado en nuestro estudio en función del tiempo en HD, ya que estos efectos podrían intensificarse con el paso del tiempo.

Como medida de prevención cardiovascular, en la población general se recomienda medir la concentración de PCR sérica en periodos de estabilidad metabólica;

estableciéndose tres categorías de riesgo que se corresponden, aproximadamente, con los terciles de la concentración media de PCR en la población normal: Riesgo bajo, <1,0 mg/L; Riesgo Medio, 1,0-3,0 mg/L; Riesgo Alto, >3,0 mg/L³¹⁴. La mediana de la concentración sérica de PCR obtenida durante el periodo del estudio en 9 de los individuos sanos, fue inferior a 1,0 mg/L; mientras que 11 de los pacientes con ERCT presentaron una mediana superior a 3,0 mg/L. Es necesario señalar, no obstante, que las concentraciones de PCR que predicen un peor pronóstico en la ERC aún no están claramente establecidas, oscilando ampliamente entre 1,1 y 15 mg/L, según los distintos autores^{155,316,317}.

El CV_I ($\cong 46\%$) generado para la PCR sérica, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, fue relativamente alto en relación a su CV_G ($\cong 90\%$). Estos datos son similares a los descritos para determinadas citoquinas proinflamatorias, como los de la IL-6 ($CV_I = 48,5\%$)³¹⁸, lo que era de esperar dada su estrecha relación fisiopatológica. La comparación de los componentes de VB estimados en ambos grupos de sujetos, no mostró la presencia de diferencias significativas, lo que indica que la ERCT no altera la naturaleza de su VB. Estos resultados concuerdan con los datos de la bibliografía, en los que, para la mayoría de las magnitudes no específicas de órgano, se observan valores de CV_I similares en pacientes y sujetos sanos²⁹⁵. Así mismo, los datos de VB obtenidos en este estudio, están en concordancia con los recogidos en las bases de datos internacionales para individuos sanos²⁵⁶.

El II obtenido en individuos sanos muestra que la PCR sérica presenta una fuerte individualidad^{241,284}, resaltando el valor de la comparación con resultados previos del propio paciente a través del VRC²⁸⁵. A consecuencia del elevado CV_I estimado tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT, el porcentaje de cambio necesario para considerar una variación en su concentración sérica como clínicamente significativa, sería superior al 100%. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que, en el contexto de un proceso inflamatorio, pueden llegar a detectarse incrementos en su concentración sérica de hasta 1000 veces sobre el valor basal^{158,159}. Por otra parte, el empleo de los VRC asimétricos facilitaría la monitorización de la respuesta al tratamiento de pacientes con inflamación aguda o crónica, de tal forma que la detección de una disminución de, aproximadamente, un 70% en la concentración de PCR sérica, podría ser considerada como clínicamente significativa.

Las especificaciones de calidad deseables para la imprecisión, derivadas de los datos de VB, fueron considerablemente permisibles (22,7%), así como fácilmente alcanzables con los medios tecnológicos disponibles en la actualidad. Por lo tanto,

para la PCR sérica el objetivo para la imprecisión analítica debería ser alcanzar los estándares de calidad óptimos ($0,25 CV_1 = 11,4\%$)^{276,277}. En cuanto a las especificaciones deseables para el ES (24,9%) y el ET (62,4%), los resultados obtenidos en nuestro estudio fueron semejantes a los publicados en la base de datos internacional de VB para individuos sanos²⁵⁶.

2. Troponina T Ultrasensible

Junto con la PCR sérica, la us-TnT se considera uno de los FBRCV más potentes disponibles en la actualidad^{190,191}. La presencia de concentraciones elevadas de TnT en pacientes con ERCT sin evidencias o síntomas de isquemia miocárdica, ha sido ampliamente documentada en las dos últimas décadas^{179,180,181}; relacionándose con un aumento en la morbi-mortalidad cardiovascular y global^{188,189}. El reciente desarrollo de los ensayos de alta sensibilidad ha permitido la detección de mínimos incrementos en la concentración sérica de us-TnT, tanto en pacientes con patologías crónicas como en la población general; facilitando, de esta forma, la identificación de aquellos sujetos con ECV silente o infraestimada^{168,175,177}. Paradójicamente, este aumento de la sensibilidad analítica ha planteado dudas sobre la adecuada interpretación y relevancia clínica de estos incrementos³¹⁹.

La mediana de la concentración de us-TnT observada en la totalidad de los individuos sanos durante el periodo del estudio, fue inferior al percentil 99 de una población de referencia (14 ng/L); mientras que el 98% de los pacientes con ERCT clínicamente estable, mostraron concentraciones de us-TnT superiores a este punto de corte; observándose, así mismo, un aumento significativo en su concentración sérica en función del tiempo de permanencia en el programa de HD. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por Willging et al³²⁰, quienes concluyeron que la concentración de TnT presentaba una asociación directa e independiente con el tiempo en HD. El mecanismo que conduce a la liberación de TnT cardiaca en pacientes asintomáticos con ERCT, aún no está claramente establecido; si bien actualmente se cree que este incremento se relaciona, fundamentalmente, con la aparición o el agravamiento de una coronariopatía severa silente, así como con el estrés cardiaco secundario a la HD^{183,184,187}. El estrés cardiaco de los pacientes con ERCT es muy superior al de la población general, debido a factores tales como la HTA, la hipervolemia, la anemia o las alteraciones circulatorias producidas a consecuencia de las sesiones de HD^{184,187,189}. Por otra parte, aunque el mecanismo de eliminación de la troponina no se conoce con exactitud, actualmente se cree que la

TnT podría fragmentarse en moléculas lo suficientemente pequeñas para ser eliminadas por vía renal; lo que permitiría explicar la gran prevalencia de concentraciones elevadas de troponina en pacientes con ERCT^{185,186}. Independientemente de las causas que llevan a este incremento crónico en su concentración sérica, estos estudios reflejan la conveniencia de considerar a la us-TnT como un biomarcador para la prevención primaria de la ECV en los pacientes con ERCT, especialmente en aquellos con un mayor tiempo de permanencia en el programa de HD.

El CV_I estimado para la us-TnT, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, fue relativamente bajo en relación al CV_G; lo que parece indicar una limitada tasa de recambio de los miocitos cardíacos, en presencia de tasas de recambio celular o de aclaramiento renal de TnT que difieren considerablemente entre sujetos. Es necesario destacar que el CV_I obtenido en pacientes con ERCT (14,7%), fue más del doble que el estimado en individuos sanos (5,9%), lo que indica que la ERCT modifica la variación de la us-TnT alrededor de su punto de ajuste homeostático. Resultados similares han sido publicados por Jacobson et al¹⁷⁵ y Mbagaya et al³²¹, en sendos estudios en los que se incluyeron 15 pacientes con ERCT, monitorizados durante un periodo de 6 meses y 10 semanas, respectivamente. Estos autores no proporcionan estimaciones sobre la VB de la us-TnT en individuos sanos, sin embargo los CV_I estimados para pacientes con ERCT (CV_I = 13% y 10,5%, respectivamente) son semejantes a los obtenidos en nuestro estudio.

Por el contrario, Aakre et al³²², en un reciente estudio en el que incluyeron 20 individuos sanos y 19 pacientes con ERCT, monitorizados durante un periodo de 10 semanas; generaron datos de VB similares a los aquí presentados para individuos sanos, aunque no encontraron diferencias significativas entre los valores de CV_I obtenidos en ambos grupos de sujetos. Esta discrepancia en los CV_I de los pacientes con ERCT podría estar relacionada con las diferencias en el número de muestras disponibles, así como en los periodos de seguimiento; lo que conllevaría el riesgo de subestimar la VB_I real de la us-TnT en pacientes con ERCT. La posible influencia de los distintos periodos de seguimiento en las diferencias observadas en nuestros datos de VB, podría ser menor considerando la situación de estabilidad clínica de ambos grupos; sin embargo, sería necesario la realización de estudios adicionales para confirmar las diferencias observadas.

De forma llamativa, el CV_I obtenido para la us-TnT en individuos sanos, difiere considerablemente de los resultados obtenidos en los primeros artículos publicados a

este respecto por Vasile et al³²³ (19 individuos sanos, 8 semanas de seguimiento) y Frankenstein et al³²⁴ (15 individuos sanos, 4 semanas de seguimiento), quienes estimaron un CV_I del 94% y del 30%, respectivamente; siendo estos últimos los valores actualmente referenciados en la base de datos internacional de VB²⁵⁶. Las principales causas para estas discrepancias serían las diferencias en el diseño experimental y, fundamentalmente, la mayor imprecisión analítica descrita en estos primeros estudios de VB. Un elevado porcentaje de los sujetos seleccionados por estos autores presentaban concentraciones de us-TnT cercanas o inferiores al LB del método de medida, rango en el que las mediciones están habitualmente sujetas a una gran imprecisión. De hecho, Browning et al³²⁵ aconsejan no estimar los datos de VB si los ensayos disponibles para una determinada magnitud bioquímica no cumplen unos requisitos analíticos mínimos, que aseguren que el componente analítico sea inferior al 20% del SD_{TI}. La fuerte influencia de la imprecisión analítica en la estimación de los datos de VB ha sido recientemente demostrada en el estudio de Røraas et al²⁵⁰.

El bajo II obtenido (<0,6) en los individuos sanos muestra que la us-TnT presenta una marcada individualidad^{241,284}, lo que confirma el limitado valor de los IR poblacionales en el diagnóstico de IAM, y apoya la hipótesis de que la realización de determinaciones seriadas es el mejor enfoque para una adecuada interpretación clínica de los cambios en la concentración sérica de us-TnT, tanto en la población general, como en pacientes con ERCT^{172,173}.

El VRC directamente obtenido para la us-TnT en individuos sanos está en concordancia con el incremento mínimo (20%) recomendado por las principales guías de práctica clínica como evidencia de IAM en sujetos con infartos recurrentes o con concentraciones crónicamente elevadas de TnT¹⁷²; umbral establecido teniendo en cuenta no la VB de la troponina cardiaca, sino la imprecisión analítica descrita para la mayoría de los ensayos en el rango de concentraciones indicativas de IAM. Sin embargo, considerando la distribución asimétrica de los datos de la us-TnT sérica, el diagnóstico de IAM en la población general requeriría de la identificación de un mayor incremento en los análisis seriados de la concentración de us-TnT (29,1% o 35,5%, para los VRC uni- y bidireccionales, respectivamente). Por el contrario, los VRC estimados en pacientes con ERCT fueron aproximadamente el doble de ese porcentaje recomendado, por lo que considerar como clínicamente significativo un incremento en la concentración de us-TnT del 20%, estaría asociado a un importante aumento del número de falsos positivos. Por lo tanto, para un adecuado seguimiento clínico de los pacientes con ERCT, en los que el riesgo de SCA es muy elevado,

deberían emplearse los VRC derivados de sus propios datos de VB; destacando la utilidad de los VRC asimétricos unidireccionales, al ser un incremento en la concentración sérica de us-TnT el único cambio considerado como clínicamente relevante. El incremento potencial del número de falsos negativos a consecuencia del empleo de estos más amplios VRC propios, podría verse atenuado por el menor tiempo necesario para el análisis seriado de us-TnT, el cual está indicado en 3-6 horas tras la aparición de los síntomas.

No obstante, los VRC derivados de los datos de VB estimados en individuos sanos, podrían desempeñar un importante papel en la identificación del daño miocárdico en estadios tempranos de la ERC, ya que habitualmente ocurre una transición progresiva desde estados libres de enfermedad a los estadios patológicos iniciales. Por otra parte, medir la concentración sérica de us-TnT en periodos de estabilidad clínica, podría llegar a ser un requisito normal con el fin de establecer una concentración basal que permitirá futuras comparaciones a través de los VRC, facilitando, de esta forma, tanto el seguimiento clínico de estos pacientes, como el diagnóstico de IAM.

A consecuencia del bajo CV_i estimado para la us-TnT en individuos sanos, las especificaciones de calidad analíticas deseables para la imprecisión, el ES y el ET fueron relativamente estrictas, difícilmente alcanzables teniendo en cuenta las características metodológicas de los ensayos disponibles en la actualidad. Sin embargo, las especificaciones de calidad mínimas para la imprecisión ($0,75 CV_i = 4,4\%$), son habitualmente alcanzables en la mayoría de laboratorios.

Capítulo 16. Variación Biológica de los Factores Bioquímicos de Riesgo Cardiovascular Específicos de la Uremia

1. Marcadores Bioquímicos de Desgaste Proteico-Energético

En los últimos años ha quedado de manifiesto el importante papel que desempeña el DEP en la morbi-mortalidad, no solo global, sino también cardiovascular, de los pacientes con ERCT; hasta el punto de que actualmente el DEP es considerado como un potente factor de RCV^{195,196}. Aunque las principales guías clínicas señalan a la albúmina y, en menor medida, a la transferrina, como los mejores marcadores bioquímicos disponibles para el seguimiento del estado nutricional^{194,197}, el estudio del perfil de aminoácidos libres plasmáticos podría proporcionar información complementaria acerca del estado de nutrición proteica de estos pacientes^{214,215}.

Durante el periodo del estudio, los pacientes con ERCT clínicamente estable presentaron concentraciones de albúmina y transferrina séricas significativamente inferiores a las obtenidas en individuos sanos, observándose, además, que 14 de los pacientes mostraban una concentración media de albúmina inferior al objetivo terapéutico establecido por las guías K/DOQI²⁰⁷ para el adecuado control nutricional de los pacientes en HD (4 g/dL). Así mismo, el porcentaje de pacientes en los que se identificó una depleción proteica leve o moderada, atendiendo a la concentración media de transferrina sérica²¹⁰, fue del 61% y del 11%, respectivamente. A pesar de estos resultados, ninguno de los pacientes con ERCT incluidos en el estudio tenía antecedentes o síntomas clínicos de DEP o malnutrición; datos que se corroboraron al aplicar los criterios diagnósticos recomendados por la ISRNM¹⁹³.

Como se ha señalado con anterioridad, la mediana de la concentración sérica de PCR obtenida en aproximadamente la mitad de los pacientes con ERCT, era sugestiva de la presencia de un estado inflamatorio crónico. Tanto la albúmina como la transferrina séricas son reactantes de fase aguda de signo negativo²⁰⁸, por lo que la relativamente baja concentración media observada para estas magnitudes en pacientes con ERCT, podría estar más relacionada con una disminución de su síntesis hepática, a consecuencia de esta inflamación crónica, que con un deterioro nutricional relevante. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la transferrina es un

marcador muy sensible a las alteraciones nutricionales precoces^{208,210}, por lo que estos resultados también podrían indicar la presencia de DEP en estado latente o subclínico.

A diferencia de lo observado para la albúmina y la transferrina séricas, la concentración media de aminoácidos libres plasmáticos esenciales y no esenciales obtenida en pacientes con ERCT fue significativamente superior a la observada en individuos sanos. Estos resultados concuerdan con los publicados por Chuang et al³²⁶, los cuales observaron que la concentración pre-diálisis de aminoácidos libres plasmáticos en 25 pacientes con ERCT, era aproximadamente el doble que la observada en el grupo control. La disminución de la filtración glomerular de los aminoácidos libres podría explicar el incremento observado en su concentración plasmática; si bien, varios autores señalan al aumento en la tasa del catabolismo proteico, como la causa más probable de esta acumulación^{214,215,326}. Diversos factores asociados a la uremia, tales como la acidosis metabólica³²⁷, la activación de sistemas proteolíticos como el sistema ubiquitina-proteasoma³²⁸, la inflamación crónica³²⁹, o las alteraciones de tipo endocrino como la resistencia a la insulina³³⁰, conducen, en su conjunto, a un importante incremento del catabolismo proteico corporal de los pacientes con ERC. En pacientes con ERCT, además, es necesario tener en cuenta factores relacionados con la propia diálisis, como la pérdida de sangre o la sobrecarga de volumen^{193,194}; lo que permitiría explicar el moderado incremento observado en la concentración de los aminoácidos libres plasmáticos con el tiempo de permanencia en HD, ya que es de esperar que las alteraciones secundarias a la diálisis se acentúen con el paso del tiempo.

Por el contrario, el ratio entre aminoácidos libres esenciales y no esenciales, obtenido en pacientes con ERCT (0,42), fue del orden del calculado para individuos sanos (0,44); no observándose, además, diferencias en función del tiempo en HD. Este ratio es considerado como uno de los mejores marcadores de nutrición proteica²¹⁵, por lo que estos resultados parecen confirmar que los pacientes con ERCT presentaban una adecuada ingesta nutricional durante el periodo de seguimiento.

Así mismo, los resultados de nuestro estudio muestran que, mientras que la concentración plasmática de fenilalanina observada en pacientes con ERCT, fue significativamente más alta que la obtenida en individuos sanos ($p < 0,05$), la concentración de tirosina fue significativamente más baja; siendo el ratio Tyr/Phe calculado en ambos grupos de sujetos de 0,82 y 1,13, respectivamente. Boirie et al³³¹, fueron los primeros autores en observar que los pacientes con ERCT presentaban un ratio Tyr/Phe significativamente menor al de la población general; atribuyéndose esta

disminución a una reducción de la tasa de conversión de fenilalanina en tirosina. El riñón desempeña un papel fundamental en la homeostasis de la concentración plasmática de tirosina; siendo el responsable, junto con el hígado, de un 50% de la conversión de fenilalanina en tirosina³³². En la ERCT, la pérdida de parénquima renal conduce a una disminución de la actividad del enzima fenilalanina hidroxilasa en el riñón, con la consiguiente acumulación de fenilalanina y disminución de la concentración plasmática de tirosina^{331,332}.

La comparación de los CV_I obtenidos en pacientes con ERCT e individuos sanos, a través de los IC95%, no reveló la presencia de diferencias significativas; lo que sugiere que la ERCT no altera ni el punto de ajuste homeostático de los marcadores nutricionales evaluados, ni la variación en torno a este punto de ajuste. Los CV_I generados tanto para la albúmina y la transferrina séricas, como para los aminoácidos libres plasmáticos fueron relativamente bajos (< 20%), similares a los publicados para otras proteínas y marcadores nutricionales en individuos sanos, como la α 1-antitripsina³³³, las inmunoglobulinas³³⁴ o las vitaminas C y B6³³⁵. Estos resultados reflejan la presencia de unos estrictos mecanismos de regulación homeostática, mediante los cuales la concentración de estas magnitudes varía, en condiciones fisiológicas, dentro de unos rangos muy estrechos. En cuanto al perfil de aminoácidos libres plasmáticos, la histidina, la fenilalanina y la valina presentaron los menores CV_I de todo el perfil de aminoácidos (< 10%) en ambos grupos de sujetos. Sin embargo, el CV_I estimado para los aminoácidos esenciales totales fue similar al obtenido para los no esenciales, así como al calculado para el ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales; lo que sugiere que sus mecanismos de regulación homeostática son, en gran medida, comunes.

Prior et al³³⁶, en un estudio realizado para la evaluación de aquellos factores que afectaban a la concentración plasmática de los aminoácidos libres en mujeres de edad avanzada sin ERC, generaron valores de CV_I para los aminoácidos libres plasmáticos equivalentes a los obtenidos tanto en nuestros individuos sanos como en los pacientes con ERCT; mientras que los CV_G fueron, en general, inferiores a los estimados en nuestro caso para ambos grupos. El distinto número de sujetos, junto con las marcadas diferencias entre las características de los individuos sanos seleccionados, permitirían explicar las discrepancias observadas. Mientras que en nuestro estudio se seleccionaron tanto hombres como mujeres con un amplio rango de edad, las mujeres seleccionadas por Prior et al³³⁶ tenían entre 70 y 79 años de edad. Se ha documentado una escasa relación entre la VB y el sexo^{248,255}, sin embargo, pueden

encontrarse numerosas referencias sobre los cambios que acontecen en la concentración plasmática de los aminoácidos libres con la edad^{211,337}; por lo que, al haber seleccionado individuos sanos con un mayor rango de edad, era de esperar que los datos derivados de nuestro estudio reflejaran una mayor VB_G .

En cuanto a los CV_G , los valores estimados para la albúmina y la transferrina séricas en pacientes con ERCT, fueron significativamente mayores a los obtenidos en individuos sanos²⁵⁶. Estas diferencias, similares a las encontradas por Fraser et al³³⁸ en una cohorte de pacientes con ERC en estadios previos a diálisis, podrían estar relacionadas con los distintos intervalos de tiempo entre extracciones aplicados²⁵⁰. Por contra, los CV_G generados para los aminoácidos libres plasmáticos fueron equivalentes en ambos grupos de sujetos. Así mismo, la comparación de los componentes de VB estimados para la albúmina y la transferrina séricas, con los recogidos en la base de datos internacional de VB²⁵⁶, muestra que los CV_i están en concordancia con los publicados; mientras que los CV_G son significativamente más altos, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, debido, probablemente, al relativamente bajo número de sujetos incluidos en nuestro estudio. Los datos incluidos en esta base de datos para los aminoácidos libres plasmáticos proceden de los resultados presentados en esta tesis doctoral, los cuales fueron publicados por la revista *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* en el año 2010³³⁹.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el II, los marcadores nutricionales evaluados presentaban una fuerte individualidad ($II < 0,6$)^{241,284}, lo que refleja la escasa utilidad de los VR; recomendándose, por tanto, su comparación con resultados previos del propio paciente a través de los VRC derivados de los datos de VB²⁸⁵.

La ausencia de diferencias significativas entre los datos de VB estimados en ambos grupos de sujetos, justificaría que los VRC simétricos unidireccionales y bidireccionales calculados para la albúmina y la transferrina séricas en individuos sanos, respectivamente, se empleasen en el seguimiento del estado nutricional de los pacientes con ERCT. Sin embargo, es necesario destacar que, de acuerdo a los IC95%, los VRC calculados para ambas magnitudes en pacientes con ERCT, fueron significativamente más altos que los obtenidos en individuos sanos. No obstante, teniendo en cuenta la elevada prevalencia de DEP en este grupo de pacientes^{156,202}, así como el hecho de que la detección de una disminución clínicamente significativa en la concentración de albúmina o transferrina no conlleva la realización de pruebas invasivas o la aplicación de tratamientos farmacológicos agresivos^{194,197,207}, el empleo

de los VRC derivados de individuos sanos, al ser estos más estrictos, podría ser la opción más recomendable para el seguimiento de los pacientes con ERCT.

Por otra parte, de acuerdo a lo esperado, los VRC obtenidos para los aminoácidos libres plasmáticos, fueron significativamente más altos que los calculados para la albúmina y la transferrina sérica; estimándose porcentajes próximos o superiores al 30% para todo el perfil de aminoácidos. Estos datos son del orden de los publicados para otros metabolitos plasmáticos relacionados con la dieta³³⁵, y sugieren una menor utilidad del perfil de aminoácidos en el seguimiento y monitorización del estado nutricional, tanto de los pacientes con ERCT como de la población general. No obstante, el empleo del VRC calculado para el ratio entre aminoácidos esenciales y no esenciales podría completar y clarificar la información proporcionada por la albúmina y la transferrina séricas, especialmente en pacientes con ERCT, ya que su concentración plasmática no se ve influenciada por factores distintos al DEP como la inflamación crónica o la anemia²¹³, ambas comorbilidades de elevada prevalencia en la ERC^{125,126,226}.

Debido a los bajos CV_I estimados tanto para la albúmina y la transferrina séricas, como para los aminoácidos libres plasmáticos, las especificaciones de calidad deseables para la imprecisión, derivadas de estos datos de VB, fueron considerablemente estrictas, aunque estas metas analíticas son habitualmente alcanzables en nuestro laboratorio. Las especificaciones de calidad deseables para el ES y el ET calculadas para la albúmina (1,9 y 5,0%, respectivamente) y la transferrina (2,2 y 5,4%, respectivamente) séricas, fueron ligeramente superiores a las publicadas en la base de datos internacional de VB (1,4 y 4,1% para la albúmina; 1,3 y 3,8% para la transferrina, respectivamente). Estas discrepancias están relacionadas con la mayor VB_G observada en nuestro estudio para ambas magnitudes, consecuencia, probablemente, del relativamente bajo número de sujetos evaluados.

2. Marcadores Bioquímicos de Anemia

Aunque la deficiencia de EPO es la etiología más común de la anemia en la ERC^{10,19}, las principales guías clínicas recomiendan valorar la existencia de otras posibles causas que puedan contribuir al desarrollo, mantenimiento y agravamiento del estado anémico en este grupo de pacientes. Entre ellas destacan por su prevalencia o influencia en la morbi-mortalidad, el déficit de hierro, y de las vitaminas plasmáticas folato y vitamina B12^{225,226}.

Las concentraciones de transferrina y ferritina séricas obtenidas durante el periodo de seguimiento, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, no eran sugestivas de una disminución de la biodisponibilidad o de las reservas férricas^{165,205}. De hecho, 15 de los pacientes con ERCT, presentaban una mediana de la concentración sérica de ferritina, superior al límite superior del IR definido para la población general. La ferritina es un reactante de fase agudo positivo¹⁶⁵, por lo que estos resultados podrían ser explicados por el estado inflamatorio crónico observado en esta cohorte de pacientes. La inflamación es responsable del mantenimiento y agravamiento de la anemia en la ERC mediante un proceso mediado por citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 y la IL-6, o el TNF α . Estas citoquinas inhiben la eritropoyesis y la producción de EPO, aumentan la síntesis de hepcidina (proteína involucrada en la regulación de la reabsorción de hierro en el organismo) y alteran el mecanismo de regulación del hierro, bloqueando su liberación por las células del sistema reticuloendotelial¹⁰. Por lo tanto, en este contexto los resultados normales obtenidos tanto para la ferritina como para la transferrina séricas (reactante de fase aguda negativo), podrían enmascarar la presencia de un estado deficitario de hierro, especialmente en aquellos pacientes a tratamiento con agentes estimulantes de la EPO¹⁰.

Las deficiencias de vitamina B12 y folato se consideran causas poco frecuentes pero de gran relevancia en el establecimiento del diagnóstico y tratamiento de la anemia en la ERC. Los resultados obtenidos para estas magnitudes durante el periodo de seguimiento, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, sugieren la ausencia de un déficit vitamínico. Estos resultados concuerdan con los datos de la bibliografía, donde la prevalencia de anemia megaloblástica, tanto en la población general como en pacientes con ERCT, se estima en torno a un 5%^{224,226}.

