

11244

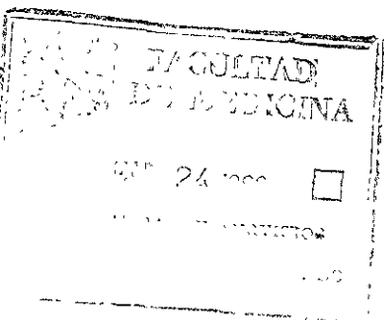
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
División de Estudios de Postgrado
Instituto Mexicano del Seguro Social
Hospital de Especialidades
Centro Médico "La Raza"

7
2^{ej.}

**PARTICIPACION DE LOS RADICALES TOXICOS
DE OXIGENO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGIA
PRESENTA:

MA. AZUCENA RAMOS SANCHEZ.



28 de Febrero de 1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PARTICIPACION DE LOS RADICALES TOXICOS DE
OXIGENO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE**

No. 976900076



Dr. Arturo Robles Páramo.
Jefe de la División de Educación e Investigación Médica.
Hospital de Especialidades. Centro Médico "La Raza".

Dr. Juan Manuel Miranda Limón.
Titular del curso universitario de Reumatología.
Hospital de Especialidades. Centro Médico "La Raza".

Dra. Ma. Azucena Ramos Sánchez.
Residente de Reumatología.
Hospital de Especialidades. Centro Médico "La Raza".

*La fe, es tener la certeza de que existe un océano
Porque he visto un arroyo.*

RESUMEN

Participación de los radicales tóxicos de oxígeno en la artritis reumatoide.

Objetivo: Evaluar el efecto de los antioxidantes (vitamina E y C) sobre la producción de los radicales libres de oxígeno en suero y líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide.

Material y Métodos: Se estudiaron pacientes con artritis reumatoide mayores de 18 años con flogosis en una rodilla, tratamiento esteroideo o inductor de remisión y manifestaciones de actividad de la enfermedad. Se dividieron en dos grupos, el grupo I fue tratado con diclofenaco 100 mg diarios más una combinación de vitamina E (200 mg/día) y vitamina C (500 mg/día), en tanto que el grupo II fue tratado únicamente con diclofenaco (100 mg/día) durante un mes, se hizo evaluación clínica y se tomaron muestras de sangre y de líquido sinovial antes de iniciar el tratamiento y a los treinta días. Se determinó capacidad antioxidante y productos de lipoperoxidación.

Resultados: Se incluyeron 10 pacientes femeninos, seis en el grupo I y 4 en el II. La edad, duración de la enfermedad, clase funcional y tratamiento previo fueron similares en ambos grupos. Hubo un incremento en la capacidad antioxidante en los dos grupos (39.8% para el grupo I vs 10.1% para el grupo II) con diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0.05$), lo mismo se observó en el líquido sinovial. La cuantificación de cromolípidos no correlacionó con el tratamiento.

Conclusiones: No encontramos cambios clínicos ni paraclínicos asociados a la administración de antioxidantes.

Palabras clave: Radicales libres de oxígeno. Antioxidantes, Artritis Reumatoide.

ABSTRACT

Role of oxygen radicals in Rheumatoid Arthritis.

Objective: The aim of this study was to assess the effects of antioxidants (ascorbic acid and vitamin E) on the production of oxygen free radicals in blood serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis (RA) patients.

Methods: We included patients with RA, 18 years old or older with inflammation of one knee, treatment with steroids or remission inductors and activity manifestations of the disease. We've divided them in two groups, the group 1 was treated with Diclofenac 100 mg everyday plus a combination of vitamin E (200 mg/day) and vitamin C (500 mg/day) while the group 2 was only treated with Diclofenac (100 mg/day) for a month. A clinical evaluation and a taking of blood serum and synovial fluid were done prior to start treatment and within 30 days, and we've determined the antioxidant capacity and products of lipoperoxidation.

