

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

---

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
"ANTONIO FRAGA MAURET"  
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

**ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA DE PACIENTES MEXICANOS  
CON ESCLEROSIS SISTEMICA DIFUSA COMPARADO CON UNA  
POBLACION SANA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

P R E S E N T A:

***DR. MARCO ANTONIO SILVA MEDINA***

**ASESOR DE TESIS:**

***DRA. MARIA DEL PILAR CRUZ DOMINGUEZ***

**M en C. DR. DANIEL HECTOR MONTES CORTES**

**DRA. OLGA LIDIA VERA LASTRA**

**MEXICO, D.F. 2009**



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.

## ***HOJA DE AUTORIZACIÓN***

---

**Dr. Jesús Arenas Osuna**

Jefe de la División de Educación en Salud

UMAE, Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”

Centro Médico Nacional “La Raza”

---

**Dra. Olga Lidia Vera Lastra**

Titular del curso universitario en Medicina Interna

UMAE, Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”

Centro Médico Nacional “La Raza”

---

**Dr. Marco Antonio Silva Medina**

Residente de cuarto año de Medicina Interna

**No. Protocolo R-2008-3501-48**

## INDICE.

## PAGINAS.

<b>I. Resumen</b> .....	5
<b>II. Summary</b> .....	6
<b>III. Antecedentes científicos</b> .....	7
III.1. Radicales libres.....	7
III.2. Fuentes de radicales libres.....	8
III.3. Factores que predisponen la formación de radicales libres.....	9
III.4. Defensas antioxidante.....	9
III.5 Definición de estrés oxidativo.....	9
III.6 Esclerosis sistémica.....	9
III.7. Variantes de clínicas de esclerosis sistémica .....	10
III.8. Esclerosis sistémica difusa temprana.....	10
III.9. Esclerosis sistémica difusa tardía.....	11
III.10. Etiopatogenia de la esclerosis sistémica .....	12
III.11. Esclerosis sistémica y estrés oxidativo.....	13
III.12. Esclerosis sistémica y estrés oxidativo: estudios de investigación.....	14
<b>IV. Material y métodos</b> .....	18
<b>V. Resultados</b> .....	21
V.1. Caracteristicaza clínicas basales de los grupos de estudio.....	21
V.2. Características de laboratorio de los grupos de estudio.....	22
V.3. Malondialdehído.....	23
V.4. Capacidad Antioxidante Total.....	25
V.5. Ditirosinas.....	25
V.6. Carbonilos.....	26
V.7. Nitro Azul de Tetrazolio.....	27
<b>VI. Discusión</b> .....	30

<b>VII. Conclusiones</b> .....	32
<b>VIII. Bibliografía</b> .....	33
<b>IX. Anexos</b> .....	36

## **RESUMEN**

### **Estrés oxidativo en plasma de pacientes mexicanos con esclerosis sistémica difusa comparado con una población sana.**

**Introducción:** En esclerosis sistémica la etiología es desconocida. Fisiopatológicamente presenta: disfunción endotelial, autoinmunidad y fibrosis. El estrés oxidativo (EO), es el principal mecanismo de daño endotelial.

**Objetivo:** Medir el EO en plasma de pacientes mexicanos con esclerosis sistémica difusa (ESD) y compararlo con un grupo control.

**Material y Métodos:** Estudio transversal, comparativo donde se revisaron pacientes con ESD y se compararon de manera pareada con controles sanos. Se cuantificó el EO midiendo los compuestos reactivos al ácido tiobarbiturico y la capacidad antioxidante total en plasma de pacientes que cumplieron los criterios de inclusión (diagnóstico de ESD) y en controles sanos sin condición que modifique su EO.

**Resultados:** Se analizaron 28 pacientes con ESD, (edad media de  $47.5 \pm 10$  años, 32% en estadio temprano y 68% tardío), y se compararon con un grupo control. Las concentraciones plasmáticas de malondialdehído, ditirosinas, carbonilos y la reducción de nitro azul de tetrazolio, fueron mas altos en pacientes con ESD ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencia significativa del EO, entre los estadios temprano y tardío. Tampoco encontramos correlación del EO con la afección a órganos.

**Conclusiones:** El EO esta más incrementado en pacientes con ESD independientemente del estadio de la enfermedad y la afección orgánica, comparado con controles sanos.

**Palabras Clave:** Esclerosis sistémica difusa, estrés oxidativo.

## **SUMMARY**

### **Oxidative stress in Mexican patient's plasma with diffuse systemic sclerosis compared with healthy population.**

**Introduction:** The etiology of systemic sclerosis is unknown. It presents: endothelial dysfunction, autoimmunity and fibrosis. The oxidative stress (OS) is the principal endothelial mechanism of injury.

**Objective:** Determine the OS in Mexican patient's plasma with diffuse systemic sclerosis compared with healthy population.

**Material and Method:** Transversal, comparative study where it was reviewed, compared and matched in patients with diffused systemic sclerosis (DSS) with healthy population. There were determined the tyobarbituric acid compound and the total antioxidative capacity as a measure of OS in patients that got the inclusion criteria (DSS diagnosis) and healthy population without condition that modified their OS.

**Results:** There were analyzed 28 patients with DSS, median age 47.5 +/- years, 32% in early stage and 68% late stage, and they were compared with a control group. The malondialdehyde, di-tyrosines, carbonyls and nitro blue tetrazolo reduction concentration in plasma were higher in patients with DSS ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference between the early and late stage of DSS patients. Neither existed correlation between OS and organ affection.

**Conclusions:** The OS is increased in patients with DSS independently of the stage and the organic affection compared with healthy controls.

**Key words:** Diffuse systemic sclerosis, oxidative stress.

## ANTECEDENTES CIENTIFICOS

### Radicales libres:

Las moléculas de cualquier sustancia están formadas por átomos, en el núcleo del átomo se localizan los protones y neutrones y alrededor de éste los electrones, que se encuentran pareados y cada electrón del par muestra una rotación o giro opuesto. Un radical libre (RL) es una especie química que contiene uno o más electrones no pareados (por pérdida o ganancia de uno de ellos), con esto la molécula es inestable y muy reactiva (1-2). Los radicales libres de interés para la medicina son derivados del oxígeno y son: el radical superóxido, ( $O_2^-$ ), el singulete de oxígeno ( $^1O_2$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); que no es un RL y su importancia radica en que es fuente del radical hidroxilo. Estos radicales son llamados en conjunto especies reactivas de oxígeno (ERO) (3) y son altamente reactivas hacia macromoléculas celulares. La formación de RL se lleva a cabo cuando la cuando la molécula de  $O_2$  va aceptando electrones hasta formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El radical superóxido ( $O_2^-$ ), es el primero que se forma cuando el  $O_2$  acepta un electrón:  $O_2 + 1 e \longrightarrow O_2^-$  (1, 2, 4), posteriormente la molécula que se forma cuando el radical superóxido acepta otro electrón y dos átomos de hidrógeno es el peróxido de hidrógeno:  $O_2^- + 2 e + 2 H^+ \longrightarrow H_2O_2$  (1, 2,4); este a su vez es un agente que puede difundirse al espacio extracelular donde existen pocos mecanismos de defensa antioxidante y participa en la formación del radical hidroxilo al reaccionar con un radical superóxido:  $H_2O_2 + O_2^- \longrightarrow 2 OH^-$  (1, 2,4). Por otro lado cuando el superóxido en presencia de metales de transición como cobre ( $Cu^+$ ) o hierro ( $Fe^{2+}$ ) da lugar a la reacción de Fenton, produciendo hidroxilo (2). Haber y Weiss, describieron que el hidroxilo en presencia de peróxido de hidrógeno forma superóxido y a su vez



ante un exceso de peróxido de hidrógeno, genera una cantidad adicional de radical hidroxilo (2,4).