La comparación de los componentes de VB estimados para la ferritina sérica y las vitaminas plasmáticas B12 y folato en pacientes con ERCT e individuos sanos, no

reveló la presencia de diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que la ERCT no altera la naturaleza de la VB de estas magnitudes bioquímicas. El CV_I obtenido para la ferritina sérica ($\cong 12\%$) en ambos grupos de sujetos fue significativamente mayor al estimado para la transferrina ($\cong 4\%$), lo que indica que, a pesar de su relación fisiológica, estas magnitudes no comparten mecanismos de regulación homeostática, especialmente en su respuesta a la inflamación.

Basándonos en los IC95%, el CV_I generado para la ferritina sérica en ambos grupos de sujetos fue equivalente al publicado en la base de datos internacional de VB para individuos sanos²⁵⁶; mientras que el CV_G fue significativamente más alto. De los 6 artículos referenciados en esta base de datos, cinco de ellos, o bien no proporcionan datos de CV_G , o los datos proporcionados habían sido estimados en una cohorte exclusivamente de mujeres. Van Hoydonck P et al³⁴⁰, por el contrario, estimaron CV_G similares a los generados en nuestro estudio (56%) en un grupo de 25 individuos sanos de ambos sexos. Estas discrepancias confirman algunas de las limitaciones de las bases de datos internacionales de VB en su estado actual de revisión^{265,266}.

Para la vitamina B12 y el folato, los CV_I estimados, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, fueron relativamente bajos en relación a los CV_G ; observándose además que la vitamina B12 presentaba una VB_i significativamente inferior a la del folato en ambos grupos de sujetos. Esto sugiere que la concentración plasmática de vitamina B12 está sujeta a una regulación homeostática mucho más estricta, relacionada probablemente con la alta eficacia descrita para el mecanismo de conservación corporal de esta vitamina^{165,209}. Hasta donde tenemos conocimiento, no existen datos en la bibliografía sobre la VB de la vitamina B12 y el folato en pacientes con ERC o ERCT; siendo el de McKindley et al³⁴¹ el único estudio disponible en individuos sanos. Estos autores, en una investigación diseñada para evaluar la variación estacional de la homocisteína total plasmática en un grupo de 20 individuos sanos durante 1 año de seguimiento, estimaron valores de CV_I para la vitamina B12 (15%) y el folato (24%) ligeramente superiores a los obtenidos en nuestros sujetos (9% y 19%, respectivamente). Por el contrario, los CV_G obtenidos por estos autores son equivalentes a los estimados en nuestro estudio, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos.

Los resultados obtenidos para el II muestran que la ferritina y las vitaminas B12 y folato, presentan una elevada individualidad ($II < 0,6$), lo que refleja el limitado valor de los VR poblacionales para distinguir un resultado inusual en un individuo mediante la realización de un análisis aislado. Por lo tanto, una adecuada interpretación de los

resultados analíticos de estas magnitudes requerirá su comparación con resultados previos del propio paciente, siendo la mejor herramienta disponible para ello, los VRC derivados de los datos de VB.

Al no haber diferencias en los componentes de VB, los VRC calculados en individuos sanos, tanto para la ferritina como para la vitamina B12 y el folato, podrían ser empleados para el seguimiento de los pacientes con ERCT. Por otra parte, los VRC asimétricos bidireccionales calculados para la ferritina sérica deberían utilizarse para una monitorización más precisa de la respuesta al tratamiento de los pacientes con un déficit de hierro, tanto en la población general como en los pacientes con ERCT; siendo un incremento de un 50% sobre la concentración basal de ferritina, indicativo de un aumento de las reservas férricas del organismo. Similares conclusiones pueden extraerse sobre los VRC calculados para la vitamina B12 y el folato, donde el empleo de los VRC asimétricos unidireccionales, permitiría un mejor seguimiento de los pacientes con un déficit vitamínico, al ser el descenso o el incremento en su concentración sérica, el único cambio a considerar en un contexto clínico.

Por último, las especificaciones de calidad derivadas de los datos de VB obtenidos para la ferritina, la vitamina B12 y el folato, fueron relativamente estrictas; requiriéndose, para alcanzar un nivel de prestación analítico deseable, que los métodos de medida empleados en su determinación presenten CV_A inferiores al 10%. A pesar de ello, estas metas analíticas son razonablemente alcanzables con la metodología disponible en la actualidad. Por otra parte, las especificaciones de calidad deseables para el ES y el ET calculadas para la vitamina B12 y el folato fueron similares a los valores recogidos en la base de datos internacional de VB²⁵⁶; mientras que, a consecuencia del mayor CV_G estimado en nuestro estudio, las especificaciones derivadas de los datos de VB de la ferritina sérica (11,7% y 21,7%, respectivamente) fueron prácticamente el doble que los publicados en esta base de datos (5,2% y 16,9%, respectivamente).

3. Marcadores Bioquímicos del Metabolismo Óseo-Mineral

En individuos sanos los riñones regulan la homeostasis del calcio y del fosfato a través de mecanismos activos de reabsorción tubular. En los pacientes con ERC, sin embargo, estos mecanismos homeostáticos están seriamente comprometidos, dando lugar a una serie de alteraciones del metabolismo óseo-mineral que producen un impacto significativo en la morbilidad y en la mortalidad¹⁰³.

Las concentraciones de calcio corregido y fosfato séricos observadas en 13 pacientes con ERCT clínicamente estable, cumplían con las recomendaciones establecidas por las guías SEN para la prevención y manejo de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en la ERC¹⁰³. Por contra, el grado de cumplimiento observado para las recomendaciones sobre la concentración plasmática de PTHi fue únicamente del 28%, siendo el número de pacientes que presentaban una mediana de la concentración de PTHi inferior a 100 pg/mL, de 7. Estas concentraciones de PTHi, si bien fueron significativamente superiores a las observadas en individuos sanos ($p < 0,05$), se consideran insuficientes para mantener un adecuado remodelado óseo en la ERCT; asociándose a la presencia de enfermedad ósea adinámica o de bajo remodelado^{103,227}. La prevalencia de la enfermedad ósea adinámica ha ido en aumento en los últimos años, debido, probablemente, a una combinación de factores, entre los que destacan el incremento de la edad media de la población en HD, el uso de dializados con un elevado contenido de calcio o el frecuente empleo de análogos de la vitamina D^{236,342}. Este tipo de alteración del metabolismo óseo-mineral, se relaciona tanto con un aumento del riesgo de fracturas óseas, como con un importante incremento del RCV, debido a que la inadecuada incorporación del calcio y el fosfato al hueso favorece el desarrollo de calcificaciones vasculares^{103,236,342}. De forma llamativa, nuestro estudio muestra que un mayor periodo de permanencia en el programa de HD parece estar relacionado con un incremento en la concentración de PTHi, posiblemente debido a una disminución de los receptores VDR a nivel paratiroideo.

El número de pacientes con ERCT y de individuos sanos en los que se detectó una concentración de 25-OH-vitamina D deficiente o insuficiente (< 20 ng/mL) durante el periodo de seguimiento, fue de 9 (50%) y de 3 (27%), respectivamente. Existen numerosas referencias en la bibliografía sobre la elevada prevalencia de la deficiencia de 25-OH-vitamina D, tanto en la población general³⁴³, como en pacientes con ERCT^{233,342}; demostrándose, además, que, de acuerdo a lo observado en nuestro

estudio, los pacientes con ERCT con frecuencia presentan una concentración de 25-OH-vitamina D significativamente inferior a la de la población general^{233,236,342}. Si bien los mecanismos que conducen a que la concentración de 25-OH-vitamina D sea inferior en pacientes con ERCT que en la población general aún no se conocen con exactitud, estos podrían estar relacionados con la pérdida urinaria del complejo de la 25-OH-vitamina D con su proteína específica³⁴⁴. Por otra parte, evidencias recientes muestran que la capacidad del hígado para producir 25-OH-vitamina D está disminuida en ratas urémicas³⁴⁵.

Los CV_I generados para el calcio corregido y el fosfato séricos, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos, fueron considerablemente bajos en relación a sus CV_G. Estos resultados, similares a los publicados para otros minerales esenciales como el magnesio o el zinc³⁴⁶, indican la presencia de unos estrictos mecanismos de regulación homeostática que ejercen, en condiciones fisiológicas, un férreo control del metabolismo óseo-mineral. De acuerdo a los IC95%, los CV_I estimados en los pacientes con ERCT fueron semejantes tanto a los obtenidos en individuos sanos, como a los publicados en la base de datos internacional de VB²⁵⁶. Por el contrario, los CV_G obtenidos en ambos grupos fueron significativamente más altos que los recogidos en esta base de datos²⁵⁶, posiblemente debido al relativamente bajo número de sujetos incluidos en el estudio.

El CV_I estimado para la PTHi en ambos grupos de sujetos, fue significativamente más elevado que el obtenido para el calcio corregido y el fosfato séricos; lo que refleja que el estricto control homeostático de estos es consecuencia de la adaptabilidad de la respuesta paratiroidea a la biodisponibilidad de la vitamina D, de la absorción intestinal de Ca y P, y del estado de su eliminación renal. En cuanto a la 25-OH-vitamina D, el CV_I observado en pacientes con ERCT e individuos sanos, fue similar tanto al obtenido en nuestro estudio para el folato y los aminoácidos libres plasmáticos, como al publicado para otras vitaminas, como la vitamina C o la B6³³⁵; lo que parece indicar que, en general, los factores y mecanismos implicados en la regulación homeostática de estas magnitudes son, en gran medida, comunes.

La bibliografía disponible sobre la VB de la PTHi plasmática y la 25-OH-vitamina D sérica en individuos sanos es muy limitada, siendo los únicos estudios específicamente diseñados disponibles hasta la fecha, los publicados por Viljoen et al^{347,348}. Estos autores estimaron, en una cohorte de 20 individuos sanos con similar rango de edad, periodo de seguimiento (Octubre-Noviembre) e intervalo entre extracciones al aplicado en nuestro estudio, valores de CV_I significativamente más

altos para la PTHi (25,3%)³⁴⁷ y más bajos para la 25-OH-vitamina D (12,1%)³⁴⁸. En cuanto a los CV_G, mientras que los valores obtenidos para la PTHi son similares; los estimados para la 25-OH-vitamina D son aproximadamente la mitad. Estas discrepancias podrían estar relacionadas con el diferente número de sujetos, así como con el distinto tratamiento estadístico de los datos. Mientras que Viljoen et al^{347,348} emplearon las fórmulas clásicas descritas por Fraser y Harris²⁴⁶, la estimación de los componentes de VB mediante un ANOVA, previa eliminación de valores aberrantes intra e inter-sujeto, proporcionaría a nuestros resultados una mayor potencia estadística²⁶⁰. Por otra parte, teniendo en cuenta la falta de estandarización descrita entre los distintos ensayos de PTHi^{237,238}, el empleo de métodos de medida diferentes (Roche Diagnostics vs Beckman Coulter), podría contribuir a explicar las diferencias observadas entre los CV_I.

La comparación de los componentes de VB generados en pacientes con ERCT e individuos sanos, muestra que los datos de VB obtenidos para la 25-OH-vitamina D fueron semejantes en ambos grupos; mientras que el CV_I estimado para la PTHi fue significativamente más elevado en pacientes con ERCT (19,3%) que en individuos sanos (10,4%); lo que sugiere que la enfermedad subyacente altera la variación entorno a su punto de ajuste homeostático, como ha sido descrito para algunos marcadores específicos de órgano como, por ejemplo, para la creatinina en pacientes trasplantados renales³⁴⁹. Estos resultados concuerdan con los publicados por Gardham et al³⁵⁰, quienes, en un estudio realizado para evaluar la variabilidad de la PTHi en 22 pacientes con ERCT en HD, observaron similares diferencias entre los CV_I estimados en pacientes y en el grupo control.

De acuerdo a lo descrito para la mayoría de magnitudes bioquímicas de interés clínico²⁸³, todos los marcadores evaluados presentaban una elevada individualidad (II < 0,6)²⁴¹, lo que pone de manifiesto la limitada utilidad de los IR poblacionales en el seguimiento de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral, tanto en la población general como en los pacientes con ERCT; recomendándose, por tanto, su comparación con resultados previos del propio paciente a través de los VRC²⁸⁵.

Al no haberse observado diferencias entre los datos de VB estimados en ambos grupos de sujetos, los VRC calculados en individuos sanos para el calcio, el fosfato y la 25-OH-vitamina D, podrían ser empleados en el seguimiento de los pacientes con ERCT; recomendándose para la monitorización de la respuesta al tratamiento de un déficit vitamínico, el empleo de los VRC unidireccionales asimétricos calculados para la 25-OH-vitamina D. Sin embargo, es necesario señalar que, de acuerdo a los IC95%,

los VRC calculados en pacientes con ERCT para el calcio y el fosfato séricos fueron significativamente más altos que los obtenidos en individuos sanos. A pesar de estas diferencias, y teniendo en cuenta la elevada prevalencia de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en pacientes con ERCT^{231,232}, y su gran repercusión en la morbi-mortalidad global y cardiovascular^{103,227,229}; el empleo de los VRC más estrictos derivados de los datos de VB estimados en individuos sanos, podrían ser la herramienta más adecuada para la monitorización de estos pacientes.

Por el contrario, para la PTHi plasmática, a consecuencia de las diferencias observadas entre los componentes de VB, el empleo de los VRC calculados en individuos sanos para el seguimiento de los pacientes con ERCT, implicaría un incremento en el número de falsos positivos; con la consecuente repercusión en la toma de decisiones clínicas, como, por ejemplo, en los cambios en la dosis de tratamiento o en la realización de pruebas invasivas^{295,297}. Por otra parte, el empleo de los VRC asimétricos permitiría una mejor monitorización del hiperparatiroidismo secundario, tanto en la población general como en pacientes con ERCT, pudiendo considerarse una disminución en su concentración plasmática de un 34% y un 47%, respectivamente, como indicativa de una adecuada respuesta al tratamiento.

Las especificaciones de calidad deseables derivadas de los datos de VB generados para los marcadores del metabolismo óseo-mineral, fueron relativamente estrictas; con valores recomendados para la imprecisión analítica que oscilaban entre el 2 y el 10%. No obstante, estas metas analíticas son razonablemente alcanzables en la mayoría de laboratorios. En cuanto al ES y el ET, las especificaciones de calidad deseables calculadas para la PTHi fueron similares a las recogidas en la base de datos internacional de VB²⁵⁶; mientras que, a consecuencia de la mayor VB_G estimada en nuestros individuos sanos, las especificaciones de calidad obtenidas para el calcio corregido y el fosfato séricos fueron prácticamente el doble que las publicadas.

Capítulo 17. Utilidad Práctica de los Valores de Referencia del Cambio

Desde su introducción hace más de 30 años²⁸⁶, los VRC se han postulado como unas herramientas objetivas y fiables para el seguimiento y la monitorización bioquímica de pacientes con patologías crónicas o agudas^{246,285}. Sin embargo, a pesar del renovado interés observado en los últimos años tanto en la VB como en los propios VRC^{287,288}, existen muy pocos estudios que evalúen su eficacia real para el seguimiento de pacientes con patologías clínicas concretas.

Se ha realizado una evaluación práctica de la utilidad de los VRC para la detección y seguimiento de alteraciones en el estado cardiovascular, nutricional y del metabolismo óseo-mineral, a corto y medio plazo, en una cohorte de pacientes con ERCT no estable. Durante un periodo de seguimiento de 6-9 meses, estos pacientes fueron monitorizados bioquímica y clínicamente; empleándose los VRC más adecuados para cada magnitud evaluada: asimétricos, bidireccionales, unidireccionales; teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de VB en pacientes estables. En aquellos sujetos en los que se identificó un cambio clínicamente significativo en la concentración de alguno de los marcadores evaluados, se realizó una revisión de su historia clínica con el fin de determinar si estas variaciones se correlacionaban con cambios relevantes en el estado de salud. En todos los casos se consideró una alteración significativa en el estado clínico, cuando ésta había sido diagnosticada mediante métodos no basados exclusivamente en los resultados analíticos: angiografía, tomografía computarizada craneal, ecocardiograma y electrocardiograma (eventos cardiovasculares); manifestaciones clínicas y técnicas de imagen complementarias (alteraciones óseo-minerales); parámetros antropométricos y dietéticos (DEP).

Durante el periodo de monitorización bioquímica, los pacientes con ERCT no estable presentaron una concentración de PTHi, PCR y us-TnT significativamente más alta que la observada en pacientes estables; mientras que la concentración de los lípidos y las lipoproteínas séricas fue significativamente menor. Uno de los principales criterios aplicados para la selección de la cohorte de pacientes clínicamente estables, fue la ausencia de comorbilidades frecuentemente asociadas al incremento de estos FBRCV, como las ECV, el hiperparatiroidismo secundario o el DEP; por lo que era de esperar observar diferencias relevantes entre ambos grupos de sujetos.

El porcentaje de pacientes no estables con un diagnóstico de ECV previo al inicio del estudio fue del 40%; datos similares a los publicados sobre la prevalencia de ECV en pacientes con ERC en estadios G4-G5^{53,54}. El análisis de los principales FBRCV, mostró que estos sujetos presentaban una concentración sérica de PCR y us-TnT, significativamente más alta que la observada tanto en pacientes estables como en el resto de pacientes no estables. Diversos estudios señalan que la concentración sérica de estas magnitudes se correlaciona tanto con el grado de aterosclerosis¹⁶², como con la gravedad y extensión de la HVI^{163,185,186,187}.

La concentración de PTHi plasmática y fosfato sérico era significativamente más elevada en aquellos pacientes diagnosticados de hiperparatiroidismo secundario que en el resto de pacientes con ERCT, tanto estables como no estables; mientras que la concentración de calcio y 25-OH-vitamina D era significativamente menor. Aunque estos pacientes estaban a tratamiento con captadores de fósforo o con vitamina D sintética; los resultados obtenidos reflejan una inadecuada adhesión o respuesta al mismo, posiblemente debido a la presencia de un hiperparatiroidismo refractario. Este es muy frecuente en pacientes en HD, y se ha relacionado con una elevada autonomía de la glándula paratiroidea, que hace que su respuesta a los estímulos fisiológicos o farmacológicos sea prácticamente nula²³⁵.

De acuerdo a lo esperado, la concentración de los marcadores bioquímicos relacionados con el estado nutricional fue significativamente más baja en los pacientes con DEP que en el resto de pacientes con ERCT, tanto estables como no estables. Así mismo, el ratio entre aminoácidos libres esenciales y no esenciales calculado en este subgrupo de pacientes (0,35), fue significativamente menor al estimado en pacientes estables (0,42), lo que sugiere un inadecuado aporte dietético²¹⁵; mientras que la concentración de PCR sérica fue significativamente más alta. Los efectos metabólicos y nutricionales de la inflamación crónica son muchos, e incluyen síntomas como la anorexia urémica, la proteólisis del músculo esquelético y el aumento del catabolismo proteico corporal²⁰⁵. Estos mecanismos patogénicos, junto con la insuficiencia de la ingesta, contribuirían al establecimiento y agravamiento del DEP en este grupo de pacientes.

La monitorización del estado de salud de los pacientes con ERCT no estable, permitió detectar la aparición de eventos clínicamente relevantes en 16 de los pacientes evaluados, de los cuales 8 pacientes presentaron eventos de tipo vascular (2 pacientes con SCA), 5 pacientes presentaron alteraciones nutricionales, y otros 5 pacientes mostraron alteraciones del metabolismo óseo mineral. De forma llamativa,

de la totalidad de los sujetos en los que se evidenciaron cambios en el estado clínico, 10 presentaban un diagnóstico previo de ECV, lo que refleja la elevada morbi-mortalidad global y cardiovascular asociada a estas patologías^{4,37,38,39}.

De los 8 pacientes en los que se evidenciaron eventos de tipo vascular durante el periodo del estudio, únicamente aquellos con un SCA mostraron una variación en la concentración sérica de us-TnT superior al VRC estimado para esta magnitud. La liberación de TnT cardiaca puede estar relacionada con diversas causas, tanto cardiacas como no cardiacas¹⁵⁸, sin embargo ésta es un potente marcador de daño miocárdico por lo que únicamente aquellos sujetos con una necrosis miocárdica presentaron incrementos clínicamente significativos en su concentración sérica.

Con respecto a los pacientes que desarrollaron alteraciones nutricionales, solo en uno de ellos el cambio en la concentración de albúmina y transferrina era clínicamente significativo en función de los VRC estimados en pacientes con ERCT. Sin embargo, el empleo de los VRC calculados en individuos sanos, aquellos recomendados teniendo en cuenta la ausencia de diferencias significativas entre los datos de VB estimados en ambos grupos, podría aportar un mayor rendimiento diagnóstico para la detección de cambios en el seguimiento del estado nutricional de los pacientes con ERCT; obteniéndose una Se y Sp superiores al 40% y al 80%, respectivamente, para ambas magnitudes bioquímicas. El rendimiento diagnóstico estimado para el ratio entre aminoácidos libres plasmáticos esenciales y no esenciales fue semejante al calculado para la albúmina y la transferrina séricas, lo que parece confirmar la utilidad de este parámetro en el seguimiento del estado nutricional proteico de los pacientes con ERCT. No obstante, debido al limitado tamaño muestral del estudio y a la baja prevalencia de alteraciones de tipo nutricional, estos resultados, fundamentalmente aquellos referidos a la Se diagnóstica, deben ser valorados con precaución; como queda reflejado en la amplitud de los IC95%.

Similares razonamientos pueden hacerse con los resultados obtenidos para el calcio corregido en pacientes con alteraciones del metabolismo óseo-mineral; para los cuales el empleo de los VRC derivados de individuos sanos, permitiría probablemente aumentar el número de sujetos adecuadamente identificados. En cuanto al rendimiento diagnóstico, los marcadores del metabolismo óseo-mineral evaluados presentaban una adecuada Sp y VPN para el seguimiento y monitorización de los pacientes con ERCT; estimándose valores próximos o superiores al 80%. Así mismo, los resultados obtenidos reflejan que, de acuerdo con los datos publicados en la

bibliografía^{103,227,236}, la PTHi es el marcador bioquímico más sensible para la monitorización de la respuesta al tratamiento del hiperparatiroidismo secundario.

Por otra parte, es necesario señalar que durante el periodo de seguimiento otros 6 y 9 pacientes con ERCT no estable presentaron cambios clínicamente significativos en la concentración de los marcadores nutricionales y de la PTHi, respectivamente, en función de los VRC, aunque de acuerdo a su historia y seguimiento clínico estos cambios no se correlacionaban con alteraciones relevantes en su estado de salud. Las guías clínicas recomiendan como principales herramientas diagnósticas, tanto para el DEP como para el hiperparatiroidismo secundario, las pruebas bioquímicas evaluadas en este estudio^{103,207}, por lo que los cambios observados en estas magnitudes podrían reflejar la presencia de estas patologías en estado latente o pre-sintomático. En consecuencia, los valores de rendimiento diagnóstico estimados para el empleo de los VRC en el seguimiento del estado nutricional y del metabolismo óseo-mineral podrían estar infraestimados, especialmente aquellos referidos a la Se y el VPP.

Conclusiones

1. El método desarrollado para el estudio de la VB, basado en el duplicado de una única muestra por sujeto, parece estimar de forma fiable tanto los CV_I como los VRC en las condiciones reales de matriz y concentración de las muestras de los sujetos; al tiempo que permite reducir la carga analítica, condicionante fundamental para el estudio de magnitudes con largos tiempos de análisis como los aminoácidos libres plasmáticos.
2. Los FBRCV evaluados presentan CV_I relativamente bajos en relación a sus CV_G , con valores, en general, inferiores al 20%, tanto en pacientes con ERCT como en individuos sanos. La principal excepción se encuentra en la PCR sérica, para la que se estima unos CV_I superiores al 40% en ambos grupos.
3. Los CV_I observados en individuos sanos son similares a los recogidos en las bases de datos internacionales de VB, excepto para la us-TnT en la que se estima un CV_I cinco veces inferior, probablemente a consecuencia de la mejorada imprecisión analítica del método en el bajo rango de concentraciones evaluado.
4. Un mayor periodo en el programa de HD está relacionado con un incremento en la concentración de PCR, us-TnT, PTHi y, en general, de los aminoácidos libres plasmáticos; así como con una disminución en la concentración de CT y c-HDL. Sin embargo, no se observan cambios en los patrones de VB de los FBRCV a estudio.
5. La ERCT modifica la variación de la us-TnT sérica y la PTHi plasmática alrededor de su punto de ajuste homeostático, por lo que, para un adecuado seguimiento clínico de los pacientes con ERCT, deberían emplearse los VRC derivados de sus propios datos de VB. Para el resto de FBRCV, la ERCT no altera la naturaleza de su VB, lo que justificaría el empleo de los VRC derivados de individuos sanos en estos pacientes.
6. Dada la distribución normal de las concentraciones de los marcadores nutricionales evaluados, los VRC de elección para el seguimiento del DEP son los simétricos unidireccionales calculados para la albúmina y los simétricos bidireccionales estimados para la transferrina y los aminoácidos libres plasmáticos; destacando la utilidad del VRC del ratio entre aminoácidos libres esenciales y no esenciales en el seguimiento del estado nutricional proteico de los pacientes con ERCT.

7. Para los lípidos y las lipoproteínas séricas, la PCR, la ferritina y la PTHi, el empleo de los VRC asimétricos bidireccionales permiten evaluar de una forma más apropiada la respuesta al tratamiento de los pacientes con dislipemia, déficits de hierro, inflamación o hiperparatiroidismo secundario, respectivamente; tanto en pacientes con ERCT como en la población general.
8. Para la detección y seguimiento del SCA, así como para la monitorización del estado vitamínico, los VRC asimétricos unidireccionales calculados para la us-TnT sérica y las vitaminas plasmáticas B12, folato y 25-OH-vitamina D son los más apropiados para los cambios séricos esperables en estas situaciones clínicas.
9. El empleo de los VRC en los marcadores cardiacos, nutricionales y del metabolismo óseo-mineral estudiados, puede proporcionar un adecuado rendimiento diagnóstico en el seguimiento y monitorización de los pacientes con ERCT.
10. Los FBRCV evaluados presentan una elevada individualidad, poniendo de manifiesto la limitada utilidad de los VR poblacionales para la interpretación de los resultados analíticos y corroborando la necesidad de comparar con resultados previos del propio paciente a través de los VRC.
11. A consecuencia de los bajos CV_i obtenidos en la mayoría de los FBRCV evaluados en individuos sanos, las especificaciones de calidad derivadas, tanto para la imprecisión como para el ES y el ET, son relativamente estrictas; si bien estas metas analíticas son, en general, alcanzables con la tecnología actual.