Results: The study included 10 female patients, 6 in group 1 and 4 in group 2. The mean age, time of the disease, functional class and prior treatment were similar in both groups. There was an increase in antioxidant capacity of blood serum in both groups (39.8% for group 1 and 10.1% for group 2) without statistically significant difference ($p > 0.05$) and the same was observed in the synovial fluid. The amount of the cromolipides didn't correspond with the treatment.

Conclusions: We haven't found significant changes in clinical manifestations and laboratory tests with administration of antioxidants.

Key Words: Oxygen free radicals. Antioxidants. Rheumatoid arthritis.

INTRODUCCION

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica y multisistémica de etiología desconocida, que se caracteriza por inflamación sinovial persistente que afecta las articulaciones periféricas con distribución simétrica provocando destrucción del cartilago, erosiones óseas y deformidades articulares en fases avanzadas.¹ Su etiología es aún desconocida, sin embargo es posible que diferentes estímulos artritogénicos activen la respuesta inmune en el huésped genéticamente susceptible y se desarrolle autoinmunidad;^{2,3} se ha estudiado la participación del mimetismo molecular de diferentes agentes infecciosos, factores endócrinos, metabólicos, nutricionales y más recientemente el papel de los radicales libres de oxígeno como una vía final común de lesión tisular. Los radicales libres de oxígeno son especies químicas que poseen un electrón no apareado que lo hace inestable,⁴ y le da la propiedad química de ser altamente reactivo, combinándose con una diversidad de moléculas integrantes de la célula dando lugar a moléculas disfuncionales.⁵

Los radicales libres activan genes que codifican la síntesis de factores de transcripción y promueven el crecimiento de fibroblastos y células epiteliales;⁶⁻⁸ también se han involucrado en la reabsorción ósea inducida por interleucina-1, promotores de apoptosis y estimulan la síntesis de citocinas.^{9,10} El ácido hialurónico sinovial se encuentra fragmentado y despolimerizado, disminuyendo la viscosidad sinovial; y hay evidencias de que dicha fragmentación es promovida por los radicales libres de oxígeno.^{11,12}

Se conoce la participación de dichos radicales en la isquemia cerebral¹³ e isquemia miocárdica,¹⁵ por lo que existe la tendencia de evitar el estrés oxidativo utilizando los antioxidantes sintéticos conocidos.¹⁶ Además se ha determinado la capacidad antioxidante

del suero en condiciones naturales y después de la administración de antioxidantes,¹⁷ sin embargo, la utilidad de los antioxidantes en la AR no ha sido estudiada, por lo que con este trabajo evaluaremos el efecto antioxidante de la vitamina C y E sobre la producción de radicales libres de oxígeno y su traducción clínica.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron en forma prospectiva pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide según los criterios de la ACR 1987,¹³ que fueran mayores de 18 años de edad y que tuvieran las siguientes características: presencia de flogosis en una de las rodillas, haber recibido previamente tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos, haber iniciado tratamiento esteroideo oral o inductor de la remisión por lo menos tres meses antes del estudio sin modificación de la dosis durante el desarrollo del mismo y que tuvieran manifestaciones de actividad de la enfermedad según los criterios establecidos¹⁴ y que se define como, la presencia de por lo menos tres de los siguientes datos: a) Seis o más articulaciones dolorosas, b) tres o más articulaciones inflamadas, c) rigidez articular matutina de 45 minutos o más y d) velocidad de sedimentación globular de 25mm/hora o más. No se incluyeron pacientes con enfermedad articular inflamatoria diferente de la AR, infección sistémica o local de la articulación a evaluar, historia de hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos, embarazo o lactancia e infiltración con esteroides en la rodilla a evaluar en los tres meses previos.

Se excluyeron del estudio los pacientes que tuvieron falta de apego al protocolo, deseo de separarse del estudio y cambios en la dosis de esteroide o inductor de remisión durante el mismo.

Los pacientes seleccionados fueron incluidos en dos grupos. En el grupo I se inició tratamiento con diclofenaco 100mg al día más una combinación de vitamina E (200mg/día) y vitamina C (500mg/día), al grupo II se le administró sólo diclofenaco 100mg/día durante un mes.

Evaluación.