El radical hidroxilo, es el radical más tóxico, tienen una vida media de  $1 \times 10^{-9}$  s, su radio promedio de acción es  $30 \text{ \AA}$  e interactúa con moléculas biológicas: carbohidratos, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos, formando radicales libres de las moléculas con las que reaccionó (5). El radical superóxido, puede reaccionar con el óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) y generan peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el cual se escinde en una molécula de radical hidroxilo y una de dióxido de nitrógeno (2,4), el peroxinitrito puede atacar también varias biomoléculas por múltiples mecanismos.

El oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) tiene gran capacidad oxidante y reacciona con las membranas plasmáticas cuando se produce fuera de la célula y con moléculas como ADN, las proteínas y sobre todo los lípidos cuando su producción es intracelular (6).

Los radicales libres de oxígeno tiene la capacidad de formar aldehídos, como son: malondialdehído e hidroxinonal, al reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados, estos compuestos forman enlaces cruzados con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando daño a estas moléculas (7).

**Las fuentes de RL**, se pueden dividir en: endógenas y exógenas. Las endógenas derivan del metabolismo celular y del estallido oxidativo, producido cuando las células fagocíticas destruyen microorganismos invasores (7). Otras reacciones incluyen la actividad de ciertas oxidasas, ciclooxigenasas, lipooxigenasas, deshidrogenasas y peroxidasas. Las oxidasas y la cadena transportadora de electrones acoplada a la fosforilación oxidativa son las fuentes principales y continuas de especies reactivas de oxígeno (8). Las fuentes exógenas de RL incluyen tabaquismo, contaminantes del aire, solventes orgánicos, anestésicos, pesticidas, radiaciones y altas concentraciones de oxígeno en el medio ambiente (7).

### **Factores que predisponen a la formación de radicales libres:**

Algunos de los factores y condiciones que predisponen la formación de RL son las siguientes: radiaciones ionizantes, excesiva disponibilidad de metales de transición, exceso de oxígeno o aumento de su concentración, como sucede en la isquemia-reperfusión que se presenta en el fenómeno de Raynaud, leucocitosis o incremento en la fagocitosis en el sitio del daño, interrupción de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, como sucede en condiciones de hipoxia y activación del metabolismo del ácido araquidónico (2).

**Defensas antioxidantes:** existen dos tipos de sistemas antioxidantes; 1) el sistema de micronutrientes no enzimático, que incluyen moléculas como el glutatión (GSH), vitamina E, vitamina C, pre vitamina A (beta caroteno), vitamina A, elementos traza (selenio, hierro, zinc, cobre y manganeso), y 2) el sistema enzimático, que incluyen las siguientes enzimas: glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (4-7). En circunstancias normales existe un equilibrio entre la generación de ERO y las defensas antioxidantes, cuando se rompe este equilibrio, por producción excesiva de ERO o bien por deficiencia de sustancias antioxidantes, nos encontramos ante una situación llamada estrés oxidativo.

**Definición de estrés oxidativo:** es una situación o estado de imbalance en el cuerpo donde están presentes concentraciones excesivos de ERO concomitantemente con una disponibilidad disminuida de sustancias neutralizadoras conocidas como antioxidantes, cuya función es destruir estos productos nocivos (7).

**La esclerosis sistémica (ES),** es una enfermedad de origen desconocido caracterizada por depósito excesivo de colágeno y otras macromoléculas de tejido conectivo en piel y múltiples órganos internos, con alteración en forma predominante de la microvasculatura y del sistema inmune celular y humoral (9). La Asociación

Americana de Reumatología publico (ACR) en 1980 los criterios de clasificación diagnósticos: criterio mayor: esclerosis cutánea proximal oacroesclerosis; criterios menores: esclerodactilia, cicatrices puntiformes en los pulpejos de los dedos y fibrosis pulmonar bibasal; para establecer el diagnóstico se requiere que este presente el criterio mayor por si solo o la combinación de dos criterios menores; con una sensibilidad de 97% y especificidad de 98% (10).

**La ES divide en dos variantes clínicas:** 1) Esclerosis sistémica difusa (ESD); en esta variedad la afección cutánea es rápidamente progresiva en un plazo de meses o un año con afección siempre proximal a los codos y rodillas (por arriba de los brazos, muslos, pared torácica anterior y abdomen), que se documenta en algún momento de la enfermedad. Y 2) la esclerosis sistémica limitada (ESL); donde la afección a piel es lentamente progresiva y se limita a la piel distal de las extremidades (nunca proximal a codos o rodillas) (9-11).

En cuanto al tiempo de duración de la enfermedad esta puede dividirse en: temprana y tardía, para esto se toma en cuenta desde la aparición del primer síntoma atribuible a ES hasta la fecha de la evaluación clasificándose en: ESD temprana con evolución menor a 3 años y ESD tardía a partir del sexto año de evolución. A su vez hablamos de ESL temprana con evolución menor a cinco años y tardía con evolución mayor a diez años.

(12). A continuación se describen las características de la ESD:

**Esclerosis sistémica difusa temprana:** los pacientes presentan los siguientes síntomas: fatiga, artralgias, síndrome de túnel del carpo, edema en dedos, pies y piernas, anticuerpos antinucleares positivos. Se aprecia a la palpación fricción de los tendones y se observan contracturas articulares de los dedos (fase prodrómica). Posteriormente existe progresión en la afección cutánea con engrosamiento rápido de la piel en meses, extendiéndose de manera proximal a antebrazos y piernas y en algún momento pero no

como regla existe afección a la piel del tronco (13). En esta fase de la enfermedad se presenta disfunción orgánica; La afección al aparato digestivo se presenta en el 50% de los pacientes y puede ocurrir de manera asintomática o bien como disfagia o pirosis (14). La enfermedad pulmonar intersticial también es frecuente en este estadio, especialmente en pacientes con antitopoisomerasa I (Scl 70), ya que se presenta hasta en el 60%. La afección cardíaca se presenta más comúnmente en forma asintomática y se demuestra por electrocardiograma, ecocardiograma o prueba de perfusión con talio. La complicación más dramática que puede presentarse en el estadio temprano es la crisis renal y es más frecuentemente observada dentro de los 4 primeros años de la enfermedad, principalmente en pacientes con anticuerpos anti RNA polimerasa I o III (12-15).