El desarrollo del trabajo de investigación realizado para la presentación de esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se adjuntan en el Anexo I de la presente memoria:

- ❖ **Corte Z, Venta R. Biological variation of free plasma aminoacids in healthy individuals. Clin Chem Lab Med 2010;48:99-104.**

- ❖ **Corte Z, Venta R. Variación Biológica de Lípidos y Lipoproteínas Séricas en Individuos Sanos y Pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal. Rev Lab Clin 2014;7:88-95.**

- ❖ **Corte Z, García C, Venta R. Biological variation of cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease and in healthy individuals. Ann Clin Biochem 2014;52:53-60.**

Bibliografía

-
- ¹ Informe de Diálisis y Transplante del año 2012. Registro Español de Enfermos Renales (REER). [Citado 26 Agosto 2014]. Disponible en: http://www.senefro.org/modules/webstructure/files/reer_datos_2012_sen_bilbao_2013.pdf
- ² National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39(Suppl1):S1-266.
- ³ Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005;67:2089-100.
- ⁴ Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1-150.
- ⁵ Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán J, Goicoechea M, et al. Documento de la Sociedad Española de Nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2014;34:302-16.
- ⁶ Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, van der Velde M, Woodward M, Levey AS, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1331-40.
- ⁷ Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, James MT, Klarenbach S, et al. Using Proteinuria and Estimated Glomerular Filtration Rate to Classify Risk in Patients With Chronic Kidney Disease: A Cohort Study. *Ann Intern Med* 2011;154:12-21.
- ⁸ Martínez-Castelao A, Gorriz JL, Bover J, Segura-de la Morena J, Cebolleda J, Escalada J, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2014;34:243-62.
- ⁹ Gracia GS, Montañés BR, Bover J, Cases A, Deulofeu R, Martín de Francisco AL, et al. Documento de consenso: Recomendaciones sobre la utilización de ecuaciones para la estimación del filtrado glomerular en adultos. *Nefrología* 2006;26:658-65.
- ¹⁰ Arias Rodríguez M. Hernando. *Nefrología Clínica*, 4ª ED. Madrid: Editorial Medica Panamericana;2013:3-12pp

- ¹¹ Lamb EJ, Tomson CR, Roderick PJ. Estimating Kidney function in adults using formulae. *Ann Clin Biochem* 2005;42:321-45.
- ¹² Levey AS, Coresh J, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003;139:137-49.
- ¹³ Marín R. Guías SEN. Riñón y enfermedad cardiovascular. *Nefrología* 2004;24(Sup 6):S1-235.
- ¹⁴ Marín R, Goicoechea M, Gorostidi M, Cases A, Díez J, Escolar G, et al. Guía de la Sociedad Española de Nefrología sobre riñón y enfermedad vascular. Versión abreviada. *Nefrología* 2006;26:31-44.
- ¹⁵ Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek JW, et al. Expressing the Modification of Diet in Renal Study Equation for estimating Glomerular Filtration Rate with Standardized Serum Creatinine Values. *Clin Chem* 2007;53:766-72.
- ¹⁶ Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
- ¹⁷ Stevens LA, Schmid CH, Greene T, Zhang YL, Beck GJ, Froissart M, et al. Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study equations for estimating GFR levels above 60 ml/min/1.73 m². *Am J Kidney Dis* 2010;56:486-95.
- ¹⁸ De Francisco ALM. Sostenibilidad y equidad del tratamiento sustitutivo de la función renal en España. *Nefrología* 2011;31:241-6.
- ¹⁹ Fauci AS, Braunwald E, Kasper LD, Hauser LS, Longo LD, Jameson LJ, et al. Biología celular y molecular de los riñones. En: Fauci AS, Braunwald E, Kasper LD, Hauser LS, Longo LD, Jameson LJ, et al. *Harrison principios de medicina interna* 17^a ED. Madrid: Mc Graw Hill;2008:314-452.
- ²⁰ Coresh J, Brad CA, Greene T, Eknoyan G, Levey A. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adults US population. Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J kidney Dis* 2003;41:1-12.
- ²¹ Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007;298:2038-47.
- ²² Lusignan S, Chan T, Stevens P, O'Donoghue D, Hague N, Dzregah B. Identifying patients with chronic kidney disease from general practice computer records. *Family Practice* 2005;22:234-41.

- ²³ Zang QL, Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health* 2008;8:117-30.
- ²⁴ Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología* 2010;30:78-86.
- ²⁵ U.S. Renal Data System, *USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesda, 2013.
- ²⁶ Brosius FC, III, Hostetter TH, Kelepouris E, Mitsnefes MM, Moe SM, Moore MA et al. Detection of chronic kidney disease in patients with or at increased risk of cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Kidney And Cardiovascular Disease Council; the Councils on High Blood Pressure Research, Cardiovascular Disease in the Young, and Epidemiology and Prevention; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: developed in collaboration with the National Kidney Foundation. *Circulation* 2006;114(10):1083-1087.
- ²⁷ Ribes EA. Fisiopatología de la insuficiencia renal crónica. *Anales de Cirugía Cardíaca y Vasculár* 2004;10:8-76.
- ²⁸ National Collaborating Centre for Chronic Conditions. *Chronic kidney disease: national clinical guideline for early identification and management in adults in primary and secondary care*. London: Royal College of Physicians; 2008.
- ²⁹ Halbesma N, Kuiken DS, Brantsma AH, Bakker SJ, Wetzles JF, De Zeeuw D, et al. Macroalbuminuria is a better risk marker than low estimated GFR to identify individuals at risk for accelerated GFR loss in population screening. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2582-90.
- ³⁰ van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, Astor BC, Woodward M, Levey A, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1341-52.
- ³¹ Normas de Actuación Clínica en Nefrología. Tratamiento sustitutivo en la insuficiencia renal crónica. Sociedad Española de Nefrología 1999.
- ³² Tornero F, Remón C. Indicaciones para el inicio de técnicas de depuración extrarrenal. *Nefrología* 2008;28(supl3):101-4.
- ³³ Netter HF. Riñones, vías urinarias y órganos sexuales. En: Netter HF. *Medicina Interna*. 2ªED. Barcelona: Massón;2003:338-74.

- ³⁴ Ethier J, Mendelssohn DC, Elder SJ, Hasegawa T, Akizawa T, Akiba T, et al. Vascular access use and outcomes: an international perspective from the dialysis outcomes and practice patterns study. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:3219-26.
- ³⁵ Sherman RA, Kapoian T. Intradialytic hypotension strikes again. *J Am Soc Nephrol* 2001;22:1396-8.
- ³⁶ US Renal Data System, *USRDS 2011 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2011.
- ³⁷ Geerlings W, Tufveson G, Ehrich JH, Jones EH, Landais P, Loirat C, et al. Report on management of renal failure in Europe, XXII. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7(Supl2):S7-35.
- ³⁸ *USRDS US Renal Data System 1999: Annual Data Report*. The National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesda, MD.
- ³⁹ Nakai S, Watanabe Y, Masakane I, Wada A, Shoji T, Hasegawa T, et al. Japanese Society for Dialysis Therapy: An overview of regular dialysis treatment in Japan. *Ther Apher Dial* 2013;17:567-611.
- ⁴⁰ Culleton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int*. 1999;56:2214-9.
- ⁴¹ Mann JFE, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril : the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med* 2001;134:629-36.
- ⁴² Weiner DE, Tighiouart H, Stark PC, Amin MG, MacLeod B, Griffith JL et al. Kidney disease as a risk factor to recurrent cardiovascular disease and mortality. *Am J Kidney Dis* 2004;44:198-206.
- ⁴³ Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch C, Hsu CY. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296-1305.
- ⁴⁴ Cases A, Vera M, López Gómez JM. Riesgo cardiovascular en pacientes con insuficiencia renal crónica. Pacientes en tratamiento sustitutivo renal. *Nefrología* 2002;22(Supl1):S68-74.
- ⁴⁵ Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(Supl12):S16-23.
- ⁴⁶ Lameire N. Cardiovascular problems in ESRD patients. *Nefrología* 2000;20(Supl3):S33-40.

- ⁴⁷ Yudkin JS, Forrest RD, Jackson CA. Microalbuminuria as predictor of vascular disease in non-diabetic subjects. *Lancet* 1988;2:530-3.
- ⁴⁸ Klausen K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen G, Clausen P, Scharling H, et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. *Circulation* 2004;110:32-5.
- ⁴⁹ Hallan S, Astor B, Romundstad S, Aasarod K, Kvenild K, Coresh J. Association of kidney function and albuminuria with cardiovascular mortality in older vs younger individuals: The HUNT II Study. *Arch Intern Med* 2007;167:2490–6.
- ⁵⁰ McCullough PA, Jurkovitz CT, Pergola PE, McGill JB, Brown WW, Collins AJ, et al. Independent components of chronic kidney disease as a cardiovascular risk state: results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Arch Intern Med* 2007;167:1122–9.
- ⁵¹ Perk J, de Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al., European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Atherosclerosis* 2012;223:1-68.
- ⁵² Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, Merz NB, Lloyd-Jones DM, Blum CB, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. *Circulation* 2013.
- ⁵³ Sarnak MJ, Levey AS. Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm. *Am J Kidney Dis* 2000;35(Supl1):S117-31.
- ⁵⁴ Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1527-39.
- ⁵⁵ Ronco C, McCullough P, Anker S, Anand I, Aspromonte N, Bagshaw S, et al. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative. *Eur Heart J* 2010;31:703-10.
- ⁵⁶ Amann K, Wanner C, Ritz E. Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2112-9.
- ⁵⁷ Bongartz LG, Cramer MJ, Doevandans PA, Joles JA, Braam B. The severe cardiorenal syndrome: "Guyton revisited". *Eur Heart J* 2005;26:11-7.

- ⁵⁸ London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, Adda H, Pannier B. Inflammation, arteriosclerosis, and cardiovascular therapy in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2003; 63(Supl2):S88-93.
- ⁵⁹ Tracy RE, Strong JP, Newman WP, Malcom GT, Oalman MC, Guzman MA. Renovasculopathies of nephrosclerosis in relation to atherosclerosis at ages 25-54 years. *Kidney Int* 1996;49:564-70.
- ⁶⁰ Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, et al. The Framingham predictive instrument in chronic kidney disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:217-24.
- ⁶¹ Shah DS, Polkinghorne KR, Pellicano R, Kerr PG. Are traditional risk factors valid for assessing cardiovascular risk in end-stage renal failure patients? *Nephrology* 2008;13:667-71.
- ⁶² Puchades MJ, Rico MA, Solís MA, Maicas I, Muñoz MI, Tormo G, et al. Estudio del estrés oxidativo en enfermedad renal avanzada. *Nefrología* 2009;29:464-73.
- ⁶³ Bayés B. Homocisteína, proteína C-reactiva, peroxidación lipídica y mortalidad en pacientes en hemodiálisis. *Nefrología* 2002;22(Supl1):S46-7.
- ⁶⁴ Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:61-74.
- ⁶⁵ London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metvier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease. Impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1731-40.
- ⁶⁶ Chertow GM, Raggi P, Chasan-Taber S, Bommer J, Holzer H, Burke SK. Determinants of progressive vascular calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1489-96.
- ⁶⁷ Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004;5:2208-18.
- ⁶⁸ Matias PA, Ferreira C, Jorge C, Borges B, Aires I, Amaral T, et al. 25-Hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:611-8.
- ⁶⁹ Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-61.

- ⁷⁰ Adam A, Rajj L. Nitric oxide-angiotensin II axis in renal and cardiovascular injury. *J Nephrol* 2000;13:211-20.
- ⁷¹ Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
- ⁷² Badimon L, Martínez-González J. Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol* 2002;55(Supl1):S17-26.
- ⁷³ Bolton CH, Downs LG, Victory JGG, Dwight JF, Tomson CRV, Mackness MI, et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1189-97.
- ⁷⁴ Demuth K, Blacher J, Guerin AP, Benoit MO, Moatti N, Safar ME, et al. Endothelin and cardiovascular remodelling in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:375-83.
- ⁷⁵ Pannier B, Guerin P, Marchais SJ, Metivier F, Safar ME, London GM. Postischemic vasodilation, endothelial activation and cardiovascular remodeling in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2000;57:1091-9.
- ⁷⁶ Passauer J, Büssemaker E, Range U, Plug M, Gross P. Evidence in vivo showing increase of baseline nitric oxide generation and impairment of endothelium-dependent vasodilation in normotensive patients on chronic hemodialysis. *JAm Soc Nephrol* 2000;11:1726-34.
- ⁷⁷ Annuk M, Lind L, Linde T, Fellström B. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in renal failure in humans. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:302-6.
- ⁷⁸ Aucella F, Maas R, Vigilante M, Tripedi G, Schwedhelm E, Margaglione M, et al. Methylarginines and mortality in patients with end stage renal disease: A prospective cohort study. *Atherosclerosis* 2009;207:541-5.
- ⁷⁹ Thiene G, Corrado D, Angelini A. The anatomic functional picture of the atherosclerotic lesions. *Cardiologia* 1996;36(Supl1):S283-S90.
- ⁸⁰ Mani AJ, Edep ME, Brown DI. Pathophysiology of Acute Coronary Syndromes: Plaque Rupture and Atherothrombosis. En: Jeremias A, Brown DL. *Cardiac Intensive Care* 2ª ED. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010:73-86.
- ⁸¹ Viles-González JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J* 2004;25:1197-207.
- ⁸² Rokitansky KA. *Manual of Pathological Anatomy*. London: Sydenham Society; 1852:271-3.

- ⁸³ Virchow R. Phlogose und thrombose im gefassystem. En:Virchow R. Gesammelte Abhandlungen zür wissenschaftlichen Medicin. Berlin:Meidinger Sohn and Co;1856:458-63.
- ⁸⁴ Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-10.
- ⁸⁵ Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- ⁸⁶ Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
- ⁸⁷ Koenig W. C-reactive protein and cardiovascular risk: an update on what is going on in cardiology. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1039-41.
- ⁸⁸ Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992;326:242-8.
- ⁸⁹ Clyne N, Lins LE, Pehrsson SK. Occurrence and significance of heart disease in uremia. *Scand J Urol Nephrol* 1986;20:307-11.
- ⁹⁰ Rostand S, Kirk K, Rutsky E. Dialysis-associated ischemic heart disease: insights from coronary angiography. *Kidney Int* 1984;25:653-9.
- ⁹¹ Ikram H, Lynn KL, Bailey RB, Little PJ. Cardiovascular changes in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 1983;24:371-6.
- ⁹² Litwin M, Wuhl E, Jourdan C, Trelewicz J, Niemirska A, Fahr K, et al. Altered morphologic properties of large arteries in children with chronic renal failure and after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1494-500.
- ⁹³ Shoji T, Emoto M, Tabata T, Kimoto E, Shinohara K, Maekawa K, et al. Advanced atherosclerosis in predialysis patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 2002;61:2187-92.
- ⁹⁴ Coll B, Betriu A, Martinez-Alonso M, Borrás M, Craver L, Amoedo ML, et al. Cardiovascular risk factors underestimate atherosclerotic burden in chronic kidney disease: usefulness of non-invasive tests in cardiovascular assessment. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:3017-25.
- ⁹⁵ Jungers P, Khoa TN, Massy ZA, Zingraff J, Labrunie M, Descamps-Latscha B, et al. Incidence of atherosclerotic arterial occlusive accidents in predialysis and dialysis patients. A multicentric study in the Ile de France district. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:898-902.
- ⁹⁶ Reusser LM, Osborn LA, White HJ, Sexson R, Crawford MH. Increased morbidity after coronary angioplasty in patients in chronic hemodialysis. *Am J Cardiol* 1994;73:965-7.

- ⁹⁷ Schoebel FC, Gradaus F, Ivens K, Heering P, Jax TW, Grabensee B, et al. Restenosis after elective coronary balloon angioplasty in patients with end stage renal disease: a case-control study using quantitative coronary angiography. *Heart* 1997;78:337-42.
- ⁹⁸ Azar RR, Propic R, Ho KK, Kierman FJ, Shubrooks SJ, Baim DS, Popma JJ, et al. Impact of end-stage renal disease on clinical and angiographic outcomes after coronary stenting. *Am J Cardiol* 2000;86:485-9.
- ⁹⁹ Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2959-64.
- ¹⁰⁰ Valdivielso JM. Calcificación vascular: tipos y mecanismos. *Nefrología* 2011;31:142-7.
- ¹⁰¹ McCullough PA, Chinnaiyan KM, Agrawal V, Danielewicz E, Abela GS. Amplification of atherosclerotic calcification and Monckeberg's sclerosis: a spectrum of the same disease process. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008;15:396-412.
- ¹⁰² Coll B, Betriu A, Martínez-Alonso M, Amoedo ML, Arcidiacono MV, Borrás M, et al. Large Artery Calcification on Dialysis Patients Is Located in the Intima and Related to Atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:303-10.
- ¹⁰³ Torregrosa JV, Bover J, Cannata J, Lorenzo V, de Francisco ALM, Martínez I, et al. Recomendaciones de la Sociedad Española de Nefrología para el manejo de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en los pacientes con enfermedad renal crónica (SEN-MM). *Nefrología* 2011;31(Supl1):3-32.
- ¹⁰⁴ Hruska KA, Choi ET, Memon I, Davis TK, Mathew S. Cardiovascular risk in chronic kidney disease (CKD): the CKD-mineral bone disorder (CKD-MBD). *Pediatr Nephrol* 2010;25:769-78.
- ¹⁰⁵ Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintuf Y, et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 1997;17:680-7.
- ¹⁰⁶ Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation* 2011;109:697-711.
- ¹⁰⁷ Ix JH, Shlipak MG, Katz R, Budoff MJ, Shavelle DM, Probstfield JL, et al. Kidney function and aortic valve and mitral annular calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Kidney Dis* 2007;50:412-20.
- ¹⁰⁸ Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz, Diaz-Lopez JB, Diaz-Corte C, Cannata-Andía JB (Asturias Study Group). Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:239-46.

- ¹⁰⁹ Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, et al. Coronary artery calcification in young adults with end stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Eng J Med* 2000;342:1478-83.
- ¹¹⁰ Caro P, Delgado R, Dapena F, Núñez A. Valoración de las calcificaciones coronaria. *Nefrología* 2007;27:721-8.
- ¹¹¹ Mejía N, Román-García P, Miar AB, Tavira B, Cannata-Andía JB. El complejo escenario de las alteraciones del metabolismo óseo y mineral en la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2011;31:514-9
- ¹¹² Mendoza FJ, Lopez I, Montes de Oca A, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Metabolic acidosis inhibits soft tissue calcification in uremic rats. *Kidney Int* 2008;73:407-14.
- ¹¹³ Vliegenthart R, Oudkerk M, Song B, van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Coronary calcification detected by electron-beam computed tomography and myocardial infarction. The Rotterdam Coronary Calcification Study. *Eur Heart J* 2002;23:1596-603.
- ¹¹⁴ Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial Calcifications, Arterial Stiffness, and Cardiovascular Risk in End-Stage Renal Disease. *Hypertension* 2001;38:938-42.
- ¹¹⁵ Orth SR. Smoking and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002;132:1663-72.
- ¹¹⁶ Rostand SG, Kirk KA, Rutsky EA. Relationship of coronary risk factors to hemodialysis-associated ischemic heart disease. *Kidney Int* 1982;22:304-8.
- ¹¹⁷ Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, Manolio TA, Peterson D, Stehman-Breen C, et al. Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors. *JAMA* 2005;293:1737-45.
- ¹¹⁸ Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:529-38.
- ¹¹⁹ Yacoub R, Habib H, Lamdo A, Al-Ali R, Varjabedian L, Atalla G, et al. Association between smoking and chronic kidney disease: a case control study. *BMC Public Health* 2010;10:731-7.
- ¹²⁰ Kalaitzidis RG, Siamopoulos KC. The role of obesity in kidney disease: recent findings and potential mechanisms. *Int Urol Nephrol* 2011;43:771-84.
- ¹²¹ Eknoyan G. Obesity and chronic kidney disease. *Nefrología* 2011;31:397-403.
- ¹²² Wang Y, Chen X, Song Y, Caballero B, Cheskin LJ. Association between obesity and kidney disease. A systematic review and metaanalysis. *Kidney Int* 2008;73:19-33.

- ¹²³ Hall JE, Henegar JR, Dwyer TM, Liu J, da Silva AA, Kuo JJ, et al. Is obesity a major cause of chronic kidney disease? *Adv Renal Replac Ther* 2004;11:41-54.
- ¹²⁴ Gansevoort R, Correa-Rotter R, Hemmelgarn B, Jafar T, Heerspink H, Mann JF, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet* 2013;382:339-52.
- ¹²⁵ Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999;55:648-58.
- ¹²⁶ Stenvinkel P, Wanner C, Metzger T, Heimbürger O, Mallamaci F, Tripepi G, et al. Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage? *Kidney Int* 2002;62:1791-8.
- ¹²⁷ Chow FY, Polkinghorne KR, Chadban SJ, Atkins RC, Kerr PG. Cardiovascular risk in dialysis patients: a comparison of risk factors and cardioprotective therapy between 1996 and 2001. *Nephrology* 2003;8:177-83.
- ¹²⁸ Morales E, Praga M. The Effect of Weight Loss in Obesity and Chronic Kidney Disease. *Curr Hypertens Rep* 2012;14:170-6.
- ¹²⁹ Cases A, Goicoechea M, de Álvaro F. Hipertensión arterial y dislipemia en el paciente con enfermedad renal crónica (ERC). Antiagregación. Terapéutica por objetivos. *Nefrología* 2008;28(Supl3):S39-48.
- ¹³⁰ Foley RN, Wang C, Collins AJ. Cardiovascular risk factor profiles and kidney function stage in the US general population: the NHANES III study. *Mayo Clin Proc* 2005;80:1270-7.
- ¹³¹ Buckalew VM, Berg RL, Wang SR, Porush JG, Rauch S, Schulman G. Prevalence of hypertension in 1,795 subjects with chronic renal disease: the modification of diet in renal disease study baseline cohort. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Am J Kidney Dis* 1996;28:811-21.
- ¹³² Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor por advanced glycation end products: A mechanism of chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84:489-97.
- ¹³³ Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl Med* 1999;341:1127-33.
- ¹³⁴ Rocco MV, Berns JS. KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 Update. *American Journal of Kidney Diseases* 2012;60:850-86.

- ¹³⁵ Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999;100:1281-92.
- ¹³⁶ Mills EJ, Rachlis B, Wu P, Devereaux PJ, Arora P, Perri D. Primary prevention of cardiovascular mortality and events with statin treatments: a network meta-analysis involving more than 65,000 patients. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1769-81
- ¹³⁷ Kwan BCH, Kronenberg F, Beddhu S, Cheung AK. Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1246-61.
- ¹³⁸ Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM. Enhanced Oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursor of small, dense lowdensity lipoproteins. *Am J Med* 2001;110:103-10.
- ¹³⁹ Attman PO, Alaupovic P. Lipid an apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia-Relation to renal function and dialysis. *Nephron* 1991;57:401-10.
- ¹⁴⁰ Ritz E, Wanner C. Lipide abnormalities and cardiovascular risk in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1065-70.
- ¹⁴¹ Kronenberg F, Kuen E, Ritz E, Junker R, Konig P, Kraatz G, et al. Lipoprotein(a) serum concentrations and apolipoprotein(a) phenotypes in mild and moderate renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:105-15.
- ¹⁴² Catapano AL, Reiner Z, de Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis* 2011;217:3-46.
- ¹⁴³ Nishizawa Y, Shoji T, Kakiya R, Tsujimoto Y, Tabata T, Ishimura E, et al. Non-high-density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C) as a predictor of cardiovascular mortality in patient with end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* 2003;84:S117-20.
- ¹⁴⁴ Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 2002;106:3143-421.
- ¹⁴⁵ Sánchez PL, Morinigo JL, Pabon P, Martin F, Piedra I, Palacios IF, et al. Prognostic relations between inflammatory markers and mortality in diabetic patients with non-ST elevation acute coronary syndrome. *Heart* 2004;90:264-9.

- ¹⁴⁶ Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-8.
- ¹⁴⁷ Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992;268:877-81.
- ¹⁴⁸ Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015-22.
- ¹⁴⁹ Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997;350:430-6.
- ¹⁵⁰ Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 2001;103:1718-20.
- ¹⁵¹ Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Lippy P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler Throm* 1993;13:197-204.
- ¹⁵² Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1255-62.
- ¹⁵³ Pérez-Fernández R, Kaski JC. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:738-50.
- ¹⁵⁴ Rodríguez G, Mago N, Rosa F. El papel de la inflamación en la aterogénesis. Revisión. *Invest Clin* 2009;50:109-29.
- ¹⁵⁵ Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(Supl1):S28-36.
- ¹⁵⁶ Mazairac AH, de Wit GA, Grooteman MP, Penne EL, van der Weerd NC, van den Dorpel MA, et al. A composite score of protein-energy nutritional status predicts mortality in haemodialysis patients no better than its individual components. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1962-7.
- ¹⁵⁷ Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low-density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001;103:1194-7.

- ¹⁵⁸ Dufour RD, Lott JA, Henry JB. Enzimología Clínica. En: Henry JB. Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Madrid: Marbán Libros SL;2010:281-304.
- ¹⁵⁹ Amezcua-Guerra L, Springall R, Bojalil R. Proteína C reactiva: aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda. Arch Cardiol Méx 2007;77:58-66.
- ¹⁶⁰ Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. Circulation 2003;107:87-92.
- ¹⁶¹ Kaysen GA, Eisenrich JP. Characteristics and effects of inflammation in end-stage renal disease. Semin Dial 2003;16:438-46.
- ¹⁶² Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Fermo I, Foca A, et al. Inflammation is associated with carotid atherosclerosis in dialysis patients. CREED Investigators. Cardiovascular Risk Extended Evaluation in Dialysis Patients. J Hypertens 2000;18:1207-13.
- ¹⁶³ Park CW, Shin YS, Kim CM, Lee SY, Yu SE, Kim SY, et al. Increased C-reactive protein following hemodialysis predicts cardiac hypertrophy in chronic hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 2002;40:1230-9.
- ¹⁶⁴ Pertierra AG, Rivera JM, Gaitán DB, Villalverde C, Mendoza C, Ramírez J. Fundamentos de bioquímica estructural 2º ED. Madrid: Editorial Teber;2006.
- ¹⁶⁵ Gonzalez A. Principios de bioquímica Clínica y Patología Molecular. Barcelona: Elsevier España;2010:117-27.
- ¹⁶⁶ Gerhardt W, Katus H, Ravkilde J, Hamm C, Jørgensen PJ, Peheim L, et al. S-Troponin T in suspected ischemic myocardial injury compared with mass and catalytic concentrations of S-Creatine kinase isoenzyme MB. Clin Chem 1991;37:105-11.
- ¹⁶⁷ Adams JE, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. Circulation 1993;88:101-6.
- ¹⁶⁸ Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. Clin Chem 2010;56:254-61.
- ¹⁶⁹ Apple FS, Collinson PO. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. Clin Chem 2012;58:54-61.
- ¹⁷⁰ Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined. A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of

Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959-69.