Se realizó una evaluación clínica basal y a los 30 días que incluyó cuenta del número de articulaciones dolorosas, número de articulaciones inflamadas, rigidez articular matutina (medida en horas), escala visual análoga de dolor, evaluación global por el paciente y evaluación global por el médico, éstas últimas en centímetros con escala del 1 al 10.

Se tomaron muestras de sangre y líquido sinovial antes del inicio del tratamiento y a los treinta días para cuantificar productos de lipoperoxidación y capacidad antioxidante.

Se tomaron 10cc de sangre y se dividió en dos tubos (5cc en cada uno), uno de ellos con antioxidante BHT (hidroxitolueno butilado 2.2 mg/ml) y el otro sin BHT; se separó el suero y se mantuvo en congelación hasta su procesamiento. Por espectrofotometría se cuantificaron cromolípidos en el primer tubo y por fluorometría se determinó la capacidad antioxidante en el segundo tubo.

Se obtuvieron 6cc de líquido sinovial y se dividió en dos tubos (3cc en cada uno) y se procesaron con la misma técnica que la muestra de sangre.

El análisis de los resultados se realizó con el paquete estadístico EPI 6 comparando los valores promedio de las diferentes variables clínicas y paraclínicas mediante Chi-cuadrada.

RESULTADOS

Se incluyeron diez pacientes, todos del sexo femenino que se distribuyeron en dos grupos, seis en el grupo I (diclofenac más antioxidantes) y 4 en el II (sólo diclofenac). La edad media para el grupo I fue de 42.6 años \pm 14.1 (rango: 20-55) y para el II de 45 años \pm 18.3 (rango: 25-70), con una duración media de la enfermedad de 10 años \pm 8.2 (rango: 2-22) y 11.4 años \pm 9.6 (rango: 2-25) respectivamente. La clase funcional (Steinbrocker)¹⁷ para el grupo I fue de 2.2 y de 2.6 para el grupo II. Todos los pacientes tenían tratamiento previo con prednisona y/o inductor de remisión en los 2 grupos (Tabla I), en el grupo I cuatro pacientes estaban siendo tratados con cloroquina, uno con azatioprina y dos con prednisona. En el grupo II 2 pacientes tenían cloroquina, 2 metrotexate, uno D-penicilamina y un prednisona. Dos de ellos tenían terapia combinada de inductores.

La diferencia promedio del cambio entre la evaluación clínica inicial y la final para el grupo I y II fue: para el número de articulaciones dolorosas -3 vs 0.2, número de articulaciones inflamadas 0.8 vs 0.2, rigidez articular matutina (en horas) -1.5 vs 0.8, escala visual del dolor -1 vs 0, escala global por el paciente -1.6 vs 0.4 y para la evaluación global por el médico 0.1 vs 0.8; a pesar de que hubo una tendencia a disminuir el número de articulaciones dolorosas en el grupo I, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre los grupos (Tabla II)

Hubo un incremento en la capacidad antioxidante del suero en los dos grupos, más importante en el grupo I (aumento promedio de 39.8% para el grupo I vs 10.1% para el grupo II) aunque la diferencia entre grupos no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). La misma tendencia se observó en la capacidad antioxidante de líquido sinovial con un aumento promedio de 26.8 vs 8.4% para los grupos I y II respectivamente (Gráficas 1 y 2).

El valor promedio de modificación antes y después del tratamiento en la cuantificación de cromolípidos en suero fue un aumento de 12.7 nmol/ml para el grupo I y en el grupo II se observó una disminución en 12 nmol/ml; sin encontrart diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p>0.05$).

En el líquido sinovial hubo un incremento promedio de 25 nmol/ml para el grupo I después del tratamiento y en el grupo II se presentó una disminución de 2.4 nmol/ml, sin diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p>0.05$) (Tabla III).