**Esclerosis sistémica difusa tardía:** la transición entre el estadio temprano y tardío ocurre cuando el engrosamiento de la piel alcanza un pico en severidad y extensión y comienza a regresar. El mejoramiento cutáneo inicia en las áreas que fueron afectadas tardíamente y la sintomatología de prurito, artralgias y fricción en los tendones también menguan. Después de varios años, las telangiectasias y calcinosis pueden aparecer y ser indistinguibles de la variedad limitada y se diferencian por la persistencia de la contractura en los dedos y por la presencia de anticuerpos típicos de la variedad difusa. En este estadio las complicaciones resultan de los cambios fibróticos comparados con las complicaciones del estadio temprano que se deben a eventos inflamatorios. La afección gastrointestinal incluye flacidez y atonía o estenosis esofágica, ocasionalmente se presenta intestino corto con hipomotilidad, el cual puede provocar mala absorción intestinal. El deterioro de la función pulmonar ocurre en forma relativamente lenta y en fumadores el deterioro se acelera. La afección cardíaca incluyen defectos en la prueba

de perfusión con talio, disminución de la función del ventrículo izquierdo, trastornos de conducción, evidencia de derrame pericárdico en ecocardiograma (12).

### **Etiopatogenia de la esclerosis sistémica:**

La etiología de la esclerosis sistémica continúa siendo desconocida, pero dentro de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, se reconocen tres áreas de afección relacionadas entre sí y que explican el desarrollo de la enfermedad: activación inmunitaria, la disfunción endotelial y la fibrosis (16). De estas alteraciones existe evidencia que la lesión vascular (endotelial), es la lesión primaria responsable de la cascada de acontecimientos que incluyen la formación de auto anticuerpos y liberación de mediadores celulares que activan la proliferación de fibroblastos, con el consiguiente depósito de colágeno y matriz extracelular que provoca disfunción orgánica (16).

La lesión o disfunción endotelial se presenta con una tendencia vasoespástica por inadecuada respuesta vasodilatadora y cambios en vasos pequeños que incluyen alteración en el sistema de coagulación, fibrinólisis y proliferación de las células de la intima que conducen a obliteración de la microvasculatura (17). Entre los diferentes factores que contribuyen a la inflamación y daño al endotelio y que por lo tanto favorecen la progresión de la enfermedad, se encuentra el estrés inducido al endotelio ERO y ERN. La producción de las ERO y ERN no solo se derivan del proceso inflamatorio, también su producción se incrementa de manera importante por los episodios frecuentes y repetidos de lesión inducida por isquemia y reperfusión secundario al fenómeno de Raynaud (18). Lo anterior ha conducido a la hipótesis de que el estrés oxidativo es el evento pivote en la fase temprana de la enfermedad y por lo tanto es la base para que se pueda utilizar el tratamiento antioxidante en la esclerosis sistémica en sus fases tempranas, cuando el estrés oxidativo se encuentra a su máximo nivel (17, 18, 19).

### **Esclerosis sistémica y estrés oxidativo:**

En la esclerosis sistémica, las fuentes de ERO se identifican en las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), linfocitos, fibroblastos y células endoteliales, que producen grandes cantidades de ERO a través del fosfodinucléotido de nicotinamida adenina (NADPH), dependiente del sistema óxido reductasa (20-21). Durante los episodios de isquemia la xantina deshidrogenasa, presente en el endotelio de los vasos pequeños, es convertida a xantina oxidasa (XO) que durante la reperfusión y en presencia de sustratos de purina (hipoxantina y xantina), produce grandes cantidades de anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno (17-22). Inmediatamente posterior a la reperfusión en condiciones de hiperoxemia, la producción de radicales libres se encuentra incrementada, esto se acompaña de deficiencia en la síntesis de catalasa, enzima crítica en la defensa antioxidante contra el superóxido; por lo que en la reperfusión, las células endoteliales microvasculares son susceptibles a lesión por estrés oxidativo (17, 23, 24). Las ERO provocan incremento en la permeabilidad y regeneración compensatoria de la célula endotelial y de la lamina basal, lo que trae como consecuencia estrechamiento del lumen microvascular, proliferación de células del músculo liso y fibroblastos provocando isquemia distal localizada, con la consecuente generación de mas ERO y ERN, conduciendo a un efecto de retroalimentación positiva de estrechamiento luminal, isquemia, generación de ERO y ERN, que finaliza en engrosamiento de la intima y fibrosis (17, 18).

Los blancos del daño inducido por las ERO son las macromoléculas celulares; lípidos, proteínas (proteoglicanos, colágeno), purinas (ADN) y sistema inmune (23).

Al entrar en contacto las ERO con las membranas de las células endoteliales, se produce la peroxidación lipídica, ocasionando destrucción de los fosfolípidos de membrana con la consecuente pérdida de la fluidez de la membrana, alineación de receptores y lisis

potencial de la célula, este evento que ocurre en fases tempranas de la reperfusión y se intensifica directamente proporcional con la duración de la misma, ocasionando lesión celular irreversible (17).

La peroxidación lipídica de la membrana ocasiona la formación de lípidos peroxidados y sus productos de degradación, como son hidrocarburos saturados e insaturados y aldehídos que por si mismos son citotóxicos; los ácidos grasos poliinsaturados que se liberan al plasma, forman proteínas de baja densidad que son oxidados por las células endoteliales y macrófagos, en consecuencia, la medición de estos compuestos por laboratorio sirven como marcadores de estrés oxidativo. Una de las pruebas más utilizadas, es la cuantificación de los lípidos peroxidados, que son compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBA) (7-25), tales como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4HNE) (7). Otra manera de medir la peroxidación lipídica es por medio de los isoprostanos (8-isoprostano y F2 isoprostano), que son compuestos similares a las prostaglandinas, producidos cuando ocurre peroxidación del ácido araquidónico (7, 26, 27, 28). La capacidad antioxidante total es otro método utilizado para determinar el estrés oxidativo; es un marcador de defensa antioxidante y se basa en la capacidad de los sistemas antioxidantes del plasma para inhibir el 50% de la formación de los compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (7-29).