¹⁷¹ Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, Alpert S, White HD, Jaffe AS, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2525-38.

¹⁷² Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third universal definition of myocardial infarction. White on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J* 2012;33:2551-67.

¹⁷³ Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AH. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007;53:547-51.

¹⁷⁴ Panteghini M, Pagani F, Yeo KT, Apple FS, Christenson RH, Dati F, et al. Evaluation of imprecisión for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004;50:327-32.

¹⁷⁵ Jacobs LH, Kerkhof J, Mingels AM, Kleijnen VW, Sande FM, Wodzig WK, et al. Haemodialysis patients longitudinally assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and cardiac troponin I assays. *Ann Clin Biochem* 2009;46:283-90.

¹⁷⁶ Labini R, Masson S, Anand IS, Missov E, Carlson M, Vago T, et al. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. *Circulation* 2007;116:1242-49.

¹⁷⁷ Hasegawa M, Ishii J, Kitagawa F, Kanayama K, Takahashi H, Ozaki Y, et al. Prognostic value of highly sensitive troponin T on cardiac events in patients with chronic kidney disease not on dialysis. *Heart Vessels* 2013;28:473-9.

¹⁷⁸ Wu AH, Jaffe AS, Apple FS, Jesse RL, Francis GL, Morrow DA, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: use of cardiac troponin and B-type natriuretic peptide or N-terminal proB-type natriuretic peptide for etiologies other than acute coronary syndromes and heart failure. *Clin Chem* 2007;53:2086-96.

¹⁷⁹ Hafner G, Thome-Kromer B, Schaub J, Kupferwasser I, Ehrental W, Cummins P, et al. Cardiac troponins in serum in chronic renal failure. *Clin Chem* 1994;40:1790-1.

¹⁸⁰ Freda BJ, Tang WH, Van Lente F, Peacock WF, Francis GS. Cardiac troponins in renal insufficiency: review and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:2065-71.

- ¹⁸¹ Lamb EJ, Webb MC, Abbas NA. The significance of serum troponin T in patients with kidney disease: a review of the literature. *Ann Clin Biochem* 2004;41:1-9.
- ¹⁸² Baum H, Obst M, Huber U, Neumeier D. Cardiac troponin T in patients with high creatinine concentration but normal creatinine kinase activity in serum. *Clin Chem* 1996;42:474-5.
- ¹⁸³ Ooi DS, Zimmerman D, Graham J, Wells GA. Cardiac troponin T predicts longterm outcomes in hemodialysis patients. *Clin Chem* 2001;4:412-17.
- ¹⁸⁴ Antman EM, Grudzien C, Mitchell RN. Detection of unsuspected myocardial necrosis by rapid bedside assay for cardiac troponin T. *Am Heart J* 1997;133:596-98.
- ¹⁸⁵ Diris JH, Hackeng CM, Kooman JP, Pinto JP, Hermens WT, van Dieijen-Visser MP. Impaired renal clearance explains elevated troponin T fragments in hemodialysis patients. *Circulation* 2004;109:23-5.
- ¹⁸⁶ Sharma R, Gaze DC, Pellerin D, Mehta RL, Gregson H, Streather CP, et al. Cardiac structural and functional abnormalities in end stage renal disease patients with elevated cardiac troponin T. *Heart* 2006;92:804-9.
- ¹⁸⁷ Breidthardt T, McIntyre CW. Dialysis-induced myocardial stunning: the other side of the cardiorenal syndrome. *Rev Cardiovasc Med* 2011;12:13-20.
- ¹⁸⁸ Apple FS, Murakami MM, Pearce LA, Herzog CA. Predictive value of cardiac troponin I and T for subsequent death in end-stage renal disease. *Circulation* 2002;106:2941-5.
- ¹⁸⁹ Khan NA, Hemmelgarn BR, Tonelli M, Thompson CR, Levin A. Prognosis value of troponin T and I among asymptomatic patients with end-stage renal disease: a meta.analysis. *Circulation* 2005;112:3088-96.
- ¹⁹⁰ deFilippi C, Wasserman S, Rosanio S, Tiblier E, Sperger H, Tocchi M, et al. Cardiac troponin T and C-reactive protein for predicting prognosis, coronary atherosclerosis, and cardiomyopathy in patients undergoing long-term hemodialysis. *JAMA* 2003;290:353-9.
- ¹⁹¹ Kanwar M, Hashem M, Rosman H, Kamalakannan D, Cheema A, Ali A, et al. Usefulness of clinical evaluation, troponins, and C-reactive protein in predicting mortality among stable hemodialysis patients. *Am J Cardiol* 2006;98:1283-7.
- ¹⁹² Michos ED, Wilson LM, Yeh HC, Berger Z, Suarez-Cuervo C, Stacy SR, et al. Prognostic value of cardiac troponin in patients with chronic kidney disease without suspected acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014;161:491-501.

- ¹⁹³ Carrero JJ, Stenvinkel P, Cuppari L, Ikizler TA, Kalantar-Zadeh K, Kaysen G, et al. Etiology of the protein-energy wasting syndrome in chronic kidney disease: a consensus statement from the International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM). *J Ren Nutr* 2013;23:77-90.
- ¹⁹⁴ Gracia-Iguacel C, Gonzalez-Parra E, Barril-Cuadrado G, Sanchez R, Egido J, Ortiz-Arduán A, et al. Definiendo el síndrome de desgaste proteico energético en la enfermedad renal crónica: prevalencia e implicaciones clínicas. *Nefrología* 2014;34:507-19.
- ¹⁹⁵ Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Why is protein energy wasting associated with mortality in chronic kidney disease? *Semin Nephrol* 2009;29:3-14.
- ¹⁹⁶ Holland D, Lam M. Predictors of hospitalization and death amongst pre-dialysis patients: a retrospective study. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:650-8.
- ¹⁹⁷ Cranenburg E, Schurgers L, Uiterwijk H, Beulens J, Dalmeijer GW, Westerhuis R, et al. Vitamin K intake and status are low in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2012;82:605-10.
- ¹⁹⁸ Lopes AA, Bragg-Gresham JL, Elder SJ, Ginsberg N, Goodkin DA, Pifer T, et al. Independent and joint associations of nutritional status indicators with mortality risk among chronic hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *J Ren Nutr* 2010;20:224-34.
- ¹⁹⁹ Dong J, Li Y, Xu Y, Xu R. Daily protein intake and survival in patients on peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:3715-21.
- ²⁰⁰ Lorenzo V, de Bonis E, Hernández D, Rodríguez P, Rufino M, González Posada J, et al. Desnutrición calórica-proteica en hemodiálisis crónica. Utilidad y limitaciones de la tasa de catabolismo proteico. *Nefrología* 1994;14(Supl2):S119-25.
- ²⁰¹ Marcén R, Gámez C. Tablas de parámetros antropométricos de una población en hemodiálisis. *Nefrología* 1994;14(Supl2):S60-3.
- ²⁰² Gracia-Iguacel C, González-Parra E, Pérez-Gómez MV, Mahillo I, Egido J, Ortiz A, et al. Prevalence of protein-energy wasting syndrome and its association with mortality in haemodialysis patients in a centre in Spain. *Nefrología* 2013;33:495-505.
- ²⁰³ Bebbie IE, Martínez MM. The impact of malnutrition on kidney function. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:20-6.
- ²⁰⁴ Klahr S, Levey AS, Beck GJ, Caggiula AW, Hunsicker L, Kusek JW, et al. Modification of diet in renal disease study group. The effects of dietary protein restriction and blood pressure control on the progression of chronic renal disease. *N Engl J Med* 1994;330:877-84.

- ²⁰⁵ López RM, Cuadrado GB, Sellares VL. Guía de nutrición en Enfermedad Renal Crónica Avanzada (ERCA). *Nefrología* 2008;28(Supl3):S79-86.
- ²⁰⁶ Leal VO, Moraes C, Stockler-Pinto MB, Lobo JC, Farage NE, Velarde LG, et al. Is a body mass index of 23 kg/m² a reliable marker of protein-energy wasting in hemodialysis patients? *Nutrition* 2012;28:973-7.
- ²⁰⁷ Kopple JD. National kidney Foundation. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. Clinical Practice Guidelines for Nutrition in Chronic Renal Failure. *Am J Kidney Dis* 2000;37(Supl1):S56-65.
- ²⁰⁸ McPherson RA. Proteínas específicas. En: Henry JB. *Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. Madrid: Marbán Libros S.L.;2010:249-264.
- ²⁰⁹ Ikizler TA, Hakim RM. Nutrition in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1996;50:343-57.
- ²¹⁰ Riella M, Martins C. Evaluación y monitoreo del estado nutricional en los pacientes con afecciones renales. En: Riella M, Martins C. *Nutrición y riñón*. Madrid: Editorial Panamericana; 2004:88-94.
- ²¹¹ Corominas A, Rodríguez F. *Aminoácidos: interés en fisiología, patología y terapéutica*. Barcelona: Fargraf;1975.
- ²¹² Hernández Rodríguez M, Sastre A. *Tratado de Nutrición*. Madrid: Díaz de Santos;1999.
- ²¹³ Scriver CR, Clow CL, Lamm P. Plasma amino acids: screening, quantitation, and interpretation. *Am J Clin Nutr* 1971;24:876-90.
- ²¹⁴ Rudman D, Mattson DE, Feller AG, Cotter R, Johnson RC. Fasting plasma amino acids in elderly men. *Am J Clin Nutr* 1989;49:559-66.
- ²¹⁵ Raj DS, Ouwendyk M, Francoeur R, Pierratos A. Plasma amino acid profile on nocturnal hemodialysis. *Blood Purif* 2000;18:97-102.
- ²¹⁶ Kovesdy CP, Trivedi BK, Kalantar-Zadeh K, Anderson JE. Association of anemia with outcomes in men with moderate and severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006;69:560-4.
- ²¹⁷ Cases A, Coll E, Collado S. Anemia en la insuficiencia renal crónica y sus implicaciones cardiovasculares. *Med Clin* 2009;132(Supl1):S38-42.
- ²¹⁸ Siems W, Carluccio F, Radenkovic S, Grune T, Hampl H. Oxidative stress in renal anemia of hemodialysis patients is mitigated by epoetin treatment. *Kidney Blood Press Res* 2005;28:295-301.

- ²¹⁹ Vlagopoulos PT, Tighiouart H, Weiner DE, Griffith J, Pettitt D, Salem DN, et al. Anemia as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality in diabetes: the impact of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3403-10.
- ²²⁰ Weiner DE, Tighiouart H, Vlagopoulos PT, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, et al. Effects of anemia and left ventricular hypertrophy on cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1803-10.
- ²²¹ McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK, Hood S, Lorber DL, Tang KL, et al. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin* 2004;20:1501-10.
- ²²² Martínez-Castelao A, Górriz JL, Portolés JM, De Alvaro F, Cases A, Luño J, et al. Baseline characteristics of patients with chronic kidney disease stage 3 and stage 4 in Spain: the MERENA observational cohort study. *BMC Nephrol* 2011;12:53-64.
- ²²³ Portolés J, Górriz JL, Rubio E, de Alvaro F, García F, Alvarez-Chivas V, et al. NADIR-3 Study Group. The development of anemia is associated to poor prognosis in NKF/KDOQI stage 3 chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 2013;14:2-11.
- ²²⁴ Locatelli F, Aljama P, Barany P, Canaud B, Carrea F, Eckardt KU, et al. Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(Supl2):S1-47.
- ²²⁵ KDOQI; National Kidney Foundation. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis* 2006;47(Supl3):S11-145.
- ²²⁶ Locatelli F, Barany P, Covic A, De Francisco A, Del Vecchio L, Goldsmith D, et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes guidelines on anaemia management in chronic kidney disease: a European Renal Best Practice position statement. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:1346-59.
- ²²⁷ Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009;113(Supl1):S1-130.
- ²²⁸ Qunibi WY. Consequences of hyperphosphatemia in patients with end-stage renal disease (ESRD). *Kidney Int* 2004;90:S8-12.
- ²²⁹ Slinin Y, Foley RN, Collins AJ. Calcium, phosphorus, parathyroid hormone, and cardiovascular disease in hemodialysis patients: The USRDS Waves 1, 3, and 4 study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1788-93.

- ²³⁰ Matias PJ, Ferreira C, Jorge C, Borges M, Aires I, Amaral T, et al. 25-Hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:611-8.
- ²³¹ Inker LA, Coresh J, Levey AS, Tonelli M, Muntner P. Estimated GFR, albuminuria, and complications of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:2322-31.
- ²³² Górriz JL, Molina P, Bover J, Barril G, Martín-de Francisco AL, Caravaca F, et al. Características del metabolismo óseo y mineral en pacientes con enfermedad renal crónica en estadios 3-5 no en diálisis: resultados del estudio OSERCE. *Nefrología* 2013;33:46-60.
- ²³³ Komaba H, Fukagawa M. FGF23: a key player in mineral and bone disorder in CKD. *Nefrología* 2009;29:392-6.
- ²³⁴ Rodríguez M, Canadillas S, López I. Regulation of parathyroid function in chronic renal failure. *J Bone Miner Metab* 2006;24:164-8.
- ²³⁵ Canalejo R, Canalejo A, Martínez-Moreno JM, Rodríguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, et al. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1125-35.
- ²³⁶ Bellorin-Font E, Ambrosoni P, Carlini RG, Carvalho AB, Correa-Rotter R, Cueto-Manzano A, et al. Guías de práctica clínica para la prevención, diagnóstico, evaluación y tratamiento de los trastornos minerales y óseos en la enfermedad renal crónica (TMO-ERC) en adultos. *Nefrología* 2013;33(Supl1):S1-28.
- ²³⁷ de la Piedra C, Fernández E, González ML, González E. Diferencias en la función de los péptidos paratiroideos. ¿Qué estamos midiendo?. *Nefrología* 2008;28:123-8.
- ²³⁸ Ureña Torres P. The need for reliable serum parathyroid hormone measurements. *Kidney Int* 2006;70:240-3.
- ²³⁹ Fuentes Arderiu X, Valero Politi J. Variabilidad biológica. En: Fuentes Arderiu X, Castiñeiras MJ, Queraltó JM. *Bioquímica clínica y patología molecular* 2ªED. Barcelona: Editorial Reverté;1998:585-93.
- ²⁴⁰ Fraser CG. *Interpretation of Clinical Chemistry Laboratory Data*. Oxford: Blackwell;1986.
- ²⁴¹ Harris EK. Statistical aspects of reference values in clinical pathology. *Prog Clin Pathol* 1981;8:45-66.
- ²⁴² Plebani M, Lippi G. Biological variation and reference change values: an essential piece of the puzzle of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:189-90.

- ²⁴³ Alexandraki KI, Grossman AB. Novel insights in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* 2010;92:35-43.
- ²⁴⁴ López J, Fernández A. *Fisiología del ejercicio 3ªED*. Madrid: Editorial Medica Panamericana;2006.
- ²⁴⁵ Fuentes-Arderiu X, Cuadros J. La variabilidad iatrogénica de las magnitudes biológicas. *Bioquímica* 2001;26:30-3.
- ²⁴⁶ Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27:409-37.
- ²⁴⁷ Fraser CG. *Variación biológica: de la teoría a la práctica*. Barcelona: SEQC;2003.
- ²⁴⁸ Ricos C, Perich C, Domenech M, Fernández P, Biosca C, Minchinela J, et al. Variación biológica. Revisión desde una perspectiva práctica. *Rev Lab Clin* 2010;3:192-200.
- ²⁴⁹ Williams GZ, Young DS, Stein MR, Cotlove, E. Biological and analytic components of variation in long-term constituents in normal subjects. Objectives, subjects selection, laboratory procedures and estimation of analytic deviation. *Clin Chem* 1970;16:1016-21.
- ²⁵⁰ Røraas T, Petersen P, Sandverg S. Confident intervals and power calculations for within-person biological variation: Effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clin Chem* 2012;58:1306-13.
- ²⁵¹ Cotlove E, Young D, Harris EK. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. IV. Results of a study designed to eliminate longterm analytic deviations. *Clin chem* 1971;17:403-10.
- ²⁵² Shepard M, Penberthy L, Fraser CG. Short and long term biological variation in analytes in urine of apparently healthy individuals. *Clin Chem* 1981;27:569-73.
- ²⁵³ Costongs G, Janson P, Bas B, Hermans J, van ersch JW, Brombacher PJ. Short term and long term intraindividual variations and critical differences of clinical chemical laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;23:405-10.
- ²⁵⁴ Moses CG, Henderson AR. Biological variance of total lactate dehydrogenase and its isoenzymes in human serum. *Clin Chem* 1984;30:1737-41.
- ²⁵⁵ Ricos C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pos, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.

- ²⁵⁶ Minchinela J, Ricos C, Perich C, Fernández-Calle P, Álvarez V, Domenech M, et al. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2014 update. Disponible en <http://www.westgard.com/guest36.htm> [con acceso el 21-01-15].
- ²⁵⁷ Fraser CG. The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:404-15.
- ²⁵⁸ Fraser CG. Biological variation in clinical chemistry. An update: collated data, 1988–1991. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:916-23.
- ²⁵⁹ Sebastián-Gámbaro MA, Lirón-Hernández FJ, Fuentes-Arderiu X. Intra- and inter-individual biological variability data bank. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:845-52.
- ²⁶⁰ Perich C, Michenela J, Ricós C, Fernandez-Calle C, Álvarez V, Domenech MV. Biological variation database: structure and criteria used for generation and update. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:299–305.
- ²⁶¹ Simundic AM, Bartlett W, Fraser CG. Biological variation: a still evolving facet of laboratory medicine. *Ann Clin Biochem* 2015;52:189-90.
- ²⁶² Carobene A, Braga F, Roraas T, Sandberg S, Barlett WA. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and g-glutamyl transferase. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1997–2007.
- ²⁶³ Plebani M, Padoan A, Lippi G. Biological variation: back to basics. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:155-6.
- ²⁶⁴ Aarsand AK, Røraas T, Sandberg S. Biological variation-reliable data is essential. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:153-4.
- ²⁶⁵ The Working Group on BV (WG-BV) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Standard for Reporting of Studies of Biological Variation. Disponible en <http://www.biologicalvariation.com> [con acceso el 21-01-15].
- ²⁶⁶ Simundic AM, Kackov S, Miler M, Fraser CG, Petersen PH. Terms and symbols used in studies on biological variation: the need for harmonization. *Clin Chem* 2015;61:438-9.
- ²⁶⁷ Kaplan LA. Determination and application of desirable analytical performance goals: the ISO/TC 212 approach. *Scan J Clin ab Invest* 1999;59:479-82.
- ²⁶⁸ Westgard JO. The need for a system of quality standards for modern quality management. *Scan J Clin Lab Invest* 1999;59:483-6.

- ²⁶⁹ Tonks D. A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 Canadian laboratories. *Clin Chem* 1963;9:217-33.
- ²⁷⁰ Barnett RN. Medical significance of laboratory results. *Am J Clin Pathol* 1968;50:671-6.
- ²⁷¹ Hyltoft Petersen P, Fraser CG, Kallner A, Kenny D, Petersen PH. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine. *Scan J Clin Lab Invest* 1999;57:475-85.
- ²⁷² Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem* 1999;45:321-3.
- ²⁷³ Fraser CG. General strategies to set quality specifications for reliability performance characteristics. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:487-90.
- ²⁷⁴ International standardization organization (ISO). *International Vocabulary of Metrology: Basic and General Concepts and Associated Terms 3rdED*. Geneva: ISO;2007.
- ²⁷⁵ Harris EK. Statistical principles underlying analytic goal-setting in clinical chemistry. *Am J Clin Pathol* 1979;48:757-64.
- ²⁷⁶ Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, Ricos C. Proposals for setting generally applicable quality goals based on biology. *Ann Clin Biochem* 1997;34:8-12.
- ²⁷⁷ Fraser CG. Quality specifications in laboratory medicine. *Clin Biochem Revs* 1996;17:109-14.
- ²⁷⁸ Gowans EMS, Hyltoft Petersen P, Blaabjerd O, Horder M. Analytical goals for the acceptance of common reference intervals for laboratories throughout a geographical area. *Scan J Clin Lab Invest* 1988;48:757-64.
- ²⁷⁹ Westgard QC. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra and inter-individual biologic variation. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm> [Con acceso 21-01-15].
- ²⁸⁰ Sociedad Española de Bioquímica Clínica. Valores de referencia. <http://www.seqc.es> [con acceso 22-01-2015].
- ²⁸¹ Solberg HE. A guide to IFCC recommendations on reference values. *J Int Fed Clin Chem* 1993;5:162-5.
- ²⁸² Solberg HE, Grasbeck R. Reference values. *Adv Clin Chem* 1989;27:1-79.
- ²⁸³ Henry J, Perticlerc C, Fuentes-Arderiu X, Petersen PH, Queralto JM, Schiele F, et al. Need for revising the concept of reference values. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:589-95.

- ²⁸⁴ Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:758-64.
- ²⁸⁵ Ricos C, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Iglesias N, Jimenez CV, et al. The reference change value a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scan J Clin Lab Invest* 2004;64:175-84.
- ²⁸⁶ Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a "reference change" for comparing two consecutive measurements. *Clin Chem* 1983;29:25-30.
- ²⁸⁷ Fraser CG. Reference change values. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:807-12.
- ²⁸⁸ Fraser CG. Improved monitoring of differences in serial laboratory results. *Clin Chem* 2011; 57:1635-7.
- ²⁸⁹ Christ M, Bertsch T, Popp S, Bahrmann P, Heppner HJ, Müller C. High-sensitivity troponin assays in the evaluation of patients with acute chest pain in the emergency department. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1955-63.
- ²⁹⁰ Zorzoli M. The Athlete Biological Passport from the perspective of an anti-doping organization. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1423-5.
- ²⁹¹ Lippi G, Targher G. Glycated hemoglobin (HbA1c): old dogmas, a new perspective? *Clin Chem Lab Med* 2010;48:609-14.
- ²⁹² Wallemacq PE. Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we? *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1204-11.
- ²⁹³ Cartei G, Cartei F, Bertin M, Paduan A, Zustovich F, Ornella M, et al. CA125 reference values change in male and postmenopausal female subjects. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:413-19.
- ²⁹⁴ Corte Z, Venta R. Valor de Referencia del Cambio del PSA en la Evaluación del Riesgo de Cáncer de Próstata. *Rev Lab Clin* 2011;4:115-20.
- ²⁹⁵ Ricos C, Iglesias N, García-Lario JV, Simón M, Cava F, Hernández A, et al. Within-subject biological variation in disease: collated data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem* 2007;44:343-52.
- ²⁹⁶ Ricos C, Iglesias N, García-Lario JV, Simón M, Cava F, Hernández A, et al. Within-subject biological variation in disease. Disponible en <http://www.westgard.com/biodatabasedisease.htm> [con acceso el 21-01-15].
- ²⁹⁷ Lawson N. Is variation in biological variation a problem? *Ann Clin Biochem* 2007;44:319-20.

- ²⁹⁸ Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- ²⁹⁹ Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on the Detection, Evaluation and Treatment of High Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
- ³⁰⁰ Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlstrom A, Johnson AM, Ward-Milford A, et al. The Certification of a Matrix Reference Material for Immunochemical Measurement of 14 Human Serum Proteins, CRM470. Report EUR 15243 EN. Bruselas: Commission of the European Communities;1993:1-186.
- ³⁰¹ Dati F, Schumann G, Thomas L, Aguzzi F, Baudner S, Bienvenu J, et al. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP reference material (CRM 470). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:517-20.
- ³⁰² Heil W, Koberstein R, Zawta B. Reference Ranges for Adults and Children, Pre-Analytical Considerations 8^a ED. Mannheim: Roche Diagnostics; 2004.
- ³⁰³ Wu AHB, Feng Y-J, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, et al. Characterisation of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem* 1998;44:1198-208.
- ³⁰⁴ Rossen CJ. Vitamin D Insufficiency. *N Engl J Med* 2011;364:248-54.
- ³⁰⁵ Cohen SA, Meys M, Tarwin TL. The Pico Tag method: a manual of advanced techniques for amino acid analysis, Rev. 1. Bedford (MA): Millipore;1989.
- ³⁰⁶ Miller EG. Asymptotic test statistics for coefficient of variation. *Comm Stat Theory & Methods* 1991;20:3351-63.
- ³⁰⁷ Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, Moecks J. Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. *Clin Chem* 2006;52:1602-3.
- ³⁰⁸ Biosca C, Ricos C, Lauzurica R, Galimany R, Hyltoft Petersen P. Reference change value concept combining two delta values to predict crises in renal posttransplantation. *Clin Chem*. 2001;47:2146-8.
- ³⁰⁹ Trapé J, Botargues JM, Porta F, Ricós C, Badal JM, Salinas R, et al. Reference change value for α -fetoprotein and its application in early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatic disease. *Clin Chem* 2003;49:1209-11.