DISCUSION

La participación de los radicales libres de oxígeno en la patogenia de diversas enfermedades continúa en fase experimental. Existen claras evidencias de su participación en varias entidades clínicas como síndromes de isquemia-reperusión, lesión tisular tóxica, carcinogénesis, síndromes de hiperoxigenación, envejecimiento, aterosclerosis, diabetes y diversas condiciones inflamatorias incluyendo la artritis reumatoide.⁶

Los radicales libre de oxígeno son especies químicas que poseen un electrón no apareado que lo hace inestable, de vida efímera y le da la propiedad química de ser altamente reactivo, combinándose inespecíficamente con una diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular, dando lugar a moléculas disfuncionales y posteriormente repercutir en la vida celular.⁴ Estos radicales son producidos continuamente como un producto del metabolismo normal de la célula y desempeñan funciones fisiológicas conocidas y son inactivados por un conjunto de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos endógenos, dentro de los que se encuentran la superóxido dismutasa, catalasa, el sistema de citocromos mitocondriales, el ácido ascórbico, los beta carotenos, el tocoferol, la albúmina entre otros.¹⁵ Durante el proceso inflamatorio las células incrementan el consumo de oxígeno lo cual puede superar el mecanismo antioxidante endógeno y traducirse en daño tisular y enfermedad, se conoce que los radicales libres de oxígeno promueven la reabsorción ósea inducida por interleucina-1, estimulan la síntesis de citocinas, promueven factores de transcripción, apoptosis y fragmentan el ácido hialurónico del líquido sinovial entre otros mecanismos.⁸⁻¹⁰ Sin embargo continúa siendo difícil el estudio de éstos debido a que resulta casi imposible medirlos directamente *in vivo*, por lo que se ha recurrido a procedimientos indirectos centrados en la medición de productos

terminales de las reacciones de los radicales libres con biomoléculas. La espectrometría de la resonancia del spin del electrón es la única técnica que mide directamente a los radicales libres, técnica inaccesible para estudios en humanos; por lo que para ello se ha utilizado la cuantificación de la capacidad antioxidante de líquidos y productos de lipoperoxidación en donde los hidroperóxidos se transforman en malonil-dialdehído o 4-hidroxinonenal que se ligan a grupo amino dando lugar a bases Schiff que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico formando compuestos que pueden medirse con fluorometría o cromatografía.¹⁹

Actualmente existe la tendencia de evitar el estrés oxidativo en diferentes enfermedades, manipulando los antioxidantes conocidos. Panigrahi,²¹ utilizó el ácido alfa lipoico, antioxidante natural, en ratas después de inducirles isquemia cerebral por oclusión bilateral de las carótidas, observando una disminución de la mortalidad de 78 a 26%; estos resultados han sido corroborados por otros autores.¹³

En modelos experimentales de isquemia miocárdica se ha empleado superóxido dismutasa con buenos resultados,²² así como también alopurinol para inhibir la función de la xantina-oxidasa. Hicks y cols trataron 10 voluntarios sanos con 400 mg de vitamina E y 1 g. de vitamina C por 2 semanas y observaron que la capacidad antioxidante del suero incrementó 12% ($p < 0.05$).¹⁷

No ha sido evaluado el efecto de los antioxidantes en la artritis reumatoide por lo que éste es el primer estudio con esa finalidad; analizamos el suero y líquido sinovial de nuestros pacientes encontrando una tendencia a mejorar la capacidad antioxidante en ambos líquidos pero con un aumento no significativo hasta el momento, probablemente por el reducido número de pacientes o bien la dosis administrada, ya que otros autores han empleado dosis mayores por menor tiempo reportando incremento significativo de la capacidad antioxidante;¹⁷ de la misma manera no se presentaron cambios en los parámetros

clínicos estudiados, probablemente debido a la corta duración del tratamiento. Por otro lado, el comportamiento de los cromolípidos fue aberrante, ya que las modificaciones en sus niveles no guardaron relación alguna con el tratamiento, lo cual probablemente es atribuible a variables no controlables en el procesamiento de las muestras.

Las moléculas responsables del efecto protector contra la oxidación por radicales libres no son bien conocidas hasta ahora por lo que este problema continúa abierto a nuevas opciones experimentales.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en donde se evalúa el efecto de la vitamina E y C en la artritis reumatoide en suero y líquido sinovial; hasta el momento es bien conocida la utilidad de diferentes antioxidantes para mejorar la capacidad antioxidante del suero así como para limitar el daño tisular. Estas investigaciones han sido realizadas sobre todos en diversas entidades clínicas de lesión por isquemia-reperusión.