### **Estrés oxidativo y esclerosis sistémica; estudios de investigación:**

Existen estudios donde se demuestra niveles altos de estrés oxidativo en ES, como son: el realizado por Simonini (31) en 63 pacientes con ES, donde midió los productos de peroxidación conjugados y anticuerpos contra lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-OX); en este estudio 40 pacientes presentaban afección limitada y 23 difusa; 30 se encontraban en estadio temprano y 30 en tardío. Se encontró niveles significativamente mas altos de los productos de peroxidación conjugados en ES

comparados con sujetos controles sanos ( $73.3 \pm 37.2$   $\mu\text{mol/l}$  vs  $48.4 \pm 16.7$ ,  $p < 0.0001$ ), además se evidenció que los niveles de anticuerpos contra LDL-OX, fueron significativamente más altos en pacientes con esclerosis sistémica ( $309.5 \pm 367.2$  mU/ml vs  $89.3 \pm 29.1$   $p < 0.0001$ ), cuando se comparó con controles. En cuanto a la variedad difusa se encontró mayores niveles de los productos de peroxidación conjugados y anticuerpos contra LDL-OX ( $64.5 \pm 36.4$  y  $207.7 \pm 316.1$   $p < 0.05$ , respectivamente) (30). Otro estudio realizado por Ogawa (26), se midieron los niveles séricos de 8-isoprostano como marcador de estrés oxidativo en 32 pacientes con ESD y 25 con ESL; encontrando un valor medio de 8-isoprostano de 441 pg/ml; con un rango de 13 a 154879 pg/ml comparado con controles normales donde el valor medio fue de 6 y el rango de 2 a 34 ( $p < 0.001$ ). En los pacientes con ESD se encontró un valor medio de 452 con un rango de 13 a 154879 pg/ml, significativamente más altos comparados con los controles ( $p < 0.001$ ). Se encontró además otro estudio que midió los niveles de 8-isoprostaglandinas-F2 alfa urinarios en pacientes con ES, donde se hizo además correlación con las características clínicas de los pacientes; encontrando niveles urinarios altos en ES comparado con el grupo control sano ( $341.7$  vs  $147.6$  pg/mg creatinina,  $p < 0.001$ ). Además los valores de 8-isoprostaglandina-F2 alfa, se relacionaron fuertemente con el patrón de capilaroscopia y la afección pulmonar ( $p=0.002$  y  $0.003$ , respectivamente), mostrando incremento en los niveles con la progresión de la afección pulmonar (27). Allanore, realizó un estudio en 24 pacientes, (31) donde evaluó las propiedades antioxidantes de los calcio antagonistas en la ES; primero se realizó una medición de los productos de oxidación proteica y lipídica tras la suspensión por 72 horas del fármaco y otra medición posterior de los mismos marcadores tras el reinicio del fármaco, encontrando que los valores medios basales de marcadores plasmáticos de EO fueron más altos en pacientes con ES comparado con el



grupo control (carbonilos  $0.4 \pm 0.1$  vs  $0.3 \pm 0.1$  nmol/mg proteína,  $p = 0.0001$ ; los productos avanzados de oxidación de proteínas fue de  $111 \pm 13$  vs  $47 \pm 7$  mmol/l  $p = 0.003$ ; malondialdehído  $11.3 \pm 3.3$  vs  $5.5 \pm 1.3$  mmol/l  $p < 0.0001$ , respectivamente). Y los valores plasmáticos medidos tras el reinicio del calcio antagonista fueron significativamente menores (carbonilos  $0.3 \pm 0.1$  nmol/mg proteína,  $p < 0.0001$ ; productos avanzados de la oxidación proteica  $60 \pm 3$  mmol/l,  $p < 0.0001$ ; malondialdehído  $8.8 \pm 5.6$  mmol/l  $p = 0.0002$ ), con lo que se concluyó que los calcio antagonistas tipo dihidropiridinas disminuyen significativamente el estrés oxidativo en pacientes con esclerosis sistémica, de tal manera que en nuestro estudio fue necesario suspender 72 horas antes tales medicamentos para que no intervinieran con las mediciones realizadas.

Un estudio realizado por Torres, determinó valores basales de marcadores de estrés oxidativo (compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico CRAT, determinación de grupos carbonilos, capacidad antioxidante total en plasma CATP y actividad enzimática de paraoxonasa, en población mexicana sana de 31 a 60 años de edad; los cuales fueron agrupados según la edad de la siguiente manera: grupo 1 (31 a 40 años), grupo 2 (41 a 50 años) y grupo 3 (51 a 60 años); se encontró los siguientes resultados: en el grupo 1 los CRAT fue de  $7.403 \pm 0.326$   $\mu$ mol, la cuantificación de grupos carbonilo de  $0.602 \pm 0.0403$  nmol/mg proteína, la CATP  $0.072 \pm 0.07$  unidades y la actividad enzimática de paraoxonasa  $0.072 \pm 0.007$  nmol p-nitrofenol/min/mg proteína. En el grupo 2 los CRAT fueron de  $8.462 \pm 0.571$   $\mu$ mol, la cuantificación de grupos carbonilo de  $0.622 \pm 0.035$  nmol/mg proteína, CATP  $0.6948 \pm 0.068$  unidades y la actividad enzimática de paraoxonasa de  $0.117 \pm 0.008$  nmol p-nitrofenol/min/mg proteína. Y finalmente en el grupo 3, los CRAT fueron de  $10.34 \pm 1.283$   $\mu$ mol, la cuantificación de grupos carbonilo de  $0.641 \pm 0.035$  nmol/mg proteína, CATP de  $0.585 \pm 0.122$  unidades y la actividad

enzimática de paraoxonasa de  $0.119 \pm 0.004$  nmol p-nitrofenol/min/mg proteína. Se llego a la conclusión que los marcadores de daño por estrés oxidativo se modifican por la edad en individuos sanos, lo que refleja el daño a lípidos por el envejecimiento (29).

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

El objetivo general de este estudio fue determinar el estrés oxidativo en plasma de pacientes mexicanos con esclerosis sistémica difusa y compararlo con un grupo control. Además, de manera específica se comparó las concentraciones plasmáticas de estrés oxidativo entre pacientes con esclerosis sistémica difusa temprana y tardía; las concentraciones plasmáticas de estrés oxidativo entre pacientes con esclerosis sistémica difusa tardía y un grupo control y se investigó la relación de las concentraciones plasmáticas de estrés oxidativo con el número de órganos afectados en pacientes con esclerosis sistémica difusa.

### **DISEÑO DEL ESTUDIO:**

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, transversal, comparativo y analítico, en el departamento de Medicina Interna del Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret” del Centro Medico Nacional la Raza.

Incluyeron 28 pacientes (22 femeninos y 2 masculinos), con diagnóstico de esclerosis sistémica difusa, que cumplían los criterios de clasificación diagnóstica propuestos por el Colegio Americano de Reumatología (10). Se excluyeron a los pacientes que presentaban alguna condición que incrementará su estrés oxidativo como fue: tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión arterial y dislipidemia, pacientes con alguna otra enfermedad reumatológica diferente de esclerosis sistémica, enfermedad sistémica crónica (insuficiencia cardíaca, hepática crónica o cáncer), embarazo y quienes presentaban infección concomitante. Los pacientes suspendieron los medicamentos que interferían con los niveles plasmáticos de estrés oxidativo 72 horas previas a la obtención de muestra. El grupo control estuvo constituido por personas sanas, voluntarias, mayores de 18 años, se excluyeron a aquellos que presentaban alguna condición que alterará de manera anormal el estrés oxidativo para la edad como fue:

tabaquismo, etilismo, ingesta de multi vitamínicos, alopurinol o corticoesteroides, además de embarazo.

Los pacientes se agruparon según el tiempo de evolución en esclerosis sistémica difusa temprana y tardía.