- ³¹⁰ Cooper G, DeJonge N, Ehrmeyer S, Yundt-Pacheco J, Jansen R, Ricós C, et al. Collective opinion paper on findings of the 2010 convocation of experts on laboratory quality. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:793-802.
- ³¹¹ Katzmann JA, Snyder MR, Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Benson JT, et al. Long-term biologic variation of serum protein electrophoresis M-spike, urine M-spike, and monoclonal serum free light chain quantification: implications for monitoring monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2011;57:168-92.
- ³¹² Valcárcel G, García MT, Cruz E, Gacimartín MV, Venta R, García C. Límites de decisión para el uso combinado del cLDL calculado y su determinación directa. *Química Clínica* 2005;24: 366-9.
- ³¹³ Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic síndrome and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14719 initially healthy american women. *Circulation* 2003;107:391-7.
- ³¹⁴ Ortíz A, Ruiz M, Cases A. Inflamación y aterotrombosis. Precocidad de la lesión vascular. Opciones diagnósticas y terapéuticas para prevención primaria. *Nefrología* 2008;S3: 23-7.
- ³¹⁵ Carracedo J, Ramirez R, Madueno JA, Soriano S, Rodríguez-Benot A, Rodríguez M et al. Cell apoptosis and hemodialysis induced inflammation. *Kidney Int* 2002;61:89-93.
- ³¹⁶ Bayes B, Pastor MC, Bonal J, Junca J, Hernández JM, Riutort N, et al. Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxidation and mortality in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003,18:106-12.
- ³¹⁷ Apple FS, Murakami MM, Pearce LA, Herzog CA. Multi-biomarker risk stratification of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, high-sensitivity C-reactive protein, and cardiac troponin T and I in end-stage renal disease for all-cause death. *Clin Chem* 2004;50:2279-85.
- ³¹⁸ Cava F, Gonzalez C, Pscual MJ, Navajo JA, Gonzalez-Buitrago JM. Biological variation of interleukin 6 (IL-6) and soluble interleukin 2 receptor (sIL2R) in serum of healthy individuals. *Cytokine* 2000;12:1423-5.
- ³¹⁹ Jaffe AS, Ordoñez-Llanos J. Troponina cardíaca ultrasensible: de la teoría a la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* 2013;66:687-91.
- ³²⁰ Willging S, Keller F, Steinbach G. Specificity of cardiac troponin I and T in renal disease. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:87-92.
- ³²¹ Mbagaya W, Luvai A, Lopez B. Biological Variation of Cardiac Troponin in Stable Haemodialysis Patients. *Ann Clin Biochem*. En Prensa 23 Abril 2015.

- ³²² Aakre KM, Røraas T, Petersen PH, Svarstad E, Sellevell H, Skadberg O, et al. Week to week biological variation in Cardiac Troponin T and Cardiac Troponin I in Hemodialysis Patients and Healthy Controls. *Clin Chem* 2014;60:838-47.
- ³²³ Vasile CV, Saenger KA, Kroninig MJ, Jaffe SA. Biological and analytical variability of a novel high-sensitive cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 2010;56:1086-90.
- ³²⁴ Frankenstein L, Wu AHB, Hallermayer K, Wians FH, Giannitsis E, Katus HA. Biological variation and reference change value of high-sensitivity troponin T in healthy individuals during short and intermediate follow-up periods. *Clin Chem* 2011;57:1068-71.
- ³²⁵ Browing MC, Ford RP, Callaghan SJ, Fraser CG. Intra- and interindividual biological variation of five analytes used in assessing thyroid function: implications for necessary standards of performance and the interpretation of results. *Clin Chem* 1986;32:962-6.
- ³²⁶ Chuang CK, Lin SP, Chen HH, Chen YC, Wang TS, Shieh WH, et al. Plasma free amino acids and their metabolites in Taiwanese patients on hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Chim Acta* 2006;364:209-16.
- ³²⁷ Kalantar-Zadeh K, Block G, McAllister CJ, Humphreys MH, Kopple JD. Appetite and inflammation, nutrition, anemia, and clinical outcome in hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr* 2004;80:299-307.
- ³²⁸ Mitch WE. Proteolytic mechanisms, not malnutrition, cause loss of muscle mass in kidney failure. *J Ren Nutr* 2006;16:208-11.
- ³²⁹ Carrero JJ, Park SH, Axelsson J, Lindholm B, Stenvinkel P. Cytokines, atherogenesis, and hypercatabolism in chronic kidney disease: a dreadful triad. *Semin Dial* 2009;22:381-6.
- ³³⁰ Ros S, Carrero JJ. Endocrine alterations and cardiovascular risk in CKD: is there a link? *Nefrologia* 2013;33:181-7.
- ³³¹ Boirie Y, Albright R, Bigelow M, Nair KS. Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency. *Kidney Int* 2004;66:591-6.
- ³³² Moller N, Meek S, Bigelow M, Andrews J, Nair KS. The kidney is an important site for in vivo phenylalanine-to-tyrosine conversion in adult humans: A metabolic role of the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1242-6.
- ³³³ Hyltoft Petersen P, Feldt-Rasmussen U, Horder M, Blaabjerg O, Thygesen K. Variability of plasma proteins according to molecular size. Long-term and short-term intra-individual variation. *Scan J Clin Lab Invest* 1981;41:143-50.

- ³³⁴ Statland BE, Winkel P, Killingsworth LM. Factors Contributing to Intra-Individual Variation of Serum Constituents: Physiological Day-to-Day Variation in Concentrations of 10 Specific Proteins in Sera of Healthy Subjects. *Clin Chem* 1976; 22:1635-38.
- ³³⁵ Talwar DK, Azharuddin MK, Williamson C, Teoh YP, McMillan DC, O'Reilly J. Biological variation of vitamins in blood of healthy individuals. *Clin Chem* 2005;51:2145-50.
- ³³⁶ Prior LR, Crim MC, Castaneda C, Lammi-Keefec C, Dawson-Hughes B, Spindler AA. Conditions altering plasma concentrations of urea cycle and other amino acids in elderly human subjects. *J Am Coll Nutr* 1996;15:237-47.
- ³³⁷ Caballero B, Gleason RE, Wurtman R J. Plasma amino acids concentrations in healthy elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1249-1252.
- ³³⁸ Fraser CG, Williams P. Short-term biological variation of plasma analyte in renal disease. *Clin Chem* 1983;29:508-10.
- ³³⁹ Corte Z, Venta R. Biological variation of free plasma aminoacids in healthy individuals. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:99-104.
- ³⁴⁰ Van Hoydonck P, Schouten E, Temme E. Reproducibility of Blood Markers of Oxidative Status and Endothelial Function in Healthy Individuals. *Clin Chem* 2003;49:963-5.
- ³⁴¹ McKindley M, Strain JJ, McPartlin J, Scott J, McNulty H. Plasma Homocysteine Is Not Subject to Seasonal Variation. *Clin Chem* 2001;47:1430-6.
- ³⁴² Arboleya L. Trastorno mineral y óseo asociado a la enfermedad renal crónica. *Reumatol Clin* 2011;7:18-21.
- ³⁴³ Zittermann A, Lodice S, Pilz S, Grant WB, Bagnardi V, Gandini S. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr* January 2012;95:91-100.
- ³⁴⁴ Melamed ML, Thadhani RL. Vitamin D Therapy in Chronic Kidney Disease and End Stage Renal Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:358-65.
- ³⁴⁵ Michaud J, naud J, Quimet D, Demers C, Petit JL, Leblond FA, et al. Reduced Hepatic Synthesis of Calcidiol in Uremia. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1488-97.
- ³⁴⁶ González-Revaldería J, García-Bermejo S, Menchén-Herrerros A, Fernández-Rodríguez E. Biological variation of Zn, Cu, and Mg in serum of healthy subjects. *Clin Chem* 1990; 36:2140-1

³⁴⁷ Viljoen A, Singh DK, Twomey PJ, Farrington K. Analytical quality goals for parathyroid hormone based on biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1438-42.

³⁴⁸ Viljoen A, Singh DK, Farrington K, Twomey PJ. Analytical quality goals for 25-vitamin D based on biological variation. *J Clin Lab Anal* 2011;25:130-3.

³⁴⁹ Biosca C, Ricós C, Lauzurica R, Petersen HP. Biological variation at long-term renal post-transplantation. *Clin Chim Acta* 2006;368:188-91.

³⁵⁰ Gardham C, Stevens PE, Delaney MP, LeRoux M, Coleman A, Lamb EJ. Variability of parathyroid hormone and other markers of bone mineral metabolism in patients receiving hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1261-7.

Anexo I. Publicaciones

Biological variation of free plasma amino acids in healthy individuals

Zoraida Corte¹ and Rafael Venta^{1,2,*}

¹ Servicio de Análisis Clínicos, Hospital San Agustín, Avilés, Principado de Asturias, Spain

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Principado de Asturias, Spain

Abstract

Background: Biological variation data for free plasma amino acids are lacking from the more comprehensive databases. Therefore, we determined the intra- and inter-individual components of variation in healthy subjects. These data were used to define desirable goals for imprecision, bias and total error, indices of individuality and reference change values.

Methods: Plasma samples were collected from 11 volunteers at weekly intervals over 5 weeks. Free plasma amino acids were analyzed by reversed-phase HPLC and analytical and biological variation data were derived using ANOVA.

Results: Intra-individual coefficients of variation ranged from 9.5% to 46.4%, with lower values among the essential amino acids. The mean inter-individual coefficient of variation was 46.6% and was higher than intra-individual values for all amino acids. Thus, indices of individuality were below 0.8. Reference change values ranged from 30.9% to 128.4% and total error values ranged from 15.2% to 61.0%.

Conclusions: Plasma amino acids exhibit relatively low intra-individual coefficients of variation, with essential amino acids showing tighter homeostatic control. Analytical quality goals can be reasonably achieved with current methods. Reference intervals are of limited value in the detection of unusual results in an individual. Therefore, comparison of serial results by means of the reference change values is recommended.

Clin Chem Lab Med 2010;48:99–104.

Keywords: analytical quality specifications; biological variation; plasma amino acids.

Introduction

Measurement of free plasma amino acids has been used as a useful biochemical parameter for the diagnosis, prognosis

and clinical management of inborn errors of amino acid metabolism (1–4). In addition, in adults they are used primarily in the assessment of nutritional status (4–7). In recent years, the importance of nutritional status in patients with chronic renal or liver disease has been emphasized by studies that relate malnutrition with increased morbidity and mortality. Thus, nutritional status as assessed by plasma concentrations of amino acids in predialysis patients has been considered to be a predictor for prognosis in the first period of dialysis (8–10). Also, nutritional related imbalances of free plasma amino acids before transplant surgery in patients with chronic liver disease have been associated with a higher rate of complications and a decreased overall survival rate following transplantation (11, 12).

Correct interpretation of changes in the plasma amino acid profile in these situations would benefit from knowledge of the inherent random variation in plasma concentrations, usually termed biological variation. Within-subject or intra-individual biological variation could be described as the average random fluctuation around a homeostatic setting point. Between-subjects or inter-individual biological variation is defined as the difference between the set-points of individuals (13, 14). Quantitative data of the components of biological variation have been used to assess the utility of population-based reference intervals through the index of individuality (II) (15, 16), and to calculate the reference change value (RCV) required for the assessment of the significance of changes in serial results from an individual (17, 18). Likewise, it has been suggested that desirable analytical quality specifications are best based on components of biological variation (19, 20).

The method commonly employed in clinical laboratories for the analysis of free plasma amino acids is automated ion-exchange chromatography (IEC) in combination with post-column ninhydrin detection. This methodology provides simplicity in sample preparation and high reproducibility, being considered the reference method (21, 22). However, the long analytical run time is the main drawback (22, 23). Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) has been used as an alternative due to its higher sensitivity, versatility and speed of analysis. The most common RP-HPLC methods involve precolumn derivatization with phenylisothiocyanate (PITC) or o-phthalaldehyde (OPA). OPA methods have been proposed for measurement of primary amino acids in physiological fluids, while PITC methods have been recommended when both primary and secondary amino acids are being determined (22).

Objective quality specifications for imprecision (I), bias (B) and total error (TE) of these measurements have not been defined. In addition, data regarding the biological variation

*Corresponding author: Dr. Rafael Venta, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital San Agustín, Camino de Heros 6, 33400 Avilés, Asturias, Spain
Phone: +34 985 123 014, Fax: +34 985 123 025,
E-mail: rafael.venta@sespa.princast.es

Received July 15, 2009; accepted September 10, 2009;
previously published online November 25, 2009

of free plasma amino acids have not been documented in the more comprehensive biological variation databases (24, 25). This lack of reliable biological variation data could be related to technical complications associated with the measurement of plasma amino acids. In particular, the long analytical run time in the IEC method may have hampered the application of experimental models recommended for the study of biological variation (13).

In the present study, we used a RP-HPLC method with PITC pre-column derivatization to obtain data on biological variation (intra- and inter-individual) for free plasma amino acids in apparently healthy persons. The data were used to define analytical quality specifications (I, B, TE), to assess the usefulness of population-based reference intervals, to evaluate the significance of changes in serial results from an individual, and to establish the number of specimens required to estimate the homeostatic setting point of an individual (NHSP).

Materials and methods

Subjects and samples

Eleven apparently healthy volunteers (8 females and 3 males; age range, 21–50 years) were recruited for this study. During the study period, all maintained their usual lifestyles. The study was performed in accordance with the Helsinki Declaration and the design and execution of the experiment were explained thoroughly to the participants, and informed consent was obtained.

Once weekly for 5 weeks and at the same time of the day (8:30–10:00), blood samples were obtained from each volunteer (only 4 weeks in one subject) under standardized conditions to minimize sources of preanalytic variation. Samples were collected, following an overnight fast, into evacuated lithium heparin gel tubes (Vacuette, Greiner Bio-one, Kremansmünster, Austria), with subjects in a sitting position and avoiding venous stasis. All specimens were immediately centrifuged at 3500 g for 10 min at room temperature. Plasma samples were aliquoted and stored at -80°C for a maximum of three months before analysis.

Analytical method

Measurements of amino acid concentrations in heparinized plasma samples were performed using gradient RP-HPLC with the Pico Tag method (Waters, Milford, MA, USA) according to manufacturer's specifications (26) with a Breeze HPLC analytical system from Waters. All chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany), respectively. HPLC-grade water was obtained from a MilliQ system from Millipore (Bedford, MA, USA). A solution of methionine sulfone, 400 $\mu\text{mol/L}$ in 0.1 mol/L HCl, was used as internal standard and the calibration mixture consisted of two commercial solutions of acid-neutral and basic amino acids in HCl 0.1 mol/L, plus a solution of glutamine in water. The concentration of each amino acid in the final mixture was 400 $\mu\text{mol/L}$, except for cystine which had a concentration of 200 $\mu\text{mol/L}$.

Prior to analysis, all samples were thawed at room temperature and mixed to ensure homogeneity. Using pre-rinsed (0.1 mol/L HCl) filter devices (Microcon Ultracel YM-10, Millipore), 400 μL of each sample, diluted 1:1 with internal standard, were deproteinized

by ultrafiltration through a regenerated cellulose membrane with a molecular weight (M_r) limit of 10,000. Deproteinized samples (50 μL) were derivatized with PITC by means of three steps of evaporation to dryness in a vacuum station (Waters). The first drying step was performed on the calibration mixture and sample ultrafiltrates. A second drying step was performed following treatment with 10 μL of a solution of methanol (1 mol/L sodium acetate-triethylamine (2:2:1 by volume), and a third step after treatment for 10 min with 20 μL of a derivatization reagent (methanol-triethylamine-water-PITC (Pierce); 7:1:1:1 by volume). After derivatization, the phenyltiocarbamyl amino acid derivatives were separated by gradient RP-HPLC on a C_{18} Pico-Tag physiological free amino acid column (300 \times 3.9 mm (i.d.)) at 46°C , using a stated binary gradient of Waters eluents 1 and 2 at a flow rate of 1.0 mL/min. Separation took 65 min.

To remove inter-batch analytical variation, all samples were assayed in a single continuous batch over 5 days. Daily, after random selection, a fifth of derivatized patient samples were dissolved in 100 μL of the sample diluent (Waters) and 10 μL was injected. To calculate intra-batch analytical variation, the first sample collected from each subject was deproteinized, derivatized and analyzed in duplicate. Single lots of reagents, eluents and calibrators were used and the assay was performed by a single analyst to minimize analytical variation. For routine quality control, aliquots of a lyophilized plasma pool, stored at -20°C , are analyzed with every batch. The assay is evaluated on a regular basis through participation in the ERNDIM external quality assessment (EQA) scheme (<http://www.erndimqa.nl>).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS software (11.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). A Gaussian distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test and by verification of the straightness of a normal plot. Data for free plasma amino acids showed a Gaussian distribution. Thus, outliers were defined as those values exceeding ± 3 SD and tested at two levels: individual data from every subject (within-subject data) and global data from all subjects (between-subjects data). After exclusion of outliers, biological variation data were estimated according to the method published by Fraser et al. (13, 14).

Analytical variance (SD_A^2) was calculated from the differences between the duplicates according to the formula:

$$\text{SD}_A^2 = \sum d^2 / 2N$$

where d is the difference between duplicates and N is the number of duplicates. The SD_A^2 is expressed as relative SD_A to the first sample concentration, analytical coefficient of variation (CV_A). For each free plasma amino acid, one-way analysis of variance was used to divide the total variance into between-subject (SD_G^2) variance and total within-subject variance (SD_{TI}^2). Since SD_{TI}^2 includes both biological and analytical components, the within-subject variance (SD_I^2) was obtained by subtraction using the formula:

$$S_I^2 = S_{\text{TI}}^2 - S_A^2$$

Within-subject and between-subject biological variation was expressed as the coefficient of variation by the use of the homeostatic mean of each individual, within-subject coefficient of variation (CV_I) and the overall mean, between-subject coefficient of variation (CV_G), respectively.

Biological variation data for free plasma amino acids were used to estimate the desirable quality specifications for I, B and TE, using the following formulas (19).

$$I = 0.5CV_I$$

$$B = 0.25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

$$TE = 1.65(0.5CV_I) + 0.25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

The II, which yields information regarding the utility of population-based reference intervals, was calculated as the ratio CV_I/CV_G (16). The RCV, which is the difference required for two serial results measurements to have clinically significantly changed at $p < 0.05$, was calculated as in (17).

$$RCV = 2^{1/2} \cdot 1.96(CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2} = 2.77CV_{TI}$$

The NHSP for each amino acid with a statistical confidence of 95% and $\pm 20\%$ accuracy was calculated as in (27):

$$NHSP = [1.96(CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}/20]^2$$

Results

Of the 1350 data points, 44 were classified as outliers. The number of remaining data points for each amino acid is

shown in Table 1. Data points excluded were below 10% for each amino acid, and a uniform distribution of these outliers was observed among samples and subjects. Also shown in Table 1 are the overall means, ranges, and the CV_I and CV_G for each amino acid. Also shown is the II, RCV and NHSP, which are derived from the data on biological variation. Because of the small sample size, significant differences in the CV between sexes cannot be demonstrated, therefore, only the totals are presented.

The CV_I values observed for free plasma amino acids ranged from 9.5% to 46.4%, with a median of 15.3%. The CV values for essential amino acids were generally lower than that of the non-essential amino acids, for both within- and between-subjects, indicating tighter homeostatic control. Mean CV_G was 46.6% and CV_G was higher than CV_I for all amino acids, with values for Pro and Trp over 100%. As a result, the II values obtained for free plasma amino acids were below 1 (range, 0.2–0.8), with most being below 0.6. The RCV values, computed as a significant ($p < 0.05$) change between serial results, ranged from 30.9% to 128.4%, and values below 50% were observed for the essential amino acids. For most of the amino acids, 1–4 samples would be sufficient to provide an estimate of the homeostatic set point (within $\pm 20\%$ with a confidence of 95%), with the exception of Trp among the essential amino acids.

Table 1 Components of biological variation and derived parameters for free plasma amino acids.

Amino acid	n ^a	Mean, $\mu\text{mol/L}$	Range, $\mu\text{mol/L}$	CV_I^b , %	CV_G^c , %	II ^d	RCV ^e , %	NHSP ^f
Abu ^g	52	21.1	9.2–33.2	24.7	32.3	0.8	73.0	7
Ala	54	405.7	215.8–597.7	14.7	55.8	0.3	41.3	2
Arg	51	81.4	45.3–130.1	19.3	34.1	0.6	54.3	4
Asn	54	128.7	85.6–177.4	12.3	28.0	0.4	35.0	2
Asp	50	2.9	0.8–5.3	31.2	55.1	0.6	88.2	10
Cit	51	57.6	11.7–84.5	21.4	43.9	0.5	62.7	5
(Cys) ₂ ^h	53	22.2	5.5–44.1	38.3	48.5	0.8	112.3	16
Glu	50	58.8	25.1–155.7	46.4	79.9	0.6	128.4	21
Gln	52	546.3	350.2–676.6	12.1	22.0	0.6	34.0	2
Gly	54	211.1	117.9–338.9	11.8	40.3	0.3	33.0	1
His	53	62.2	40.6–81.5	9.7	27.2	0.4	36.2	1
Hyp ⁱ	50	12.0	0.8–28.6	34.5	56.7	0.6	96.5	12
Ile	53	46.4	27.6–79.4	15.5	45.5	0.3	46.0	3
Leu	53	136.8	85.7–248.4	14.8	44.0	0.3	44.1	2
Lys	53	164.9	102.7–231.0	11.5	38.2	0.3	33.7	1
Met	53	28.3	12.2–42.7	14.7	43.4	0.3	41.9	2
Orn	53	51.1	25.5–99.9	18.4	54.9	0.3	52.5	3
Phe	52	63.0	38.7–96.1	9.5	40.6	0.2	30.9	1
Pro	52	276.0	137.3–620.2	17.0	104.4	0.2	58.1	3
Ser	52	108.6	56.1–158.0	12.8	42.8	0.3	36.0	2
Tau ^j	53	63.6	32.2–120.9	30.6	44.0	0.7	85.3	9
Thr	54	143.0	82.3–215.6	17.9	33.1	0.5	50.7	3
Trp	52	27.3	7.9–81.9	22.7	152.6	0.2	65.8	6
Tyr	52	73.3	40.4–127.5	10.5	61.0	0.2	31.1	1
Val	51	220.1	128.1–324.9	10.6	40.1	0.3	32.3	1

^an, number of data available for each amino acid after the exclusion of outliers; ^b CV_I , within-subject coefficient of variation; ^c CV_G , between-subject coefficient of variation; ^dII, index of individuality; ^eRCV, reference change value (bi-directional 95% confidence); ^fNHSP, number of samples required to estimate the homeostatic setting point (95% confidence, 20% accuracy); ^gAbu, α -aminobutyric acid; ^h(Cys)₂, cystine; ⁱHyp, hydroxyproline; ^jTau, taurine.

Duplicate samples were used to calculate intra-batch imprecision. The CV_A values are shown in Table 2. Differences in duplicate data for free plasma amino acids showed a Gaussian distribution with the exception of Pro which required log-transformation of the raw data. For each plasma amino acid, the between-batch imprecision from 11 routine analyses performed over three months and the desirable quality specifications for I, B and TE derived from biological variation data are presented in Table 2. The CV_A of our laboratory method were less than the desirable imprecision goals for all amino acids except His and Phe for the intra-batch imprecision, and His, Phe or Lys for inter-batch imprecision. TE values ranged from 15.2% to 61.0%, with a median of 23.6% for the essential and 30.1% for the non-essential amino acids.

Discussion

The increasing interest in the application of biological variation data has prompted the study of several “esoteric” analytes, such as N-terminal pro-brain natriuretic peptide (28), blood vitamins (29) or asymmetric dimethylarginine (30). However, to our knowledge, no previous specifically designed studies on biological variation have been reported for free plasma amino acids. We have generated biological variation data for free plasma amino acids using an experi-

mental protocol which represents a trade-off between the long analytical run times required per analysis, and the recommended duplicate examination in a single analytical batch (13). The random duplicate analysis of the first sample collected from each subject allowed us to estimate the analytical variation keeping an adequate number of subjects and specimens.

Free plasma amino acids exhibit relatively low CV_I values, similar to those reported for other diet related metabolites such as, plasma vitamins (29). The essential amino acids showed lower CV_I than non-essential amino acids. This probably reflects differences in metabolic control since the non-essential amino acids would be more influenced by potential changes in physiologic conditions between sampling dates (1, 20). Prior et al. (31), in a study of conditions altering plasma concentrations of amino acids in elderly women, generated estimates of biological variation and described equivalent CV_I data and similar differences between the CV_I values for essential and non-essential amino acids. In contrast, our study shows higher CV_G values for the majority of plasma amino acids compared with those observed by Prior et al. in fasted elderly subjects. Differences in populations studied and experimental protocols may explain these discrepancies.

The utility of population-based reference intervals in clinical decision-making depends on the individuality of the analyte (16), which is expressed as II. When the II is <0.6 , the

Table 2 Assay imprecision and desirable specifications derived from biological variation data.

Amino acid	CV_A intra ^a , %	CV_A inter ^b , %	I ^c , %	B ^d , %	TE ^e , %
Abu ^f	9.3	9.9	12.3	10.2	30.5
Ala	2.7	4.0	7.3	14.4	26.5
Arg	3.0	3.3	9.7	9.8	25.8
Asn	3.1	4.6	6.1	7.6	17.7
Asp	5.7	6.4	15.6	15.8	41.7
Cit	7.2	7.4	10.7	12.2	47.2
(Cys) ₂ ^g	13.3	15.9	19.1	15.4	47.0
Glu	2.6	3.8	23.1	23.1	61.0
Gln	2.1	2.9	6.0	6.3	16.2
Gly	1.4	3.2	5.9	10.5	20.2
His	5.5	5.5	4.9	7.2	15.2
Hyp ^h	4.3	8.3	17.3	16.6	45.1
Ile	5.8	6.1	7.8	12.0	24.9
Leu	5.9	6.2	7.4	11.6	23.8
Lys	4.0	9.4	5.7	10.0	19.4
Met	3.6	7.3	7.3	11.5	23.6
Orn	4.4	9.2	9.2	14.5	29.7
Phe	5.9	6.0	4.7	10.4	18.2
Pro	1.5	3.0	10.4	26.4	40.1
Ser	2.3	2.8	6.4	11.2	21.7
Tau ⁱ	3.5	4.7	15.3	13.4	38.6
Thr	3.7	4.3	8.9	9.4	24.1
Trp	6.7	8.1	11.4	38.6	48.0
Tyr	3.9	4.0	5.2	15.5	24.1
Val	5.0	5.0	5.3	10.4	19.1

^a CV_A intra, intra-batch analytical imprecision; ^b CV_A inter, inter-batch analytical imprecision; ^cI, imprecision; ^dB, bias; ^eTE, total error; ^fAbu, α -aminobutyric acid; ^g(Cys)₂, cystine; ^hHyp, hydroxyproline; ⁱTau, taurine.

analyte shows high individuality and a single result compared with the reference interval is considered to have little diagnostic value. In contrast, when II is >1.4 , the analyte shows low individuality and reference intervals are clinically useful (13, 14). In our study, the II was <0.8 for all amino acids studied, indicating the limited diagnostic utility of reference intervals in the context of nutritional assessment. Comparison of serial results from the amino acid profile for an individual seems to be of most value for appropriate clinical interpretation.