Tratando de dilucidar el efecto de estos antioxidantes en la artritis reumatoide planteamos el presente estudio y encontramos una tendencia a mejorar el número de articulaciones dolorosas en el grupo que recibió vitaminas E y C pero sin significancia estadística con respecto al grupo que no lo recibió; el resto de los parámetros clínicos evaluados no se modificaron después del tratamiento en ambos grupos. Los parámetros clínicos no correlacionaron con las variables paraclínicas analizadas.

Observamos una tendencia a incrementar la capacidad antioxidante del suero y líquido sinovial en los pacientes con artritis reumatoide que fueron tratados con antioxidantes, sin embargo, con este estudio no fue posible establecer conclusiones problememente debido al reducido número de pacientes incluidos.

Otro dato sobresaliente es que la dosis de antioxidantes empleada en este estudio fue menor a la utilizada en trabajos previos pero por mayor tiempo; ésto nos sugiere que puede ser otro factor que condiciona los pobres resultados obtenidos.

Deberá continuar el estudio con la finalidad de incluir un mayor número de pacientes que le permitan alcanzar significancia.

BIBLIOGRAFIA

1. Wolfe F. The natural history of rheumatoid arthritis. *J Rheuma* 1996, (Suppl 44) 23:13-22.
2. Harris E. Rheumatoid Arthritis. *New Eng J Med* 1990,322:1277-1289.
- 3.- Stuart JM, Townes AS, Kang AH. Collagen autoimmune arthritis. *Annu Rev Immunol* 1984, 2:199-218.
4. Cheeseman KH and Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993,49:481-493.
5. Mapp PI, Grootveld MC and Blake DR. Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 1995,51:419-436.
6. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993,49:506-522.
7. Amstad PA, Krupitza G, Cerutti PA. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res* 1992,52:3952-3960.
8. Murrell G, Francis N, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990,265:659-665.
9. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC et al. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Inv* 1990,85:632-639.
10. Lander HM. An essential role for free radicals and dericed species in signal transduction . *FASEB J*, 1997 11:118-124.
11. Stevens CR, Williams RB, Farrell AJ. Hypoxia and inflammatory synovitis; observations and speculations. *Ann Rheum Dis* 1991, 50:124-132.
12. Mc Neil JD, Weibkin OW, Betts W. Depolymerisation products of hyaluronic acid after exposure to oxygen-derived free radicals. *Ann Rheum Dis* 1985, 44:780-789.
13. Cowley DJ, Lukovic L, Petty M. MDL 74,180 reduces cerebral infarction and free radical concentrations in rats subjected to ischaemia and reperfusion. *Eur J Pharm* 1996, 298:227-233.
14. Williams RB, Wibkin OW. Criteria for activity of rheumatoid arthritis, the american rheumatismo association , 1993. *Arthrit Rheum* 1993, 36:729-40.
15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA. The American Rheumatismo Association 1987 revised criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthrit Rheum* 1988, 31.315-324.
16. Rangan U and Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993 49:700-718.
17. Hicks J and Navarro-Medina R. Inhibitory capacity of human serum on induced microsomal lipoperoxidation *Arch Med Reseach* 1995,26:169-172.

18. Steinbrocker. JAMA 1949,140:659-662.
19. Frenk S. Enfermedades relacionadas con la acción de los radicales libres. Gac Méd. Méx 1996, 132:199-203.
20. Johnson WD, Kayser KL, Brenowitz JB et al. A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery. Am Heart J 1991,121:20-28.
21. Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR et al. Alfa lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. Brain Research 1996,717:184-188.
22. Naslund U, Haggmark S, Johansson G et al. Limitation of myocardial infarct size by superoxide dismutase as an adjunct to reperfusion after different durations of coronary occlusion in the pig. Circ Res 1990,66:1294-1298.

Tabla I. Características clínicas.