El calculo del tamaño de la muestra se realizó mediante la formula de comparación de medias, estimándose un nivel de error alfa del 5%, con un poder estadístico de 80%; con lo que se estimó una población de 22 pacientes, incluyéndose en el estudio un total de 28 pacientes.

Se revisaron a los pacientes y sus expedientes clínicos para llenar las hojas de captura de datos el día de la consulta, se les invitó a participar en el estudio y posteriormente a la firma de la carta de consentimiento informado (anexo1), se citaron a las 7 de la mañana en la consulta externa de medicina interna previa suspensión de tratamiento con D penicilamina y calcio antagonista, por un mínimo de 72 horas, para la toma de una muestra de 2 ml de sangre obtenidos por venopunción periférica, la cual se depositó en un tubo ependorff que contiene (10 µl) y el hidroxitolueno butilado (10 µl de una solución al 0.2 mM) que es un antioxidante, con la finalidad de detener la oxidación en el momento de haber obtenido la muestra de sangre; a cada una de las muestras se les colocó un membrete con el nombre del paciente; posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm. Una vez separado el plasma se almacenó a 4 °C hasta el momento de su análisis.

Se anotó en la hoja de registro: la puntuación de la escala modificada de Rodnan, presencia o ausencia de fenómeno de Raynaud, fricción de tendones, síntomas respiratorios, síntomas digestivos, síntomas cardiovasculares, signos vitales, reportes obtenido por revisión en expediente clínico de: nivel de creatinin cinasa (CK), serie esófago gastrodudenal, endoscopia de aparato digestivo alto, reporte de tomografía de

alta resolución de pulmón (TACAR), pruebas de función respiratoria (PFR), ecocardiograma transtorácico, electrocardiograma, depuración de creatinina, albuminuria de 24 hrs, perfil inmunológico, hormonal y el nivel en plasma de estrés oxidativo de cada paciente (Anexo 2). Además se anotó en otra hoja de registro las características generales del grupo control, como fueron: edad, género, nivel de estrés oxidativo en plasma o condición que alterará el estrés oxidativo. (Anexo 3).

La determinación de los niveles plasmáticos de estrés oxidativo se realizó mediante la medición de compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (CRAT) en plasma: se cuantificará los CRAT en plasma por espectrofotometría, usando el método de laboratorio de Yagi K (36). Se mezclará 490  $\mu$ l de amortiguador Tris pre-set pH 7.2 mM, 10  $\mu$ l de plasma y 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375%. Posteriormente se calentará a 90°C durante 15 minutos y se le agregará 500  $\mu$ l de HCl 0.2 N. La absorbancia de medición es a 532 nm a 25°C en un espectrofotómetro marca Bekman-Coulter Serie 800. California, USA. Se utilizará 1,1,3,3-tetrametoxipropano como estándar, dicho análisis se llevará acabo en el laboratorio central del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza.

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se realizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central. Se aplicó la prueba t de Student para comparar las características cuantitativas, Chi cuadrada para las cualitativas. Y análisis de varianza (ANOVA) para comparar medias de los tres grupos. Además de la correlación de Spearman para analizar la asociación entre los niveles de estrés oxidativo con el número de órganos afectados. Un valor de P menor de 0.05 fue considerado como significativo. Para lo anterior, se utilizó el programa estadístico SPSS 16 y GraphPad 4.0.

## **RESULTADOS.**

Se incluyeron 28 pacientes con esclerosis sistémica difusa (ESD), de los cuales 2 (7%) fueron hombres y 26 (93%) mujeres, con una edad media de  $47.5 \pm 10$  años. Nueve pacientes (32%), presentaban ESD temprana (todas mujeres), y 19 pacientes (68%) presentaban ESD tardía (2 hombres, 10.5% y 17 mujeres, 89.5%). En el grupo control la edad media fue de  $48 \pm 7$  años, dos hombres (7%) y 26 mujeres (93%), todos sanos.

La media del número total de órganos afectados fue de  $5.46 \pm 1.26$  (temprana  $5.1 \pm 1.27$  y tardía  $5.6 \pm 1.27$ ). La media del puntaje en la escala modificada de Rodnan, fue de  $26.5 \pm 7.6$  (afección moderada), en la población total de esclerodermia. En ESD temprana el puntaje fue de  $25 \pm 7.8$ , comparado con ESD tardía  $27 \pm 7.7$ , sin encontrarse diferencia significativa entre los dos grupos. 9 pacientes (32%) presentaron fenómeno de Raynaud activo y 19 (67%) solo cicatrices; no se encontró diferencia significativa al comparar los dos grupos de pacientes con ESD. El 100% de los pacientes presentó afección a aparato digestivo: 22 pacientes (78%) presentaron enfermedad por reflujo gastroesofágico, 6 pacientes (21%) tuvieron disfagia, 5 pacientes (18%) presentaron hernia hiatal, corroborado por serie esófago gastroduodenal o endoscopia, 19 pacientes (70%) se corroboró trastornos de la motilidad esofágica. 18 pacientes (64%) mostraron afección endocrinológica (22% ESD temprana vs 84% ESD tardía,  $p < 0.01$ ): 3 pacientes tuvieron aracnoidocele (11%, todos en estadio tardío), 8 pacientes presentaron microadenoma hipofisiario (4% estadio temprano vs 25% tardío), 10 pacientes con hipotiroidismo (4% estadio temprano vs 32% tardío), y 1 con hiperprolactinemia y osteoporosis (4% ambos en estadio tardío). 12 pacientes tuvieron afección pulmonar (43%); en las pruebas de función respiratoria 7 pacientes (25%) presentaron un patrón restrictivo leve y 5 pacientes (18%) patrón de afección mixto. 17 pacientes mostraron afección a tendones (61%) (Tabla 1).

**Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con esclerosis sistémica difusa temprana, tardía y el grupo control**

	<b>Esclerodermia n= 28</b>	<b>Controles n=28</b>	<b>ES &lt;5 años n = 9</b>	<b>ES &gt; 5 años n=19</b>	<b>P</b>
Edad ( $\mu \pm DE$ )	47.5 $\pm$ 10	48 $\pm$ 7	40 $\pm$ 9	51 $\pm$ 9	ns
Género M/F	2/26 (7%/93%)	2/26 (7%/93%)	0/9 (100%)	2/17 (11%/89%)	ns
RODNAN ( $\mu \pm DE$ )	26.5 $\pm$ 7.6	0	25 $\pm$ 7.8	27 $\pm$ 7.7	ns
Raynaud Activo/cicatrices	9 /19 (32%/68%)	0	4/5 (45%/55%)	5/14 (26%/74%)	0.28
Tendones	17 (61%)	0	5 (55%)	12 (63%)	ns
Muscular	9 (32%)	0	3 (33%)	6 (31%)	ns
Digestivo	28 (100%)	0	9 (100%)	19 (100%)	ns
Pulmón	12 (43%)	0	5 (55%)	7 (37%)	ns
Corazón	4 (14%)	0	1 (11%)	3 (16%)	ns
Riñón	6 (21%)	0	2 (22%)	4 (21%)	ns
Endocrinológico	18 (64%)	0	2 (22%)	16 (84%)*	<b>&lt;0.01</b>
Neuropatía	4	0	1 (11%)	3 (16%)	ns
# Órganos afectados	5.46 $\pm$ 1.26	0	5.1 $\pm$ 1.27	5.6 $\pm$ 1.27	ns

Comparación de las características basales de los grupos de estudio. ES, esclerosis sistémica;  $\mu$ , media; DE, desviación estándar; ns, no significativo; \* Chi<sup>2</sup>.