The RCV is an important clinical tool for the assessment of changes in patients being monitored in pathological situations (14, 17). The RCVs were high for amino acids primarily due to their within-subject component of variation, a common finding in other diet-related metabolites studied in plasma (29). Therefore, relatively large differences between results of sequential samples would be required, i.e., a difference of 31% between two consecutive results in hyperphenylalaninemia monitoring would be necessary to indicate significant changes as a result of treatment. Interestingly, <3 – 4 sampling days are needed to establish characteristic concentrations for the majority of the amino acids, according to biological variation data.

The European consensus established that the best quality specifications in laboratory medicine are those based on biological variation (19, 20). Also, a desirable analytical CV of 0.5 times CV_I is usually considered because this assay imprecision adds only a 12% to the data variability. This desirable goal for imprecision was widely fulfilled in our laboratory for free plasma amino acids, except for His, Phe and Lys. As a consequence of their lower CV_I , these essential amino acids would require more stringent assay performance, although the measurement easily meets the minimum goal for imprecision (0.75 CV_I). In addition, it has been proposed (32) that EQA schemes should use TE based on biology for describing the maximum allowable error for single determinations of quality-control materials. Therefore, it is hoped that these biological variation data may serve to apply this approach in the analysis of free plasma amino acids.

In summary, we generated biological variation data for free plasma amino acids, observing relatively low CV_I values, especially for some essential amino acids like His, Phe and Val. Analytical quality specifications were derived from biological variation data, and imprecision goals can be reasonably achieved with current methods. Reference intervals for free plasma amino acids are of limited value in the detection of unusual results for a particular individual, and sequential analysis of the amino acids profile by means of the RCV is recommended.

Acknowledgements

This research was partially supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria to RV (FIS 02/0665). The authors thank the subjects who participated in the study and J. Muñoz for the excellent technical assistance.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Research funding: None declared.

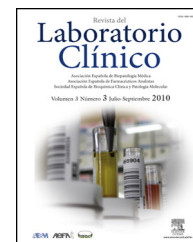
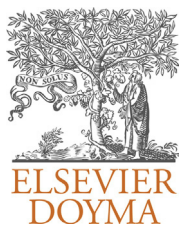
Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

- Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases, 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2003.
- Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H, Wadman SK. Disturbance of amino acid metabolism: clinical chemistry and diagnosis. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1981.
- Longo N. Inherited disorders of amino acid metabolism in adults. In: Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo N, Jameson JL, Fauci AS, editors. Harrison's principles of internal medicine, 6th ed. Blacklick, Ohio: McGraw Hill Professional, 2004: 2387–90.
- Acosta PB. Nutrition support of inborn errors of metabolism. In: Samour PQ, King K, editors. Handbook of pediatric nutrition, 3rd ed. Sudbury, Mass: Jones & Bartlett, 2005:239–87.
- Rudman D, Mattson DE, Feller AG, Cotter R, Johnson RC. Fasting plasma amino acids in elderly men. *Am J Clin Nutr* 1989;49:559–66.
- Caballero B, Gleason RE, Wurtman RJ. Plasma amino acid concentrations in healthy elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1249–52.
- Palova S, Charvat J, Masopust J, Klapkova E, Kvapil M. Changes in the plasma amino acid profile in anorexia nervosa. *J Int Med Res* 2007;35:389–94.
- Ivarsen P, Tietze IN, Pedersen EB. Nutritional status and amino acids in granulocytes and plasma in patients with chronic renal disease and varying residual renal function. *Nephron* 2001;88: 224–32.
- Chuang CK, Lin SP, Chen HH, Chen YC, Wang TJ, Shieh WH, et al. Plasma free amino acids and their metabolites in Taiwanese patients on hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Chim Acta* 2006;364:209–16.
- Malgorzewick S, Debska-Slizien A, Rutkowski B, Lysiak-Szydłowska W. Serum concentration of amino acids versus nutritional status in hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2008;18: 239–47.
- Henkel AS, Buchman AL. Nutritional support in chronic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:202–9.
- Schulte-Frohlinde E, Wagenpfeil S, Willis J, Lersch C, Eckel F, Schmid R, et al. Role of meal carbohydrate content for the imbalance of plasma amino acids in patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1241–8.
- Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27:409–37.
- Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington DC: AACC Press, 2001.
- Henry J, Peticlerc C, Fuentes-Arderiu X, Petersen PH, Queraltó JM, Schiele F, et al. Need for revising the concept of reference values. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:589–95.

16. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:758–64.
17. Ricos C, Cava F, García-Lario JV, Hernandez A, Iglesias N, Jiménez CV, et al. The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scan J Clin Lab Invest* 2004;64:175–84.
18. Ricos C, Iglesias N, García-Lario JV, Simon M, Cava F, Hernandez A, et al. Within-subjects biological variation in disease: collates data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem* 2007;44:343–52.
19. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem* 1999;45:321–3.
20. Petersen PH, Fraser CG, Jorgensen L, Brandslund I, Stahl M, Gowans E, et al. Combination of analytical quality specifications based on biological within- and between-subjects variation. *Ann Clin Biochem* 2002;39:543–50.
21. Le Boucher J, Charret C, Coudray-Lucas C, Giboudeau J, Cynober L. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clin Chem* 1997;43:1421–8.
22. Fekkes D. State-of-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples. *J Chrom* 1996;682:3–22.
23. Fekkes D, Voskuilen-Kooyman A, Jankie R, Huijman J. Precise analysis of primary amino acids in urine by an automated high-performance liquid chromatography method: comparison with ion-exchange chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;744:183–8.
24. Ricos C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernandez A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pos, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491–500.
25. Ricos C, García-Lario JV, Alvarez V, Cava F, Doménech M, Hernandez A, et al. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2008 update. <<http://www.westgard.com/guest36.htm>>. Accessed February 22, 2009.
26. Cohen SA, Meys M, Tarwin TL. *The Pico Tag method: a manual of advanced techniques for amino acid analysis*, Rev. 1. Bedford (MA): Millipore, 1989.
27. Fraser CG. Are “scientific statements” the scientific truth? <<http://www.westgard.com/guest23.htm>>. Accessed February 22, 2009.
28. Melzi d’Eril G. Biological variation of N-terminal pro brain natriuretic peptide in healthy individuals. *Clin Chem* 2003;49:1554–5.
29. Talwar DK, Azharuddin MK, Williamson C, Teoh YP, McMillan DC, O’Reilly DSJ. Biological variation of vitamins in blood of healthy individuals. *Clin Chem* 2005;51:2145–50.
30. Blackwell S, O’Reilly J, Talwar D. Biological variation of asymmetric dimethylarginine and related arginine metabolites and analytical performance goals for their measurement in human plasma. *Eur J Clin Invest* 2007;37:364–71.
31. Prior LR, Crim MC, Castaneda C, Lammi-Keefe B, Dawson-Hughes CJ, Rosen J, et al. Conditions altering plasma concentrations of urea cycle and other amino acids in elderly human subjects. *J Am Coll Nutr* 1996;15:237–47.
32. Fraser CG, Petersen PH. Quality goals in external quality assessment are best based on biology. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53(Suppl 212):8–9.



ORIGINAL

Variación biológica de lípidos y lipoproteínas séricas en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal



Zoraida Corte Arboleya^a y Rafael Venta Obaya^{a,b,*}

^a Servicio de Bioquímica, Hospital San Agustín, Avilés, Asturias, España

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias, España

Recibido el 3 de mayo de 2014; aceptado el 10 de julio de 2014

Disponible en Internet el 21 de agosto de 2014

PALABRAS CLAVE

Variación biológica;
Enfermedad cardiovascular;
Enfermedad renal crónica;
Valor de referencia del cambio

Resumen

Introducción: Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las principales causas de morbimortalidad tanto en la población general como en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT), siendo las dislipemias uno de los principales factores de riesgo asociados. Una correcta interpretación del perfil lipídico solo puede realizarse teniendo en cuenta su variación biológica. Se han estimado los datos de variación biológica de los lípidos y lipoproteínas séricas en individuos sanos y en pacientes con ERCT y, a partir de ellos, calculado el valor de referencia del cambio (VRC), el índice de individualidad y las especificaciones de calidad deseables.

Material y métodos: Se obtuvieron muestras de suero de 18 pacientes con ERCT, mensualmente durante un periodo de 6 meses, y de 11 sujetos aparentemente sanos, una vez por semana durante 5 semanas consecutivas. La estimación de los datos de BV se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA).

Resultados: Las concentraciones de triglicéridos y colesterol VLDL eran significativamente mayores en pacientes con ERCT que en individuos sanos, mientras que la concentración de colesterol HDL era significativamente menor. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los componentes de variación biológica y, en consecuencia, las estimaciones del índice de individualidad, los VRC y las especificaciones de calidad analítica fueron semejantes.

Conclusiones: Los VRC derivados de individuos sanos son adecuados para el seguimiento de la dislipemia en pacientes con ERCT. Unos VRC asimétricos, consecuentes con la distribución no gaussiana de las concentraciones observadas en ambos grupos, permitirían evaluar de una forma más exacta la respuesta al tratamiento hipolipemiente en individuos dislipémicos.

© 2014 AEEM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rafael.venta@sespa.princast.es (R. Venta Obaya).

KEYWORDS

Biological variation;
Chronic renal
disease;
Cardiovascular
disease;
Reference value
change

Biological variation of serum lipids and lipoproteins in healthy individuals and in end-stage renal disease patients**Abstract**

Introduction: Cardiovascular diseases are a major cause of morbidity and mortality in both the general population and in patients with end stage renal disease (ESRD), with dyslipidemia being the one of the main associated risk factors. A correct interpretation of the lipid profile can only be made when the within- and between-subject biological variation is taken into account. In this study the biological variation data has been estimated for serum lipids and lipoproteins in healthy individuals and ESRD patients, and these data were then used to define the reference value change (RVC), the index of individuality, and the analytical goals.

Material and methods: Serum samples were collected from 18 ESRD patients in steady-state conditions, one per month during 6 months, and from 11 healthy volunteers at weekly intervals over 5 weeks. Biological variation data were derived using ANOVA.

Results: Triglycerides and VLDL cholesterol concentrations were significantly higher in ESRD patients than in healthy individuals, whereas HDL cholesterol concentration was significantly lower. However, no differences were observed in the biological variation data and, consequently, the derived RVCs, index of individuality and analytical goals were similar.

Conclusions: The use of the RVC derived from healthy individuals is appropriate in the monitoring of dyslipidemia in ESRD patients. Asymmetric RVC, according to the non-Gaussian distribution of serum concentrations in both groups, would enable the response to the hypolipemiant treatment in dyslipidemic individuals to be assessed more accurately.

© 2014 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen una de las principales causas de morbimortalidad en la sociedad occidental actual, suponiendo su prevención y tratamiento en torno al 15% del gasto de sanitarío total en España^{1,2}. Entre los principales factores de riesgo cardiovascular (FRCV), el tabaquismo, el sedentarismo, los inadecuados hábitos dietéticos, la hipertensión arterial y las dislipemias, se consideran FRCV modificables. A este respecto, la Organización Mundial de la Salud señala que estos FRCV son responsables del 80% de los casos de cardiopatía coronaria y de enfermedad cerebrovascular, y que su prevención podría reducir hasta en un 75% la mortalidad por ECV^{3,4}.

Las dislipemias, fundamentalmente la hipercolesterolemia, se consideran factores mayores o causales en el desarrollo de las ECV⁵, así como una de las dianas terapéuticas más sensibles a las medidas de prevención y control^{6,7}. Los resultados del Estudio sobre Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España publicados en el 2012⁸, revelaron que el 50% de la población española presentaba una concentración de colesterol total sérico (CT) superior a 200 mg/dL, de los cuales un 45% tenía una concentración de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) superior a 130 mg/dL, no observándose diferencias importantes por sexo. Además, el 25% de los varones y el 26% de las mujeres tenían una concentración de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) inferior a 40 y 50 mg/dL, respectivamente. Así mismo, el 23% de los varones y el 12% de las mujeres tenían una concentración de triglicéridos (TG) mayor o igual a 150 mg/dL.

Las principales guías internacionales sobre el Manejo de las Dislipemias y Prevención Cardiovascular⁹⁻¹¹, coinciden en

señalar como objetivo terapéutico fundamental la reducción de la concentración sérica de c-LDL, mientras que los niveles de c-HDL y TG son considerados como moduladores de riesgo, pero no objetivos terapéuticos *per se*. Una de las principales novedades incluida en la reciente actualización de la Guía Europea de Prevención Cardiovascular¹⁰ es la identificación de un grupo de pacientes de muy alto riesgo vascular, en el que, por primera vez, se incluyen los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) avanzada (estadios 4-5). A pesar del importante incremento en la morbimortalidad cardiovascular y en la prevalencia de FRCV descrito en pacientes con ERC terminal en diálisis (ERCT) en relación a la población general, tradicionalmente la ERC no se había considerado en las recomendaciones generales para el tratamiento de la dislipemia. Estas nuevas directrices se producen en consonancia con las recomendaciones de las guías internacionales del consorcio *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* para la Evaluación y Manejo de la ERC¹². Ambas guías sugieren que estos pacientes deberían ser objeto de un plan integral y sistematizado de reducción del riesgo que incluirá, entre otros, el control óptimo de la diabetes, la presión arterial y el perfil lipídico, siendo la meta terapéutica para el c-LDL una concentración ≤ 70 mg/dL^{10,12}.

En este contexto, una correcta interpretación del perfil lipídico será imprescindible para el adecuado diagnóstico y seguimiento de individuos con alto riesgo cardiovascular, tanto en la población general como en pacientes con ERCT, y esto solo podrá llevarse a cabo desde el conocimiento de la naturaleza de la variación biológica (VB) de los lípidos y las lipoproteínas séricas. La VB se define como una fluctuación aleatoria inherente a la concentración sérica de un analito debida a un equilibrio entre el recambio metabólico y la

regulación homeostática, pudiendo distinguirse dos componentes: la VB intraindividual y la VB interindividual. La VB intraindividual se define como una fluctuación aleatoria alrededor de un punto de ajuste homeostático, mientras que la VB interindividual se define como la diferencia entre los puntos de ajuste homeostáticos de los individuos^{13,14}. Estos datos de VB han sido utilizados con diversos propósitos, entre los que se encuentran la evaluación de la utilidad de los valores de referencia poblacionales a través del índice de individualidad (Π)^{13,14}, la obtención de las especificaciones de calidad analítica¹⁵ y la estimación del valor de referencia del cambio (VRC), el cual proporciona información sobre cuál es el cambio mínimo necesario para que las diferencias sean dos cambios consecutivos de un individuo sean consideradas clínicamente significativas¹⁶. El VRC estimado a partir de individuos sanos se emplea de forma habitual en el seguimiento de pacientes con patologías crónicas, si bien, la patología subyacente puede alterar tanto del punto de ajuste homeostático de un analito como la variación en torno a ese punto, por lo que su empleo podría no ser apropiado¹⁷. Por ello, en los últimos años se han publicado un número creciente de estudios sobre VB para marcadores bioquímicos en diversas condiciones patológicas, como por ejemplo, en pacientes trasplantados renales para la detección precoz de rechazo¹⁸.

La naturaleza de la variación biológica del CT, c-HDL y TG ha sido ampliamente estudiada en individuos sanos, encontrándose en las bases de datos internacionales de variación biológica¹⁹. Sin embargo, y a pesar de su relevancia en la valoración del riesgo cardiovascular, la bibliografía disponible para el c-LDL y el colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad (c-VLDL) es escasa e incompleta en individuos sanos y, hasta la fecha, inexistente en pacientes con ERCT.

El objetivo de este estudio ha sido establecer los datos de VB para el c-LDL y el resto de magnitudes del perfil lipídico tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT y, a partir de estos, calcular el VRC, el Π y las especificaciones de calidad deseables.

Material y métodos

Sujetos y muestras

Para la estimación de los datos de VB de las magnitudes del perfil lipídico en ERCT se seleccionaron 20 pacientes (11 mujeres y 9 hombres; rango de edad: 31-75 años) incluidos en el programa de hemodiálisis (HD) del Servicio de Nefrología del Hospital San Agustín (Avilés, Asturias, España). Los criterios de inclusión en el estudio fueron: edad < 75 años, ausencia en la historia clínica de eventos cardiovasculares y tratamientos hipolipemiantes, sin ingresos hospitalarios durante la duración del estudio o en los 3 meses previos, variaciones no significativas en los parámetros bioquímicos empleados en su seguimiento durante el mismo periodo y un peso seco estable. Durante el periodo de seguimiento, dos pacientes fueron hospitalizados debido a neumonía y fiebre de origen desconocido, por lo que fueron eliminados del estudio. Las principales características basales prediálisis de los 18 sujetos restantes (11 mujeres y 7 hombres; rango de edad 31-75 años) se muestran en la [tabla 1](#).

Tabla 1 Características prediálisis de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal

<i>Rango de edad, años</i>	31-75
<i>Mujeres, %</i>	61
<i>Etiología de la ERCT</i>	
Nefropatía diabética, %	28
Riñón poliquístico, %	22
Glomerulonefritis primaria, %	5,5
Nefrosclerosis, %	5,5
Otras enfermedades renales, %	17
Indeterminada, %	22
<i>Hipertensión, %</i>	38
<i>IMC^a, kg/m²</i>	26 (19-32)
<i>Hemoglobina^a, mmol/L</i>	7,5 (7,4-9,5)
<i>Creatinina sérica^a, mg/dL</i>	8,9 (5,3-10,9)
<i>Proteína C reactiva sérica^a, mg/dL</i>	0,6 (0,1-3,0)

ERCT: enfermedad renal crónica terminal; IMC: índice de masa corporal.

^a Los datos se muestran como mediana (rango).

Con fines comparativos, muestras procedentes de 11 individuos aparentemente sanos (8 mujeres y 3 hombres; rango de edad 21-50 años), reclutados para un estudio previo sobre VB, congeladas a -80°C, fueron empleadas también en la estimación de los datos de VB de los lípidos y las lipoproteínas séricas. Ninguno de estos sujetos tenía antecedentes de enfermedad cardiovascular, enfermedad renal o dislipemia, no recibían terapia hipolipemiente y todos ellos mantuvieron su estado de vida habitual durante el periodo de estudio.

El proceso de extracción y manejo de las muestras fue estandarizado siguiendo un estricto protocolo para minimizar la variación preanalítica. Todas las muestras, procedentes tanto de pacientes con ERCT como de individuos sanos, fueron extraídas en condiciones de ayuno, a la misma hora del día (8.30-10.00), mediante técnicas de venipuntura convencional, utilizando tubos de recolección al vacío (Vacuette, Greiner Bio-one, Madrid, España) y evitando en lo posible la estasis venosa. Las muestras procedentes de los pacientes con ERCT fueron extraídas de forma mensual en condiciones prediálisis, obteniéndose una media de 5 muestras por paciente durante un periodo de seguimiento de 6 meses. Las muestras de los individuos sanos fueron tomadas una vez por semana a lo largo de 5 semanas consecutivas. Una vez extraídas, todas las muestras de suero, procedentes tanto de pacientes con ERCT como de individuos sanos, se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos, se centrifugaron a 3.500 g durante 10 minutos, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C durante un máximo de 11 meses antes de su análisis.

El diseño y la ejecución del estudio fue claramente explicado a todos los participantes, obteniéndose su consentimiento informado.

Análisis de las muestras

Las determinaciones de CT, c-LDL, c-HDL y TG se realizaron por métodos enzimáticos colorimétricos en un Cobas 711 (Roche Diagnostic, Barcelona, España). El método empleado para la determinación directa de c-LDL permite su medición selectiva mediante la combinación de la solubilización

micelar de c-LDL por un detergente no iónico y la interacción de un compuesto carbohidratado con las lipoproteínas c-VLDL y quilomicrones. Todos los métodos empleados cumplen con los requisitos del *National Institute of Health* y del *National Cholesterol Education Program* (NCEP) en lo relativo a precisión y exactitud. Para comprobar el adecuado rendimiento de los métodos de medida, previamente al análisis de las muestras se procesaron los dos niveles de control de calidad empleados de forma rutinaria en nuestro laboratorio. Así mismo, los métodos se evalúan de forma regular mediante la participación en programas externos de evaluación de la calidad (SEQC, EQAS).

La concentración de c-LDL fue calculada también mediante la fórmula de Friedwald (c-LDL = CT - c-HDL - TG/5), empleándose para su estimación únicamente las muestras de los sujetos que presentaban una concentración de TG < 200 mg/dL (2,3 mmol/L) (11 sujetos sanos y 13 pacientes con ERCT). La concentración de c-VLDL se calculó mediante la fórmula: c-VLDL = CT - c-LDLm - c-HDL.

Antes de su análisis, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y agitadas durante 30 segundos para asegurar su homogeneidad. Las muestras de los individuos sanos por una parte, y de los pacientes con ERCT por otra, fueron analizadas por duplicado aleatorizado en una misma serie analítica, eliminándose de esta forma la variación analítica interserie. Para minimizar la variación preanalítica, todo el proceso fue realizado en un mismo instrumento, por un mismo operador y empleando el mismo lote de reactivos y calibradores.

Estudio estadístico

El estudio estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS (V15.0). El test de Levene fue empleado para confirmar la homogeneidad de las varianzas. La distribución de las variables se estudió mediante la prueba de Shapiro-Wilk, observándose que todos los lípidos y lipoproteínas séricas mostraban una distribución no gaussiana, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT. La comparación de medianas se realizó mediante el test de Mann-Whitney, considerándose como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los test de Cochran y Reed se emplearon en la identificación de valores aberrantes en los datos de cada sujeto (intrasujeto) y en el conjunto de datos de todos los sujetos (intersujeto), respectivamente.

Si bien el conjunto de datos obtenidos para los lípidos y lipoproteínas séricas no seguían una distribución normal, los datos individuales de cada sujeto presentaban una distribución gaussiana. En este supuesto, Fraser y Harris¹⁴ desaconsejan la transformación logarítmica de los datos para el cálculo de los componentes de VB. Por tanto, tras la eliminación de valores aberrantes, la estimación de los datos de VB se realizó de acuerdo al método publicado por Fraser y Harris^{13,14}.

La varianza analítica (SD_A^2) fue calculada a partir de las diferencias entre los duplicados muestrales, de acuerdo con la siguiente fórmula: $SD_A^2 = \sum d^2 / 2N$, donde d es la diferencia entre duplicados y N es el número de duplicados. Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) para dividir la varianza total de cada uno de los lípidos estudiados en dos componentes: varianza interindividual (SD_G^2) y varianza

total intraindividual o varianza residual (SD_T^2). La SD_T^2 incluye tanto la variación analítica como la biológica intraindividual, por lo que la varianza intraindividual se obtuvo tras sustraer el componente analítico mediante la siguiente fórmula: $SD_I^2 = SD_T^2 - SD_A^2$. Los componentes de VB intra e interindividual se expresaron como porcentaje relativo a la media homeostática de cada individuo (coeficiente de variación intraindividual; CV_I) y a la media global de todos los sujetos (coeficiente de variación interindividual; CV_G), respectivamente. Los intervalos de confianza al 95% para los CV se calcularon de acuerdo a la fórmula publicada por Miller²⁰.

Los datos de VB obtenidos para los lípidos y las lipoproteínas séricas tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT, fueron empleados en la estimación de las especificaciones de calidad deseables para la imprecisión (I) [$I = 0,5CV_I$], el sesgo (B) [$B = 0,25 \times [CV_I + CV_G]^{1/2}$] y el error total (ET) [$ET = 1,65I + B$], así como para el cálculo del σ [$\sigma = CV_I / CV_G$] y el VRC para una probabilidad del 95% [$VRC = 2^{1/2} \times 1,96 \times [CV_A^2 + CV_I^2]^{1/2}$]. Al presentar los datos una distribución ligeramente sesgada, el VRC se evaluó también mediante un método logarítmico descrito por primera vez en las ecuaciones formuladas por Fokkema et al²¹, en las que se emplea el coeficiente de variación total (CV_T) de los datos sin transformar para calcular el parámetro σ de la distribución logarítmica. Este método proporciona un VRC para los incrementos ($VRC_{pos} = [\exp\{1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma\} - 1] \times 100$) y otro para los decrementos ($VRC_{neg} = [\exp\{1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma\} - 1] \times 100$).

Resultados

La [tabla 2](#) recoge los componentes de VB (CV_I , CV_G) obtenidos para cada una de las magnitudes estudiadas, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT, así como el σ , los VRC y las especificaciones de calidad deseables derivadas de estos datos de VB. Así mismo, en la [tabla 2](#) se muestran la mediana y el rango, el coeficiente de variación analítica intraensayo (CV_A) y el número de datos disponible tras la eliminación de outliers. El porcentaje de datos eliminado fue inferior al 2%, distribuyéndose uniformemente entre los sujetos.

La mediana de la concentración sérica de TG (123 mg/dL [1,4 mmol/L]) y c-VLDL (24,6 mg/dL [0,6 mmol/L]) observada en pacientes con ERCT fue significativamente superior a la observada en individuos sanos (71,5 mg/dL [0,8 mmol/L]; 14,3 mg/dL [0,4 mmol/L]), mientras que la concentración de c-HDL fue significativamente inferior (44,1 mg/dL [1,1 mmol/L] en pacientes con ERCT; 61,7 mg/dL [1,6 mmol/L] en individuos sanos). Sin embargo, de acuerdo con los IC 95%, no se observan diferencias significativas en los componentes de VB (CV_I y CV_G) y, en consecuencia, la estimación del σ , los VRC y las especificaciones de calidad son semejantes en individuos sanos y pacientes con ERCT. Como era de esperar, los VRC asimétricos (positivo y negativo) calculados a partir del método logarítmico muestran valores consistentes con el VRC obtenido a partir del enfoque tradicional, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT.