<i>Característica</i>	Grupo I n=6	Grupo II n=4
<i>Edad media (rango en años)</i>	42.6 (20-55)	45 (25-70)
<i>Duración media de la AR (rango en años)</i>	10 (2-22)	11.4 (2-25)
<i>Clase funcional* media (rango)</i>	2.2 (2-3)	2.6 (2-4)
<i>Tratamiento</i>		
<i>Prednisona (No. Pacientes)</i>	2	1
<i>Cloroquina</i>	4	2
<i>Metotrexate</i>	0	2
<i>Azatioprina</i>	1	0
<i>D-penicilamina</i>	0	1

*Según la clasificación de Steinbrocker¹⁷

Tabla II. Resultados de la evaluación clínica.

Parámetro Clínico	Grupo I			Grupo II			p
	PreTx	PostTx	Diferencia	PreTx	PostTx	Diferencia	
No. Articulaciones Dolorosas*	13.2	10.2	-3	13.8	14	0.2	ns
No. Articulaciones Inflamadas*	4.8	5.6	0.8	8.2	8.4	0.2	ns
RAM (horas)*	2.5	1	-1.5	2.7	3.5	0.8	ns
EVD (cm)*	6.2	5.2	-1	5.6	5.6	0	ns
EGP (cm)*	4.8	3.2	-1.6	5.2	5.6	0.4	ns
EGM (cm)*	5.2	5.3	0.1	5	5.8	0.8	ns

*Valores promedio. RAM= Rigidez articular matutina. EVD= Escala visual de dolor. EGP= Evaluación global por el paciente. EGM= Evaluación global por el médico. PreTx= Pre-tratamiento. PostTx= Post-tratamiento.

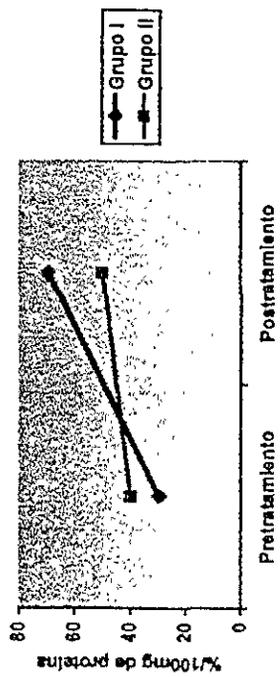
Tabla III. Efecto de los antioxidantes en suero y líquido sinovial.

<i>Parámetro</i>	<i>Grupo I</i>		<i>Grupo II</i>		<i>p</i>		
	<i>PreTx</i>	<i>PostTx</i>	<i>Diferencia</i>	<i>PreTx</i>		<i>PostTx</i>	<i>Diferencia</i>
<i>Capacidad antioxidante *</i>							
<i>Suero</i>	29.67	69.5	39.8	39.9	50	10.1	ns
<i>Líquido sinovial</i>	32.16	59	26.8	39.5	47.9	8.4	ns
<i>Cromolipidos **</i>							
<i>Suero</i>	8.3	21	12.7	37	25	-12	ns
<i>Líquido sinovial</i>	0	25	25	39.95	37.5	-2.4	ns

*Valores promedio en %/100mg de proteína.

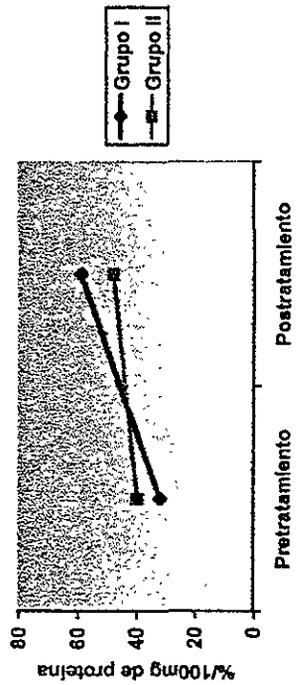
**Valores promedio en nmol/ml.

Gráfica 1. Capacidad antioxidante en suero.



$p > 0.05$

Gráfica 2. Capacidad antioxidante en líquido sinovial



$p > 0.05$