En cuanto a las características de laboratorio, 7 pacientes (25%) presentaron hemoglobina menor de 12 g/dl (25%), en 4 la anemia fue microcítica hipocrómica (14%) y en el resto, el patrón fue normocítico normocrómico. 4 pacientes (14%), tuvieron cifras de CK anormal, 3 de los cuales presentaron debilidad muscular.

La media para la velocidad de sedimentación globular (VSG) fue de 29  $\pm$  11.8 mm/hora, no se encontró diferencias significativa entre ambos grupos de ESD, y en solo 3 pacientes (11%), los valores fueron menor a 15 mm/hora. La media para la proteína C reactiva fue de 8.9  $\pm$  10.7 mg/l, en 13 pacientes (46%) fue anormal, predominando el estadio tardío con 10 pacientes (77%), pero sin encontrarse diferencia significativa (Tabla 2).

**Tabla 2. Comparación de las características de laboratorio entre los grupos de estudio.**

	<b>Esclerodermia n= 28</b>	<b>Controles n=28</b>	<b>ES &lt;5 años<sup>a</sup> n = 9</b>	<b>ES &gt; 5 años<sup>b</sup> n=19</b>	<b>P<sub>ab</sub></b>
VSG ( $\mu\pm$ DE)	29 $\pm$ 11.8	6.5 $\pm$ 2.1*	27 $\pm$ 12.6	29.8 $\pm$ 11.6	0.59
PCR ( $\mu\pm$ DE)	8.9 $\pm$ 10.7		9 $\pm$ 13.9	8.5 $\pm$ 9	0.95
Hb	13.98 $\pm$ 1.89	14.1 $\pm$ 1.03	12.6 $\pm$ 2.19	14.5 $\pm$ 1.56	0.15
HTO	41.62 $\pm$ 5	43.8 $\pm$ 0.96	35.55 $\pm$ 6.22	43.38 $\pm$ 3.73	0.22
VCM	86.38 $\pm$ 9.62	88 $\pm$ 2.1	80.13 $\pm$ 11.5*	90.54 $\pm$ 5.61	<b>0.02</b>
CMHC	32.46 $\pm$ 1.67	33.4 $\pm$ 1.71	31 $\pm$ 2.3	33 $\pm$ 0.95	0.05
Leucocitos	6,789 $\pm$ 1,929	6805 $\pm$ 1106	6957 $\pm$ 2599	6641 $\pm$ 1594	0.17
Plaquetas	276,857 $\pm$ 83,233	284,339 $\pm$ 66,214	264, 778 $\pm$ 105,035	282,579 $\pm$ 73,554	0.6
Albúmina	3.86 $\pm$ 0.36		3.84 $\pm$ 0.477	3.87 $\pm$ 0.31	0.68
Colesterol	190.96 $\pm$ 51.4	172 $\pm$ 35.5	160 $\pm$ 46	205 $\pm$ 48*	<b>0.03</b>
Triglicéridos	151.28 $\pm$ 68.49	141.4 $\pm$ 47.6	131 $\pm$ 55	160 $\pm$ 63	0.31
CPK	115 $\pm$ 126	72 $\pm$ 49	94 $\pm$ 40	125 $\pm$ 151	0.55
Creatinina	0.74 $\pm$ 0.21	0.71 $\pm$ 0.34	0.69 $\pm$ 0.27	0.77 $\pm$ 0.21	0.21
Depuración de creatinina	74.61 $\pm$ 20.33	94 $\pm$ 19	81 $\pm$ 20	69.77 $\pm$ 19.5	0.18

-VSG, velocidad de sedimentación globular; PCR, proteína C reactiva; Hb, hemoglobina; HTO, hematocrito; VCM, volumen corpuscular medio; CMHC, concentración media de hemoglobina corpuscular; CPK, creatinin fosfoquinasa.

### **Marcadores de estrés oxidativo:**

La media en niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) para pacientes con esclerosis sistémica se encontró significativamente más elevada al compararla con la media del grupo control (17.6 +/- 8.6 vs 6.58  $\pm$  3.59,  $p < 0.05$ ), (tabla 3 y figura 1). Sin embargo no hubo diferencia significativa en los niveles de MDA entre pacientes con ESD temprana y tardía ( $p = 0.8$ ), (Tabla 3 y figura 2).

**Tabla 3. Medidas de estrés oxidativo y capacidad antioxidante**

	<b>Esclerodermia (<math>\mu\pm</math>DE) n= 28</b>	<b>Controles (<math>\mu\pm</math>DE) n=28</b>	<b>ES &lt;5 años (<math>\mu\pm</math>DE) n=9</b>	<b>ES &gt; 5 años (<math>\mu\pm</math>DE) n=19</b>	<b>P (ES &gt;/&lt; 5 años</b>
<b>MDA</b>	17.6 $\pm$ 8.6	6.58 $\pm$ 3.59	14.76 $\pm$ 3.59	19.12 $\pm$ 10.1	0.8
<b>CAPT</b>	-2.7 $\pm$ 0.96	0.64 $\pm$ 0.095	-2.5 $\pm$ 0.76	-2.8 $\pm$ 1.05	0.22
<b>Ditirosinas</b>	530.6 $\pm$ 149.7	132.76 $\pm$ 48.6	509.4 $\pm$ 117.1	540.6 $\pm$ 164.9	0.5
<b>Carbonilos</b>	1.75 $\pm$ 0.39	0.68 $\pm$ 0.47	1.76 $\pm$ 0.35	1.75 $\pm$ 0.4	0.08
<b>NBT</b>	17.2 $\pm$ 3.46	10.2 $\pm$ 2.79	16.1 $\pm$ 3.77	17.7 $\pm$ 3.29	1.13

Comparación de los marcadores de estrés oxidativo medidos en los grupos de estudio. MDA, Malondialdehído; CAPT, capacidad antioxidante total del plasma; NBT, nitro azul de tetrazolio.