Para evaluar el potencial efecto del tiempo en tratamiento de HD sobre la concentración de los lípidos y las lipoproteínas séricas, la cohorte de pacientes con ERCT se

Tabla 2 Datos de variación biológica y parámetros derivados obtenidos para los lípidos y las lipoproteínas séricas en individuos sanos y pacientes con enfermedad renal crónica terminal

	Individuos sanos					
	TG	CT	c-HDL	c-LDL	c-LDLc	c-VLDL
N	48	54	54	53	48	48
Mediana (IQR), mg/dl	72(48)*	191(28)	62(26)*	106(32)	105(24)	14(10)*
Rango, mg/dL	39-137	156-276	37-96	77-178	77-141	8-32
Mediana (IQR), mmol/L	0,8(0,5)*	4,9(0,7)	1,6(0,7)*	2,7(0,8)	2,7(0,6)	0,4(0,3)*
Rango, mmol/L	0,4-1,6	4,0-7,1	1,0-2,5	2,0-4,6	2,0-3,7	0,2-0,8
CV _A , %	1,8	1,5	1,4	1,4	2,5	1,8
CV _I % (IC 95%)	24,7 (19,4-30,0)	5,4 (4,4-6,4)	9,4 (7,6-11,2)	7,3 (5,9-8,8)	7,0 (5,6-8,5)	29,3 (22,9-35,8)
CV _G % (IC 95%)	58,4 (43,1-73,7)	28,9 (22,9-34,8)	51,4 (39,3-63,5)	43,2 (33,4-52,9)	33,4 (25,9-40,9)	61,0 (44,7-77,2)
ii	0,42	0,19	0,18	0,17	0,21	0,48
VRC, %	68,8	15,5	26,3	20,7	20,7	81,5
VRC _{pos} , %	106,2	20,9	34,8	27,4	30,0	132,3
VRC _{neg} , %	-51,5	-17,3	-25,8	-21,5	-23,1	-56,9
i%	12,4	2,7	4,7	3,7	3,5	14,7
B,%	15,9	7,3	13,1	11,0	8,5	17,0
TE,%	36,3	11,8	20,8	17,0	14,3	41,1
Pacientes con ERCT						
	TG	CT	c-HDL	c-LDL	c-LDLc	c-VLDL
N	98	97	98	98	73	97
Mediana (IQR), mg/dl	123(94)*	176(84)	44(15)*	108(74)	100(43)	25(25)*
Rango, mg/dL	34-414	116-334	21-74	55-212	55-195	7-83
Mediana (IQR), mmol/L	1,4(1,1)*	4,6(2,2)	1,1(0,4)*	2,8(1,9)	2,6(1,1)	0,6(0,6)*
Rango, mmol/L	0,4-4,7	3,0-8,7	0,5-1,9	1,4-5,5	1,4-5,1	0,2-2,1
CV _A , %	2,5	1,1	2,6	1,9	2,1	3,4
CV _I % (IC 95%)	20,3 (17,3-23,2)	7,0 (6,0-7,9)	11,4 (9,8-13,1)	9,8 (8,4-11,2)	11,9 (9,9-13,9)	26,7 (22,6-30,7)
CV _G % (IC 95%)	74,2 (59,1-89,4)	39,6 (33,2-45,9)	51,56 (42,6-60,5)	53,6 (44,1-63,0)	74,2 (56,7-91,8)	72,3 (57,7-86,9)
ii	0,27	0,18	0,22	0,17	0,16	0,37
VRC, %	56,6	19,5	32,5	27,7	33,5	74,5
VRC _{pos} , %	85,7	25,0	47,2	38,2	47,0	125,3
VRC _{neg} , %	-46,2	-20,0	-32,1	-27,6	-32,0	-55,6
i%	10,1	3,5	5,7	4,7	5,6	13,3
B,%	19,2	10,0	13,2	13,6	18,8	19,2
TE,%	36,0	15,8	22,7	21,7	28,6	41,3

B: especificaciones de la calidad deseables para el error sistemático (sesgo); c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-LDLc: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad calculado mediante la fórmula de Friedwald (c-LDLc = CT - c-HDL - [TG/5]); CT: colesterol total; CV_A: coeficiente de variación analítico intraserie; CV_I: coeficiente de variación intraindividual; CV_G: coeficiente de variación interindividual; c-VLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad estimadas mediante la fórmula [c-VLDL = CT-c-LDLm-c-HDL]; ii: especificaciones de la calidad deseables para la imprecisión; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; ii: índice de individualidad; N: número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR): rango intercuartílico; TE: especificaciones de la calidad deseables para el error total; TG: triglicéridos; VRC: valor de referencia del cambio bidireccional (Z = 1,96, 95% de probabilidad); VRC_{neg}: valor de referencia del cambio descendente (negativo) obtenido mediante aproximación logarítmica; VRC_{pos}: valor de referencia del cambio ascendente (positivo) obtenido mediante aproximación logarítmica.

*Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) según el test de Mann-Whitney

dividió en dos grupos. En el primer grupo se incluyeron aquellos pacientes con un tiempo en HD inferior a un año (grupo 1: 8 mujeres, un hombre; rango de edad: 31-75 años), mientras que en el segundo grupo se incluyeron aquellos en tratamiento de HD desde hacía más de un año (grupo 2: 3 mujeres, 6 hombres; rango de edad: 34-75 años). La [tabla 3](#) recoge los valores de las medianas (IQR), el rango y los componentes de VB obtenidos en ambos grupos para cada uno de los parámetros estudiados. La comparación de las medianas de los dos grupos mostró un decremento estadísticamente significativo

en la concentración de CT y c-HDL en función del tiempo en tratamiento de HD (p < 0,05). Por contra, no se observaron diferencias en los datos de VB obtenidos en ambos grupos.

Discusión

Las ECV constituyen la principal causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados, considerándose un problema de salud de primer orden. En el caso de pacientes

Tabla 3 Efecto del tiempo en hemodiálisis en la concentración de lípidos y lipoproteínas séricas y en los datos de variación biológica

	Tiempo en programa de HD <1 año					
	TG	CT	c-HDL	c-LDL	c-LDLc	c-VLDL
N ^o	50	50	50	50	33	50
Mediana (IQR), mg/dl	119(87)	197(97)*	48(13)*	122(86)	90(47)	23(27)
Rango, mg/dL	47-339	116-334	24-74	58-212	58-167	9-68
Mediana (IQR), mmol/L	1,4(1,0)	5,1(2,5)	1,2(0,3)	3,2(2,2)	2,3(1,2)	0,6(0,7)
Rango, mmol/L	0,5-3,9	3,0-8,7	0,6-1,9	1,5-5,5	1,5-4,3	0,2-1,8
CV _i %(IC95%)	18,2 (15,6-20,9)	8,93 (7,7-10,2)	15,9 (12,6-19,1)	10,6 (9,1-12,1)	11,4 (8,6-14,3)	22,8 (19,4-26,2)
CV _G %(IC95%)	76,9 (60,9-92,9)	50,4 (41,7-59,1)	46,3 (35,3-57,2)	77,6 (61,4-93,4)	72,1 (46,9-97,4)	85,0 (66,2-99,7)
	Tiempo en programa de HD >1 año					
	TG	CT	c-HDL	c-LDL	c-LDLc	c-VLDL
N ^o	48	48	48	48	40	48
Mediana (IQR), mg/dl	137,5(96)	166,0(81)*	40(15)*	99,3(50)	95(44)	27,5(19)
Rango, mg/dL	34-414	126-286	21-62	55-195	55-195	7-83
Mediana (IQR), mmol/L	1,6(1,1)	4,3(2,1)	1,0(0,4)	2,6(1,3)	2,5(1,1)	0,7(0,5)
Rango, mmol/L	0,4-4,7	3,3-7,4	0,5-1,6	1,4-5,1	1,4-5,1	0,2-2,1
CV _i %(IC95%)	22,2 (18,9-25,5)	8,3 (7,1-9,5)	14,4 (11,5-17,4)	11,1 (9,5-12,7)	12,3 (9,5-15,1)	23,0 (19,6-26,5)
CV _G %(IC95%)	86,2 (67,1-95,3)	55,7 (45,8-65,7)	53,5 (40,0-67,1)	79,4 (62,6-96,2)	78,9 (52,7-99,5)	80,9 (63,5-98,3)

c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-LDLc: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad calculado mediante la fórmula de Friedwald (c-LDLc = CT - c-HDL - [TG/5]); CV_i: coeficiente de variación intraindividual; CV_G: coeficiente de variación interindividual; CT: colesterol total; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; N: número de datos disponible tras la exclusión de valores aberrantes; (IQR): rango intercuartílico; TG: triglicéridos.

* Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) según el test de Mann-Whitney.

con ERCT este problema es aún más acucioso ya que la tasa de mortalidad cardiovascular es entre 10 y 20 veces superior a la de la población general²². Una correcta interpretación del perfil lipídico, tanto en la población general como en pacientes con ERCT, es clave para la correcta identificación y seguimiento de individuos de alto riesgo. El VRC, obtenido a partir de los datos de VB, ha mostrado ser una herramienta altamente eficaz en la interpretación de la significación clínica de los cambios en las magnitudes bioquímicas de un individuo^{13,16}. Sin embargo, el uso de VRC estimados a partir de los datos de VB obtenidos en individuos sanos puede no ser apropiado para el seguimiento de pacientes con patologías crónicas, ya que la enfermedad puede alterar la naturaleza de la VB de la magnitud estudiada. En este estudio hemos generado datos de VB para el c-LDL y el resto de magnitudes del perfil lipídico tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT y, a partir de ellos, hemos calculado los VRC y el resto de parámetros derivados.

La mediana de la concentración de c-LDL observada en individuos sanos se encontraba ligeramente por encima del valor considerado como óptimo por la guía NCEP ATP III¹¹ para la prevención de ECV, si bien los valores encontrados para CT y c-HDL podían considerarse óptimos para individuos sin otros FRCV asociados. Las concentraciones de TG y c-VLDL observadas en pacientes con ERCT fueron significativamente superiores a las observadas en individuos sanos, mientras que la concentración de CT fue inferior, si bien esta diferencia no alcanzaba significación estadística. Estos hallazgos concuerdan con los estudios publicados sobre dislipemia en pacientes con ERCT, en los que la HD generalmente

se asocia con HD concentraciones de CT y c-LDL normales o bajas, atribuidas a la malnutrición asociada a la diálisis o hipertrigliceridemia, probablemente debida a una acumulación de lipoproteínas ricas en TG, como el c-VLDL²³. Así mismo, nuestro estudio muestra que un mayor periodo en el programa de HD parece estar relacionado con una disminución en la concentración de CT y c-HDL, posiblemente debido a un mayor deterioro en el estado nutricional²⁴.

A pesar de las diferencias en las concentraciones de los lípidos y las lipoproteínas séricas, no se observaron diferencias significativas en los componentes de VB obtenidos en los pacientes con ERCT y los individuos sanos. Los CV_i obtenidos para CT, c-HDL y c-LDL fueron significativamente menores a los encontrados para TG y c-VLDL. Estas diferencias parecen indicar la presencia de unos mecanismos de regulación homeostática menos estrictos, por lo que las concentraciones de TG y c-VLDL estarían más influenciadas por variaciones fisiológicas o dietéticas. El CV_i obtenido para el c-LDL directo es similar tanto al obtenido como al publicado para el c-LDL calculado mediante la fórmula de Friedewald. Esta similitud puede ser explicada por el hecho de que la mayoría de los sujetos estudiados (11 sujetos sanos, 13 pacientes con ERCT) presentaban una concentración de TG inferior a 200 mg/dL, valor a partir del cual la fórmula de Friedewald pierde validez²⁵. Por otra parte, este hecho no ha impedido estimar los valores de VB para el colesterol no-HDL, parámetro considerado como segundo objetivo terapéutico por las principales Guías de Práctica Clínica^{10,11}. Por tanto, serían necesarios estudios adicionales en los que se incluyeran sujetos con concentraciones

séricas de TG superiores a 200 mg/mL, tanto para confirmar la transferibilidad de los CV_I obtenidos para el c-LDL por ambos métodos como para estimar los datos de VB para el colesterol no-HDL.

La comparación de los valores absolutos de los datos de VB publicados en las bases de datos internacionales¹⁹ para lípidos y lipoproteínas séricas con los IC 95% de los CV_I y CV_G obtenidos en nuestro estudio, tanto para individuos sanos como para pacientes con ERCT, muestra que los CV_I son equivalentes a los publicados, mientras que los CV_G observados son significativamente mayores. La estimación de los CV_G, a diferencia de la de los CV_I, es independiente del número de réplicas analizadas o del número de muestras obtenidas por individuo²⁶, por lo que las diferencias encontradas para los CV_G podrían ser atribuidas al relativamente bajo número de individuos incluidos en este estudio.

Los resultados obtenidos para el κ muestran que los lípidos y las lipoproteínas séricas estudiados presentan una fuerte individualidad^{13,14}, lo que pone de manifiesto la escasa utilidad de los valores de referencia poblacionales en la interpretación del perfil lipídico, y apoya las recomendaciones internacionales sobre el empleo de valores discriminantes fijos para el diagnóstico de hiperlipemia¹⁰⁻¹². Al no encontrarse diferencias en los datos de VB, los VRC obtenidos en individuos sanos podrían ser aplicados en el seguimiento del perfil lipídico de los pacientes con ERCT. Estos resultados concuerdan con los datos de la bibliografía, en la que la mayoría de las magnitudes estudiadas presentan valores de CV_I similares en estados patológicos y en individuos sanos, con la excepción de algunos marcadores bioquímicos específicos de órgano como, por ejemplo, la creatinina en pacientes trasplantados renales^{17,18}. Por otra parte, el empleo de los VRC asimétricos permitiría evaluar de una forma más precisa la respuesta al tratamiento de los pacientes con dislipemia, tanto en la población general como en pacientes con ERCT. Para el c-LDL, objetivo terapéutico clave en la prevención y seguimiento de las dislipemias⁵⁻⁷, una adecuada adhesión al tratamiento hipolipemiante se pondría de manifiesto con una reducción en su concentración sérica de, al menos, un 21,5%. En pacientes con ERCT, debido a su característico perfil lipídico²³, pueden cobrar especial importancia los VRC asimétricos para TG y c-VLDL.

Por último, el consenso europeo establece que las mejores especificaciones de calidad para un laboratorio clínico son aquellas obtenidas a partir de los datos de VB¹⁵. A consecuencia de los bajos CV_I obtenidos para CT, c-HDL y c-LDL, las especificaciones de calidad deseables derivadas para la imprecisión son relativamente estrictas ($i = 2,7, 4,7$ y $3,7\%$, respectivamente), si bien estas especificaciones son habitualmente alcanzables en nuestro laboratorio. Por contra, las especificaciones de calidad para la imprecisión obtenidas para TG y c-VLDL son considerablemente más permisibles ($i = 12,4$ y $14,7\%$, respectivamente), por lo que para estas magnitudes el objetivo para la imprecisión debería ser el cumplimiento de las especificaciones óptimas ($i [0,25CV_i] = 6,2$ y $7,3\%$, respectivamente). Por otra parte, debido a los niveles elevados de CV_G obtenidos, las especificaciones de calidad deseables derivadas para B y ET son superiores a las publicadas para los lípidos y lipoproteínas séricas¹⁹. Para la implantación del tratamiento de las dislipemias se utilizan valores discriminantes fijos por lo que el

empleo de estos ET podría conllevar una deficitaria aplicación del mismo. Por lo tanto, para el B y el ET, son necesarias unas metas analíticas más estrictas, como las recomendadas por la NCEP¹¹. En conclusión, hemos obtenido los datos de VB para las magnitudes habituales del perfil lipídico, tanto en individuos sanos como en pacientes con ERCT. Los lípidos y lipoproteínas séricas presentan una fuerte individualidad, lo que pone de manifiesto la escasa utilidad de los valores de referencia poblacionales, recomendándose su comparación con resultados previos del propio paciente a través del VRC. No se han encontrado diferencias significativas en los datos de VB generados para los individuos sanos y para los pacientes con ERCT, por lo que el empleo de los VRC derivados de individuos sanos es adecuado para la identificación y control de las dislipemias en este grupo de pacientes. A este respecto, el uso de los VRC asimétricos permitiría evaluar de una forma más exacta la respuesta al tratamiento hipolipemiante en los individuos dislipémicos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Banegas JR. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España: importancia de la dislipemia. *Nefrología Sup Ext.* 2013;4:4-8.
2. Villar AF, Banegas JR, Donado J, Rodríguez AF. Las enfermedades y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Madrid: Informa SEA [citado 2 Abr 2014]. Disponible en: http://www.searteriosclerosis.org/resources/archivosbd/clinica_investigacion/4d34a5f3ab9cb226e076bb3b11abf587.pdf
3. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares 2013 [citado 4 Abril 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
4. Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P. The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutrition.* 2003;7:245-50.
5. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation.* 1999;100:1281-92.
6. Mills EJ, Rachlis B, Wu P, Devereaux PJ, Arora P, Perri D. Primary prevention of cardiovascular mortality and events with statin treatments: a network meta-analysis involving more than 65,000 patients. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1769-81.
7. Briel M, Nordmann AJ, Bucher HC. Statin therapy for pre-vention and treatment of acute and chronic cardiovascular disease: update on recent trials and metaanalyses. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:601-5.
8. Guallar-Castillón P, Gil-Montero M, León-Muñoz LM, Graciani A, Bayán-Bravo A, Taboada JM, et al. Magnitude and management of hypercholesterolemia in the adult population of Spain, 2008-2010: The ENRICA study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2012;65:551-8.
9. Catapano AL, Reiner Z, de Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis.* 2011;217:3-46.

10. Perk J, de Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Atherosclerosis*. 2012;223:1–68.
11. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on the Detection, Evaluation and Treatment of High Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel, III). *JAMA*. 2001;285:2486–97.
12. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO), CKD., Work, Group., KDIGO., 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney, disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3:1–150.
13. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1989;27:409–37.
14. Fraser CG. *Biological variation: from principles to practice*. Washington DC: AACC Press; 2001.
15. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem*. 1999;45:321–3.
16. Ricos C, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Iglesias N., Jimenez CV, et al. The reference change value a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scan J Clin Lab Invest*. 2004;64:175–84.
17. Ricos C, Iglesias N, Garcia-Lario JV, Simón M, Cava F, Hernández A, et al. Within-subjects biological variation in disease: collates data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem*. 2007;44:343–52.
18. Biosca C, Ricos C, Lauzurica R, Galimany R, Hyltoft Petersen P. Reference change value concept combining two delta values to predict crises in renal posttransplantation. *Clin Chem*. 2001;47:2146–8.
19. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, et al. Current databases on biological variation: promes and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59:491–500.
20. Miller EG. Asymptotic test statistics for coefficient of variation. *Comm Stat Theory & Methods*. 1991;20:3351–63.
21. Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, Moecks J. Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. *Clin Chem*. 2006;52:1602–3.
22. Levey AS, Betó JA, Coronado BE, Eknoyan G, Foley RN, Kasiske BL, et al. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn, Where do we go from here? *Am J Kidney Dis*. 1998;32:853–906.
23. Attman PO, Alaupovic P. Lipid and apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia-Relation to renal function and dialysis. *Nephron*. 1991;57:401–10.
24. Kaizu Y, Ohkawa S, Odamaki M. Association between inflammatory mediators and muscle mass in long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2003;42:286–94.
25. Valcárcel G, García MT, Cruz E, Gacimartín MV, Venta R, García C. Límites de decisión para el uso combinado del cLDL calculado y su determinación directa. *Química Clínica*. 2005;24:366–9.
26. Roraas T, Petersen P, Sandberg S. Confident intervals and power calculations for within-person biological variation: effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clin Chem*. 2012;58:1306–13.



Biological variation of cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease and in healthy individuals

Zoraida Corte¹, Camino García² and Rafael Venta^{1,3}

Abstract

Background: Serum cardiac troponin T concentrations are important predictors of cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease. In patients with end-stage renal disease, assessment of serial results is essential to distinguish between a cardiovascular event and chronic elevation. We employed a high-sensitivity serum cardiac troponin T assay to evaluate the long-term biological variation in end-stage renal disease patients and in healthy individuals; these biological variation data were used to define the reference change value and the analytical goals.

Methods: Serum samples were collected from 18 end-stage renal disease patients in steady-state conditions, one per month for 6 months, and from 11 healthy volunteers at weekly intervals over 5 weeks. Biological variation data were derived using analysis of variance.

Results: Baseline serum cardiac troponin T concentrations in end-stage renal disease patients were above the 99th percentile of the healthy population and increased with duration of haemodialysis. For end-stage renal disease patients, within-subject (CV_I) and between-subject (CV_G) coefficients of variation were 14.7 and 77.8%, respectively, whereas these were 5.9 and 30.4%, respectively, for healthy individuals. The derived two-tailed and one-tailed reference change values were 44.1 and 37.1%, respectively, for end-stage renal disease patients, and 21.6 and 18.2% for healthy subjects.

Conclusions: For appropriate clinical management of end-stage renal disease patients in the context of a cardiovascular event, regular monitoring of serum cardiac troponin T concentrations could be important in order to allow future comparison through reference change value. Biological variation data in end-stage renal disease patients were significantly higher than for healthy individuals; therefore, the use of proper reference change value data is recommended. Moreover, the observed CV_I values provide demanding imprecision goals for current technology.

Keywords

Analytical quality specifications, biological variation, cardiovascular disease, chronic renal disease, high-sensitivity cardiac troponin T

Accepted: 2nd July 2014

Introduction

Cardiovascular complications are the most important cause of morbidity and mortality in patients with end-stage renal disease (ESRD).^{1,2} The reported mortality rate is 10 times higher in ESRD patients undergoing chronic haemodialysis (HD) therapy than in the general population.³ Therefore, the diagnosis and risk

¹Service of Biochemistry, Hospital San Agustín, Avilés, Principado de Asturias, Spain

²Service of Nephrology, Hospital San Agustín, Avilés, Principado de Asturias, Spain

³Department of Biochemistry and Molecular Biology. University of Oviedo, Principado de Asturias, Spain

Corresponding author:

Rafael Venta, Service of Biochemistry, Hospital San Agustín, Camino de Heros 6, 33401 Avilés, Principado de Asturias, Spain.
Email: rafael.venta@sespa.princast.es

stratification of cardiovascular events are key issues in the clinical management of these patients. More than 10 years ago, elevations of serum cardiac troponin (S-cTn) concentrations were reported in ESRD patients,^{4,5} although some of these increases occurred without evidence of cardiac damage or clinical symptoms,^{6,7} and no correlations were observed with serum creatinine concentrations.⁸ Nevertheless, high S-cTn concentrations have their own clinical relevance, since they have been proven to be important predictors of long-term, cardiovascular and all-cause mortality in ESRD patients.^{9,10}

According to a recent update of the universal definition of acute myocardial infarction (AMI),¹¹ the diagnosis of AMI requires the detection of an increase in cardiac biomarkers, preferably cardiac troponin I (S-cTnI) or T (S-cTnT), with at least one concentration above the 99th percentile limit of a healthy population, along with clinical or electrocardiographic findings of acute myocardial ischaemia. This discriminatory limit has to be measured with less than 10% imprecision.^{11,12} The new high-sensitivity (hs) serum troponin assays (hs-S-cTnI and hs-S-cTnT) are able to quantify concentrations of S-cTn in the low ng/L range and have allowed the concentrations for the 99th percentile cut-off to be established with optimal imprecision.^{13,14}

However, this higher sensitivity has been associated with an increase in the number of abnormal S-cTn concentrations observed in various chronic conditions with cardiac involvement, such as ESRD, which continues to hinder the diagnosis of AMI in these patients. Guidelines endorsed by the National Academy of Clinical Chemistry, the American College of Cardiology, the European Society of Cardiology and the American Heart Association have addressed this issue¹⁵ and, for patients with chronically elevated S-cTn concentrations, a 20% change from the baseline concentration 6–9 h after the onset of clinical symptoms has been recommended as indicative of AMI. This limit was based on three times the analytical imprecision described for most S-cTn assays in the concentration range observed in AMI and not on the biological variation (BV) of the cTn.

BV has been defined as the inherent random variation in analyte concentration due to the physiological balance between metabolic turnover and homeostatic regulation. Two components, termed within-subject BV, which is described as the average random fluctuation around a homeostatic set-point, and between-subject BV, defined as the difference between the set-points of individuals, have been distinguished.^{16,17} In mathematical terms, these data are expressed as coefficients of variation (CV): CV_I and CV_G, respectively. Quantitative BV data have been used for several purposes, including assessing the utility

of population-based reference intervals through the index of individuality (II)¹⁸ and calculating the reference change value (RCV) required for assessment of the significance of changes in serial results from an individual.¹⁹ Likewise, it has been suggested that desirable analytical quality specifications are best based on BV components.²⁰

It is common practice to use RCV estimated from healthy individuals in monitoring the clinical course of patients in order to discriminate significant changes in serial analytical results. However, underlying pathology may alter both the analyte homeostatic set-point and the variation around that set-point; therefore, the use of RCV derived from healthy individuals may not be suitable for monitoring patients with chronic advanced disease. Accordingly, an increasing number of studies of BV for biochemical markers in different pathological conditions have been published.²¹ Of note is the fact that despite the potential advantages of the use of RCV in the evaluation of S-cTn changes, the assessment of BV in healthy individuals has not been possible until the development of the hs assays. Recently, several studies have been published on the BV for these markers in healthy individuals^{22–25} and in patients with stable coronary artery disease;²⁶ however, no specifically designed studies on BV have been reported for ESRD patients.

In the present study, we used a new hs-S-cTnT assay to obtain BV data in both ESRD patients and healthy individuals in long-term steady-state conditions. These data have been used to assess the II, the RCV and to define analytical quality specifications for imprecision (I), bias (B) and total error (TE).

Material and methods

Subjects

To estimate S-cTnT BV data in ESRD, a cohort of 20 patients undergoing chronic conventional HD three times a week at the Service of Nephrology of San Agustín Hospital (Avilés, Asturias, Spain) was selected. The study inclusion criteria were: age <75 years old, no history of cardiovascular events, no hospital admissions during the study period or in the previous 3 months, no significant variations in biochemical monitoring during the same periods and stable dry weights throughout the scheduled HD programme. During the follow-up period, two patients were hospitalized due to pneumonia and unexplained fever; therefore, they were removed from the study, leaving 18 subjects (11 females and seven males; age range, 31–75 years).