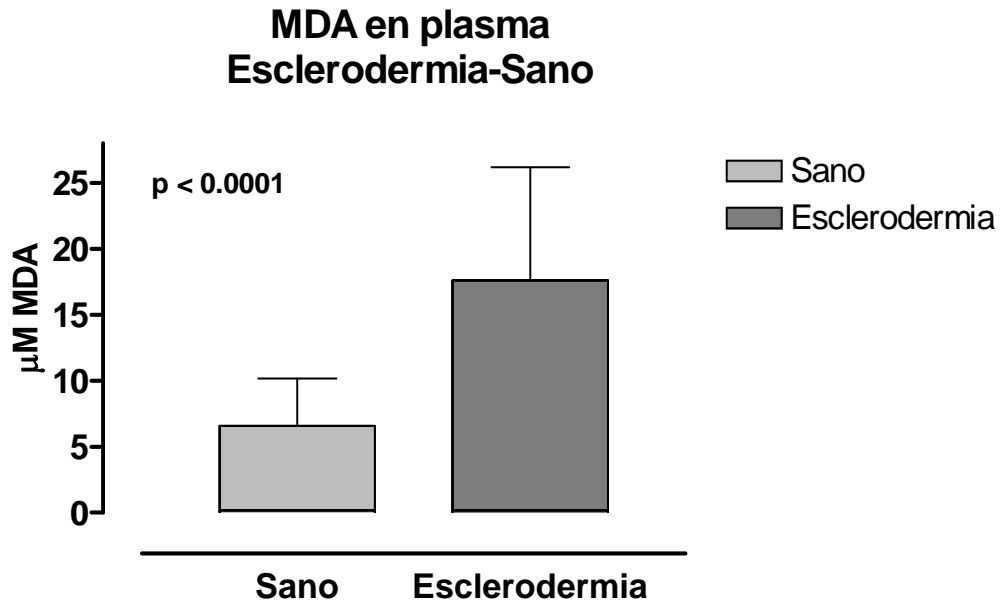


Figura 1. Comparación de niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA), entre pacientes con esclerodermia y el grupo control.

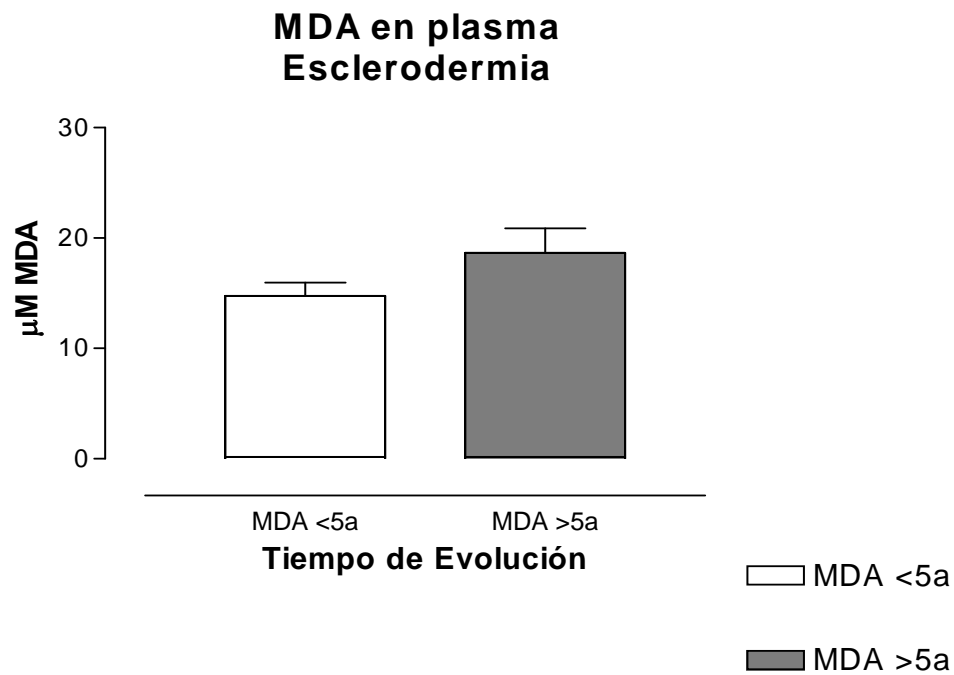


Figura 2. Comparación de los niveles plasmáticos de malondialdehído entre ESD temprana y tardía.

### Capacidad antioxidante total del plasma (CATP):

La media de la CATP en el conjunto de pacientes con esclerosis sistémica fue significativamente menor al compararlo con el grupo control ( $-2.7 \pm 0.96$  unidades vs  $0.64 \pm 0.095$  unidades). No se encontró diferencia significativa entre los pacientes con ESD temprana y tardía, en cuanto a la CATP,  $p= 0.22$  (Tabla 3 y figura 3).

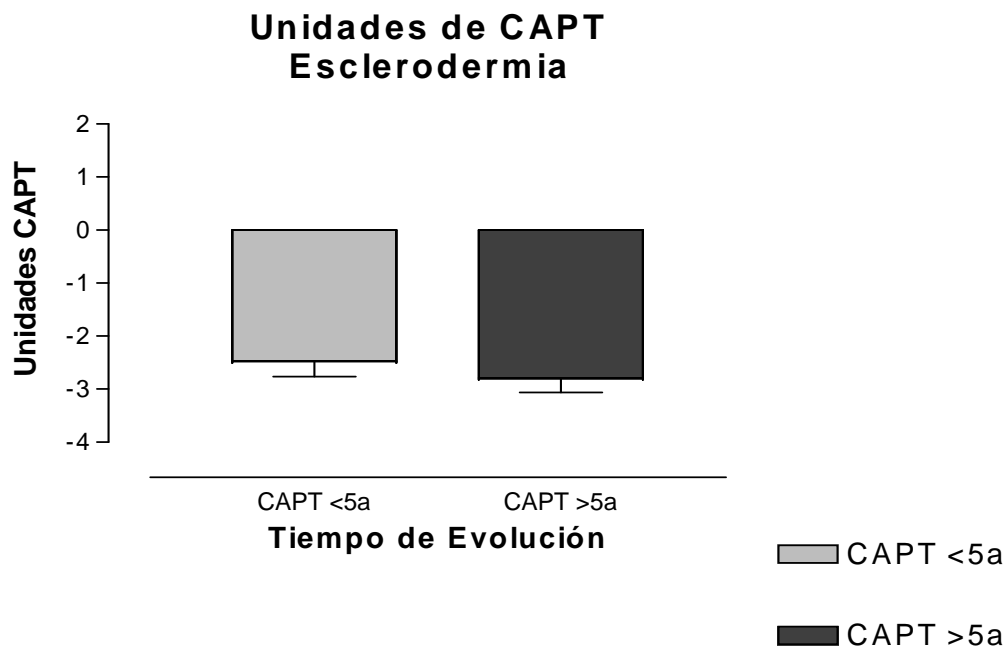


Figura 3. Comparación de la capacidad antioxidante plasmática total entre los pacientes con ESD temprana y tardía.

La media en los niveles plasmáticos de ditirosinas en el total de pacientes con esclerosis sistémica fue significativamente más elevados con respecto al grupo control ( $530.6 \pm 149.7$  pmol/mg proteína vs  $132.76 \pm 48.6$  pmol/mg proteína,  $p < 0.05$ ). No hubo diferencia significativa entre los dos grupos de esclerosis sistémica ( $p = 0.5$ ), (Tabla 3 y figura 4).