For comparison, samples from 11 apparently healthy volunteers (eight females and three males; age

range, 21–50 years), recruited for a previous BV study, were used for the estimation of S-cTnT BV data in healthy individuals. None of the subjects had a history of cardiovascular disease, renal disease or any other condition known to affect troponin concentrations.

The study was approved by the institutional review board and the design and execution of the experiment were explained thoroughly to the participants, and informed consent was obtained.

Specimen collection

All samples were collected in plain tubes (Vacuette, Greiner Bio-one, Madrid, Spain) by conventional venepuncture after an overnight fast, with subjects in a sitting position and avoiding venous stasis. Samples from ESRD patients were collected once a month, before the HD treatment. An average of five samples per patient was obtained during a study period of 6 months. Specimens from each healthy volunteer were obtained once a week for 5 weeks at the same time of day (8:30–10:00), under standardized conditions to minimize sources of preanalytical variation. All serum specimens from both healthy individuals and patients were allowed to clot for 30 min at room temperature, centrifuged at 3500 g for 10 min, aliquoted and stored at -80°C for a maximum of 11 months before analysis; this temperature has been shown to maintain S-cTnT in a stable state for up to 12 months.²⁷

Analytical methods

Measurements of S-cTnT concentrations were performed with the ECLIA Short Turn Around Time hs-S-cTnT assay in a Cobas e411 analytical system (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's specifications. The limit of blank (LoB) and the limit of detection were determined as 3 and 5 ng/L, respectively, and the 99th percentile concentration for healthy individuals was 14 ng/L.¹³ Routine internal quality controls at two concentrations (26 and 1920 ng/L) were processed to assess method performance. The assay was also evaluated on a regular basis through participation in a national external quality assessment scheme.

Before analysis, all samples were thawed at room temperature and mixed to ensure homogeneity. To remove interbatch analytical variation, all samples from the same group, whether healthy individuals or ESRD patients, were assayed in the same batch. To calculate intrabatch analytical variation, the first sample collected from each subject was analysed in duplicate (thus intrabatch analytical variation has been calculated in the subject's samples matrix). Single lots of reagents and calibrators were employed,

and the whole procedure was performed by a single analyst to minimize the analytical variation.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out with SPSS software (15.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL). The Levene test was used to confirm the homogeneity of variances. Normal distribution was assessed in both the overall data-set and each individual data-set by the Shapiro–Wilk test and by verification of the straightness of a normal plot; S-cTnT concentrations in both healthy subjects and ESRD patients showed a non-Gaussian distribution. Kruskal–Wallis and Mann–Whitney test were used for median comparisons, as appropriate, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Logarithmic transformations were performed before applying the Cochran test to exclude outlying values from the individual subjects (within-subjects data) and the Reed test to eliminate mean outlying values (between-subjects data).

Overall, the S-cTnT concentrations were not normally distributed, while individual data-sets from each subject showed normal distribution. In these situations, Fraser and Harris¹⁶ have discouraged the use of logarithmic transformations of data to calculate BV components.

Analytical variance (SD_A^2) was calculated from the differences between the duplicates according to the formula: $SD_A^2 = \Sigma d^2 / 2N$, where d is the difference between duplicates and N is the number of duplicates. The SD_A^2 is expressed as relative SD_A to the mean of duplicates (CV_A). One-way analysis of variance was applied to divide the total variance into between-subjects (SD_G^2) variance and total within-subjects variance (SD_{TI}^2). Since SD_{TI}^2 includes both biological and analytical components, the within-subjects variance (SD_I^2) was obtained by subtraction, using the formula: $SD_I^2 = SD_{TI}^2 - SD_A^2$. Within- and between-subjects BV was expressed as CV by the use of the homeostatic mean of each individual (CV_I) and the overall mean (CV_G), respectively. The 95% confidence intervals (95% CI) for CV were calculated according to the formula from Miller.²⁸

BV data for S-cTnT in both healthy individuals and ESRD patients were used to calculate the desirable analytical quality specifications as $I = 0.5CV_I$, $B = 0.25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$, $TE = 1.65(0.5CV_I) + 0.25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$ and II as $II = (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2} / CV_G$. RCV was calculated as the probability of a rise or a fall (one-tailed; Z-score = 1.65) and as the probability of a change (two-tailed; Z-score = 1.96) at $p < 0.05$ as $RCV = 2^{1/2} * Z(CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$. Because the global distribution of S-cTnT data was slightly skewed, RCVs were also evaluated with the lognormal

approach that was first described in equations formulated by Fokkema et al.,²⁹ who used the total intraindividual coefficient of variation (CV_{TI}) of non-log-transformed data to estimate the σ parameter of the lognormal distribution. The asymmetrical limits for the upward value for the lognormal RCV (RCV_{pos}) and for the downward value (RCV_{neg}) were determined as follows: $RCV_{pos} = [\exp(Z \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$, and $RCV_{neg} = [\exp(-Z \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$.

Results

The distribution of S-cTnT results for long-term BV in ESRD patients and healthy individuals is shown in Figure 1. Four ESRD patients showed median S-cTnT concentrations significantly higher ($p < 0.05$). None of these patients had a medical history of hypertension, arteriosclerosis or echocardiographic findings, and no large differences in body mass index, mean concentration of serum C reactive protein, medication or in the aetiology of ESRD were found. Two of them had

higher mean concentrations of serum triglycerides (45%), cholesterol (30%) or low density lipoprotein cholesterol (30%) than the other patients during the follow-up period. Observed cTnT concentrations were above the assay LoB, except for one sample from a healthy subject, which was identified as an outlier and removed from the study. All data from healthy individuals were below the 99th percentile limit of 14 ng/L, while the 98% cTnT concentrations from ESRD patients were above this clinical decision-making point.

Table 1 presents S-cTnT BV components (CV_I , CV_G) for healthy individuals and ESRD patients, as well as the II, the RCVs and the desirable quality specifications derived from these BV data. Also shown are the S-cTnT median and range, the intrabatch analytical imprecision and the number of data available after the exclusion of outliers. Less than 2% of data were excluded and exclusions were distributed evenly between groups and subjects. As can also be seen in Figure 1, the subjects showed mild changes in the S-cTnT concentrations and the median (interquartile

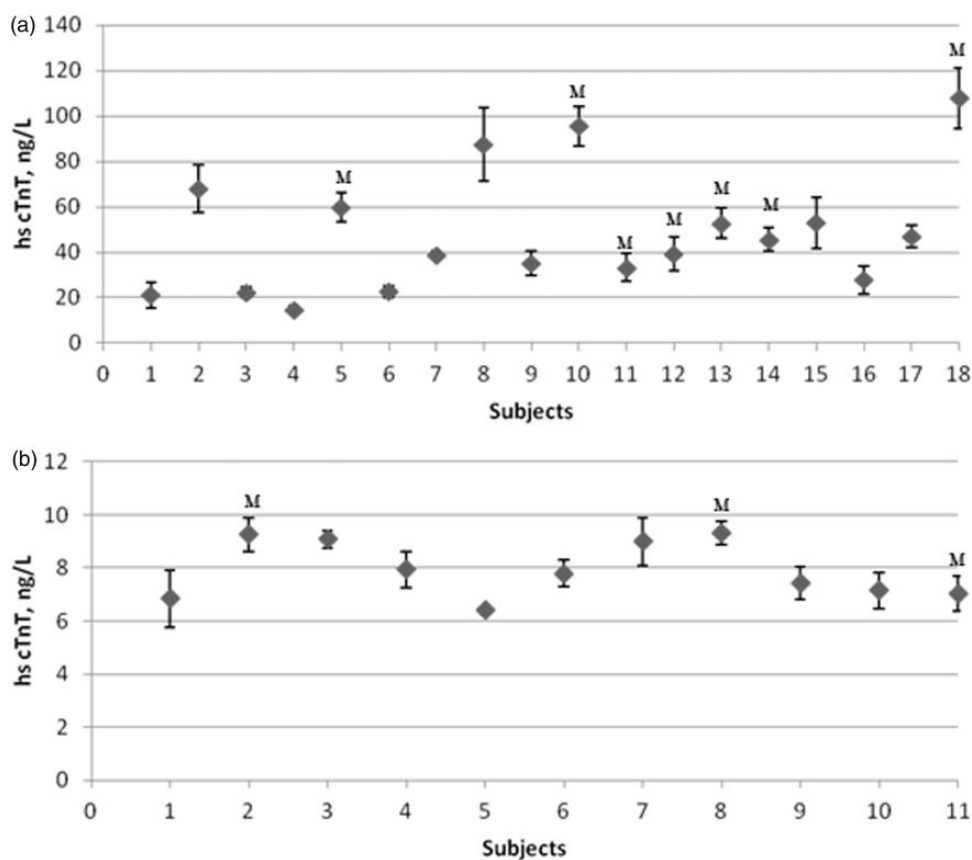


Figure 1. Serum cardiac troponin T (S-cTnT) concentrations. Data are presented as median concentrations. (a) Biological variation results for ESRD patients in 18 subjects over a 6-month period. (b) Biological variation results for healthy individuals in 11 subjects over a 5-week period.

M: Male.

range (IQR)) for the range of concentrations measured within each subject was 1.5 ng/L (0.6) in healthy individuals and 13.2 ng/L (11.5) in ESRD patients.

The estimated CV_{TI} was 8.1 and 16.2%, and CV_A was 5.1% (duplicate median S-cTnT = 8.3 ng/L) and 6.0% (duplicate median S-cTnT = 43.6 ng/L) for healthy individuals and ESRD patients, respectively. Median S-cTnT concentrations observed in ESRD patients (43.2 ng/L) were significantly higher than those in healthy individuals (7.8 ng/L), like the within- and between-subject BV, according to the 95% CI. Due to the differences in CV_I data, the estimated RCVs for ESRD patients were more than twice those calculated for healthy individuals. As expected, the upward and downward RCVs calculated from the lognormal approach were consistent with the RCV obtained from the standard approach for both healthy individuals and ESRD patients.

To assess the potential effect of the duration of HD treatment on the S-cTnT concentrations or the BV

data, two groups were established within the ESRD patients: group 1 (<1 year; eight females, one male; age range 31–75 years), group 2 (>1 year; three females, six males; HD time range 1–4 years; age range 34–75 years). As presented in Table 2, the median (IQR) S-cTnT concentrations found in the two established ESRD groups and the median (IQR) for the range of concentrations measured within each subject were 35.6 ng/L (22.1) and 6.4 ng/L (7.4) for group 1 (<1 year on HD treatment), and 47.6 ng/L (23.1) and 18.3 ng/L (5.3) for group 2 (>1 year on HD treatment), respectively. Comparison of the medians of the two groups showed a statistically significant increase in the S-cTnT concentration with duration of HD treatment ($p < 0.05$). Otherwise, no effect was observed on the BV data.

Discussion

The presence of high baseline cTn concentrations in ESRD patients without signs of myocardial ischaemia has been widely documented and is associated with an increase in morbidity and mortality.^{9,10} The development of hs-S-cTn assays has made possible the detection of mild increases of cTn concentration in patients with other chronic conditions, as well as in the general population,^{22–26} allowing subjects with either silent, or clinically underestimated, cardiac disease to be identified. Paradoxically, this increase in analytical sensitivity has raised concerns about interpretation and clinical relevance in the clinical setting.³⁰

The increasing interest in the usefulness of BV data for the management of patients has encouraged studies in specific pathologies: for instance, in renal transplant patients to detect acute rejection³¹; in congestive heart failure for therapeutic monitoring^{32,33} or in stable coronary artery disease.²⁶ Despite the need to assess serial observations of S-cTnT to recognize an acute cardiac event in ESRD patients, no specifically designed studies on BV have previously been reported. In this study, we have generated BV data for S-cTnT in ESRD patients and compared these with data obtained in healthy individuals, employing an hs-S-cTnT assay which provides the required imprecision.

Some limitations of the study design should be considered when assessing the results shown. The control group was younger than the ESRD group; therefore, direct comparison of BV data must be performed with caution. There are differences in the number of subjects included and in follow-up periods between healthy and ESRD subjects; however, it has been reported that the estimates of BV are usually similar, irrespective of the time scale of the study and the number of subjects included.^{16,17,34} Likewise, the influence of differences in

Table 1. Biological variation data and derived parameters for serum cardiac troponin T in healthy individuals and ESRD patients.

	Healthy Individuals	ESRD Patients
N	53	94
Median (IQR) (ng/L)*	7.8 (2.0)	43.2 (33.5)
Range (ng/L)	4.6–10.2	11.6–123.3
CV_A (%)	5.1	6.0
CV_I (95% CI) (%)	5.9 (4.8–7.0)	14.7 (12.6–16.9)
CV_G (95% CI) (%)	30.4 (24.0–36.7)	77.8 (61.2–94.4)
II	0.20	0.20
Two-tailed RCV (%)	21.6	44.1
$^{1.96}RCV_{pos}$ (%)	35.5	76.6
$^{1.96}RCV_{neg}$ (%)	–26.2	–43.4
One-tailed RCV (%)	18.2	37.1
$^{1.65}RCV_{pos}$ (%)	29.1	61.4
$^{1.65}RCV_{neg}$ (%)	–22.5	–38.1
I (%)	3.0	–
B (%)	7.7	–
TE (%)	12.6	–

Bⁿ: derived desirable analytical quality specifications for bias; CV_A : intra-batch analytical imprecision; CV_G : between-subjects coefficient of variation; CV_I : within-subjects coefficient of variation; ESRD: end-stage renal disease; II: index of individuality; I^m: derived desirable analytical quality specifications for imprecision; IQR: interquartile range; N: number of data available after the exclusion of outliers; 95% CI: 95% confidence interval; One-tailed RCVs: uni-directional reference change value ($Z = 1.65$, 95% confidence); RCV_{neg} : downward (negative) lognormal RCV; RCV_{pos} : upward (positive) lognormal RCV; TE: derived desirable analytical quality specifications for total error; Two-tailed RCVs: bi-directional reference change value ($Z = 1.96$, 95% confidence).

*Statistically significant differences at $p < 0.05$ by Mann–Whitney test.

Table 2. Effect of the time undergoing haemodialysis in serum cardiac troponin T concentrations and biological variation data.

	Group 1 ^a (<1 year)	Group 2 ^a (>1 year)
Number of subjects	9	9
N	49	45
Median (IQR) (ng/L)*	35.6 (22.1)	47.6 (23.1)
Range (ng/L)	11.6–101.7	24.0–123.3
CV _I (95% CI) (%)	16.4 (13.1–19.8)	13.1 (10.3–15.9)
CV _G (95% CI) (%)	89.4 (60.6–118.2)	60.7 (44.0–77.4)

^aGroups established according to the time undergoing haemodialysis: <1 year and >1 year.

CV_G: between-subjects coefficient of variation; CV_I: within-subjects coefficient of variation; IQR: interquartile range; N: number of data available after the exclusion of outliers; 95% CI: 95% confidence interval.

*Statistically significant differences at $p < 0.05$ by Mann–Whitney test.

the duration of observation could be minor according to the steady-state conditions in both groups. On the other hand, our data reflect only the pre-HD-situation; therefore, further studies may be needed to evaluate the acute effect of ultrafiltration or that of peritoneal dialysis on S-cTnT concentration and BV data.

S-cTnT exhibited a low CV_I value (14.7%) relative to the CV_G (77.8%) in ESRD patients, which might suggest a limited turnover of cardiac myocytes in the presence of larger differences in the rates of cell turnover or renal clearance among patients. This CV_I value agrees with that reported by Jacobs et al.¹⁴ (CV_I=13%) in a 6-month follow-up study of 15 ESRD patients without cardiovascular complications. Interestingly, the CV_I value in our ESRD patients was twice that obtained in healthy individuals (CV_I=5.9%), indicating that chronic renal disease modifies the variation of S-cTnT around the homeostatic set-point, as has been reported for some organ-specific markers such as creatinine in renal post-transplantation.³¹ BV data generated for healthy individuals differ considerably from the hs-S-cTnT data previously published by Vasile et al.,²² who reported CV_I and CV_G values of 94% in an 8-week follow-up study on 19 healthy volunteers, and, to a lesser extent, from a recent study by Frankenstein et al.,²³ which assessed the hs-S-cTnT BV data in 15 subjects during a 4-week follow-up, showing CV_I values of 30%. Despite differences in the kinetics of release and clearance between S-cTnT and S-cTnI,³⁵ our data bear more resemblance to those reported for hs-S-cTnI by Wu et al.,²⁴ who studied 17 healthy subjects for 8 weeks (CV_I=14%; CV_G=63%), and those of Vasile et al.,²⁵ in 19 healthy subjects for the same period (CV_I=2.6%; CV_G=41.6%). Potential reasons for observed discrepancies in hs-S-cTnT BV data include

differences in subject selection and the statistical treatment of data. For instance, the number of serum concentrations reported in some studies close to or below the LoB of the assays might affect the accurate estimation of BV data, since measurements in the very low range of detection are always associated with increased imprecision. Thus, Browning et al.³⁶ advise against the estimation of BV data from an analyte if the available assays do not fulfil the minimum analytical requirements that ensure the analytical component is <20% of the total variance found. That strong influence was also shown in the study by Roraas et al.³⁴

Overall, 98% of the ESRD patients showed S-cTnT concentrations above the 99th percentile of the healthy population and a significant increase in these concentrations with the duration of HD treatment was observed. This is in agreement with the data published by Willging et al.,³⁷ who noted that longer duration of HD treatment was associated with higher S-cTnT concentrations. On the contrary, BV data do not seem to be affected by the duration of HD treatment in our patients. The mechanism of serum S-cTnT elevation in asymptomatic ESRD patients is not clearly established, but it has been considered to reflect the onset or aggravation of a coronary artery disease, congestive heart failure, left ventricular hypertrophy or microinfarctions.^{10,38,39} Therefore, it would be useful to consider S-cTnT as a biomarker in the primary prevention of cardiovascular disease in those ESRD patients with a longer time in HD as they appear to be at higher risk. Moreover, measurements of S-cTnT concentration in periods of clinical stability could become an essential requirement in order to establish baseline concentrations that will allow future comparison through the RCV and, therefore, an appropriate clinical management of these patients.

The low II values obtained in both ESRD patients and healthy subjects (<0.6) show that S-cTnT has marked individuality.¹⁸ This confirms the limited value of population-based reference intervals or defined cut-off decision-making limits in the diagnosis of AMI and supports the notion that serial testing is the key approach for an appropriate clinical interpretation of S-cTnT changes in both populations.

The long-term RCV calculated here for healthy individuals may support the percentage of increase (20%) recommended as evidence of AMI in recurrent infarction¹¹ or in subjects with chronically elevated S-cTnT concentrations,¹⁵ which is based on the common analytical imprecision, although higher changes would be required (29.1 or 35.5% for one- or two-tailed RCV_{pos}, respectively) if skewed distributions of the S-cTnT concentrations were considered. However, RCVs obtained for ESRD patients were twice the recommended percentage, which means that attributing clinical

significance to 20% change may be associated with a larger number of false positive cases. On the other hand, the potential increase in false negatives with the higher RCV obtained in these high-risk patients for acute coronary syndrome could be attenuated by the shorter time of hs-S-cTnT reanalysis, indicated at 3–6 h after the onset of symptoms.¹¹ It should be noted that RCVs derived from healthy individuals play a role in identifying myocardial damage in the early stages of chronic kidney disease as there is usually a progressive transition from the non-diseased to diseased states. Nevertheless, for ESRD patients the use of the RCV derived from advanced disease-specific BV data seems to be more appropriate, in particular the more stringent one-tailed RCVs, since a significant increase is the only change to be considered.⁴⁰

Finally, the European consensus established that the best quality specifications in laboratory medicine are those based on BV.²⁰ As a consequence of the low CV_I value observed for S-cTnT in healthy individuals, the derived desirable analytical goals for I, B and TE are quite stringent. Nevertheless, the minimum goal for imprecision (0.75CV_I) is usually achieved in our laboratory.

In summary, BV data for S-cTnT have been generated by the use of the new hs assay, observing a relatively low CV_I in relation to the CV_G in both healthy individuals and ESRD patients. Due to their likely different homeostatic regulation, BV data for ESRD patients were significantly higher than those for healthy individuals; therefore, the use of appropriate RCV data is recommended for the evaluation of changes in serum S-cTnT. For appropriate clinical management of these patients in relation to the development of cardiovascular events, the regular monitoring of the S-cTnT concentrations could be important in order to allow future comparison through the RCV.

Declaration of conflicting interest

None declared.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Ethical approval

The study was approved by the institutional review board (27012010).

Guarantor

RV.

Contributorship

RV conceived the study. All authors were involved in protocol development, institutional review board approval and patient recruitment. RV and ZC performed the data analysis. ZC wrote the first draft of the manuscript. All authors reviewed and edited the manuscript and approved the final version of the manuscript.

References

1. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. US Renal Data System, USRDS 2007 annual data report: Atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States. Bethesda, MD, 2007, pp.138–154.
2. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. US Renal Data System, USRDS 2007 annual data report: Atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States. Bethesda, MD, 2007, pp.192–208.
3. Sarnak MJ and Levey AS. Cardiovascular disease and chronic renal disease: A new paradigm. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: S117–S131.
4. Hafner G, Thome-Kromer B, Schaube J, et al. Cardiac troponins in serum in chronic renal failure. *Clin Chem* 1994; 40: 1790–1791.
5. Wayand D, Baum H, Schatzle G, et al. Cardiac troponin T and I in end-stage renal failure. *Clin Chem* 2000; 46: 1345–1350.
6. Kanderian AS and Francis GS. Cardiac troponins and chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006; 69: 1112–1114.
7. Lamb EJ, Webb MC and Abbas NA. The significance of serum troponin T in patients with kidney disease: A review of the literature. *Ann Clin Biochem* 2004; 41: 1–9.
8. Baum H, Obst M, Huber U, et al. Cardiac troponin T in patients with high creatinine concentration but normal creatinine kinase activity in serum. *Clin Chem* 1996; 42: 474–475.
9. Khan NA, Hemmelgarn BR, Tonelli M, et al. Prognosis value of troponin T and I among asymptomatic patients with end-stage renal disease: A meta-analysis. *Circulation* 2005; 112: 3088–3096.
10. Mallamaci F, Zoccali C, Polongo S, et al. Troponin is related to left ventricular mass and predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 68–75.
11. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. On behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J* 2012; 33: 2551–2567.
12. Apple FS, Jesse RL, Newby LK, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: Analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007; 53: 547–551.
13. Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, et al. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 2010; 56: 254–261.

14. Jacobs LH, Kerkhof J, Mingels AM, et al. Haemodialysis patients longitudinally assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and cardiac troponin I assays. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 283–290.
15. Wu AH, Jaffe AS, Apple FS, et al.; NACB Committee, Cannon CP, Storrow AB. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Use of cardiac troponin and B-type natriuretic peptide or N-terminal proB-type natriuretic peptide for etiologies other than acute coronary syndromes and heart failure. *Clin Chem* 2007; 53: 2086–2096.
16. Fraser CG and Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 409–437.
17. Fraser CG. *Biological variation: From principles to practice*. Washington DC: AACC Press, 2001.
18. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 758–764.
19. Ricos C, Cava F, García-Lario JV, et al. The reference change value a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scan J Clin Lab Invest* 2004; 64: 175–184.
20. Fraser CG and Petersen PH. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem* 1999; 45: 321–323.
21. Ricos C, Iglesias N, García-Lario JV, et al. Within-subjects biological variation in disease: Collates data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 343–352.
22. Vasile CV, Saenger KA, Kroninig MJ, et al. Biological and analytical variability of a novel high-sensitive cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 2010; 56: 1086–1090.
23. Frankenstein L, Wu AHB, Hallermayer K, et al. Biological variation and reference change value of high-sensitivity troponin T in healthy individuals during short and intermediate follow-up periods. *Clin Chem* 2011; 57: 1068–1071.
24. Wu HBA, Lu AQ, Todd J, et al. Short- and long-term biological variation in cardiac troponin I measured with a high-sensitivity assay: Implications for clinical practice. *Clin Chem* 2009; 55: 152–158.
25. Vasile CV, Saenger KA, Kroninig MJ, et al. Biological variation of a novel cardiac troponin I assay. *Clin Chem* 2011; 57: 1080–1081.
26. Nordenskjöld AM, Ahlström H, Eggers KM, et al. Short- and long-term individual variation in cardiac troponin in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chem* 2013; 59: 401–409.
27. Basit M, Bakshi N, Hashem M, et al. The effect of freezing and long-term storage on the stability of cardiac troponin T. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 164–167.
28. Miller EG. Asymptotic test statistics for coefficient of variation. *Comm Stat Theory Methods* 1991; 20: 3351–3363.
29. Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, et al. Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. *Clin Chem* 2006; 52: 1602–1603.
30. Jaffe AS. Chasing troponin: How low can you go if you can see the rise? *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1763–1764.
31. Biosca C, Ricos C, Lauzurica R, et al. Biological variation at long-term renal post-transplantation. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 188–191.
32. Wu AHB, Smith ABS, Wiecek S, et al. N-terminal Pro and B-type natriuretic peptides implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2003; 92: 628–631.
33. Frankenstein L, Remppis A, Giannitis E, et al. Biological variation of high sensitive troponin T in stable heart failure patients with ischemic or dilated cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* 2011; 100: 633–640.
34. Roraas T, Petersen P and Sandverg S. Confident intervals and power calculations for within-person biological variation: Effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clin Chem* 2012; 58: 1306–1313.
35. Wu HBA, Feng YJ, Moore R, et al. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem* 1998; 44: 1198–1208.
36. Browning MCK, Ford RP, Callaghan SJ, et al. Intra- and interindividual biological variation of five analytes used in assessing thyroid function: implications for necessary standards of performance and the interpretation of results. *Clin Chem* 1986; 32: 962–966.
37. Willings S, Keller F and Steinbach G. Specificity of cardiac troponin I and T in renal disease. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 87–92.
38. Iliou MC, Fumeron C, Benoit MO, et al. Factors associated with increased serum levels of cardiac troponins T and I in chronic haemodialysis patients: Chronic haemodialysis and New Cardiac Markers Evaluation (CHANCE) study. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 40: 2065–2071.
39. Antman EM. Decision making with cardiac troponin test. *N Engl J Med* 2002; 346: 2079–2082.
40. Fraser CG. Improved monitoring of differences in serial laboratory results. *Clin Chem* 2011; 57: 1635–1637.