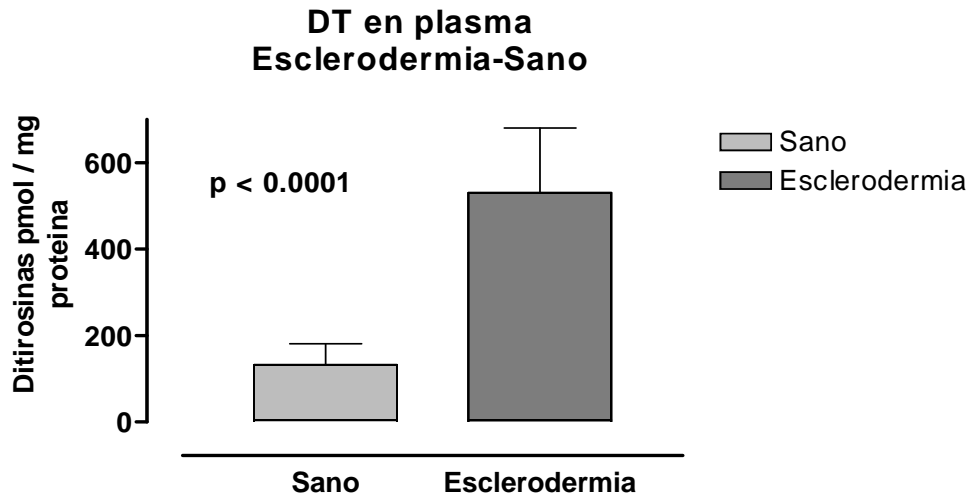


Figura 4. Comparación de niveles plasmáticos de ditirocinas entre pacientes con esclerosis sistémica difusa y el grupo control.

La media de niveles plasmáticos de carbonilos en el total de pacientes con esclerosis sistémica fue significativamente mayor con respecto al grupo control ( $1.75 \pm 0.39$  nmol/mg de proteína vs  $0.68 \pm 0.47$  nmol/mg de proteína,  $p < 0.05$ ). No se encontró diferencia significativa con respecto al tiempo de evolución de la enfermedad ( $p = 0.08$ ), (Tabla 3 y figura 5).

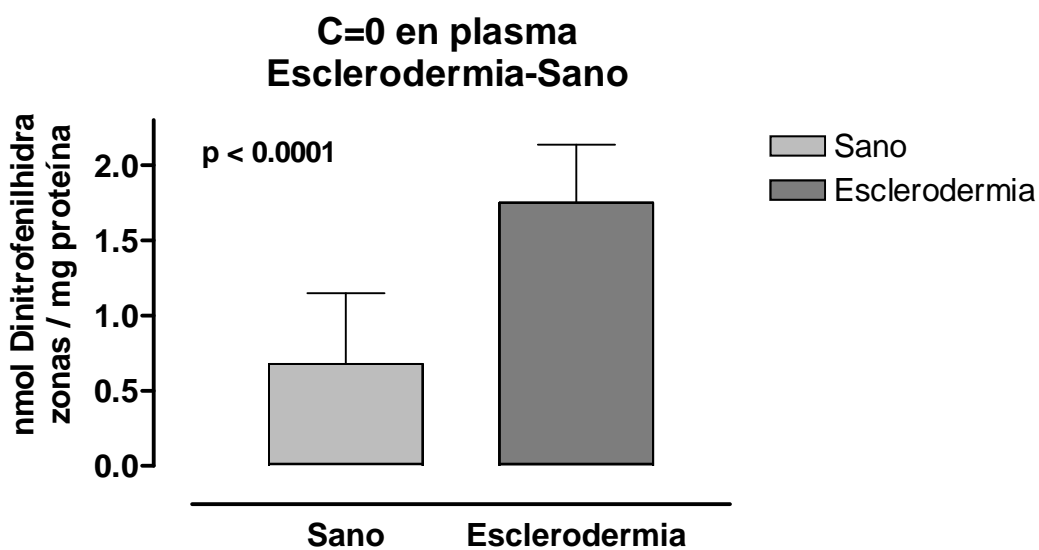


Figura 5. Comparación entre los niveles plasmáticos de carbonilos (C=O) en pacientes con esclerosis sistémica difusa y el grupo control.

La media en los niveles plasmáticos de nitroazul de tetrazolio (NBT), en pacientes con esclerosis sistémica fue significativamente mayor con respecto al grupo control ( $17.2 \pm 3.46$  nmol/mg proteína vs  $10.2 \pm 2.79$  nmol/mg de proteína,  $p < 0.05$ ), No existió diferencia significativa al comparar los dos grupos de pacientes con esclerosis sistémica ( $p = 1.13$ ), (Tabla 3 y figura 6).

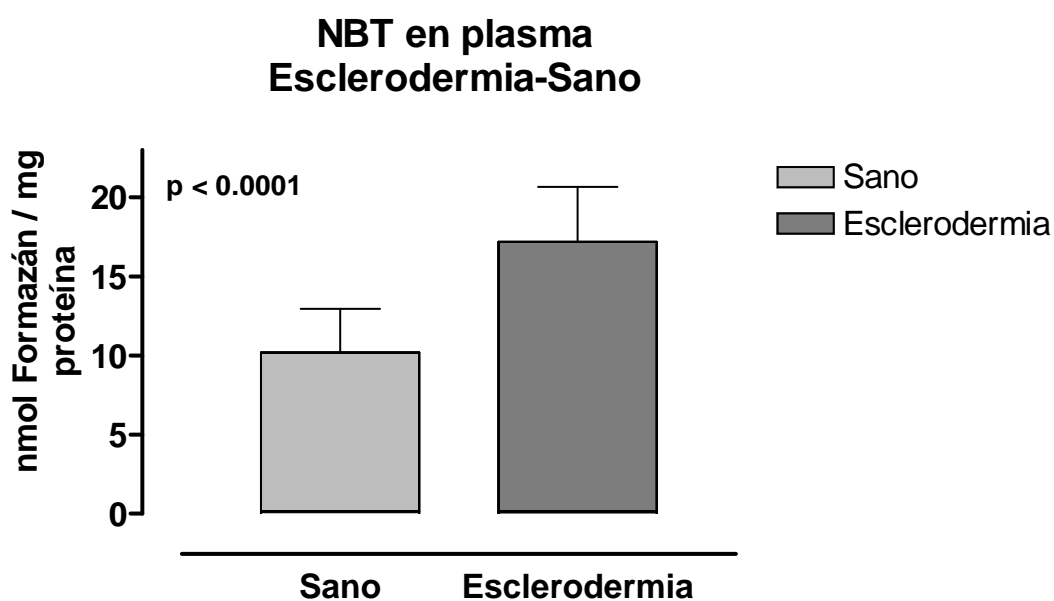


Figura 6. Comparación entre los niveles plasmáticos de nitro azul de tetrazolio (NBT), en pacientes con esclerosis sistémica difusa y el grupo control.

Los niveles plasmáticos elevados de los diferentes marcadores de estrés oxidativo medidos en este estudio, no se correlacionaron con el número total de órganos afectados en los pacientes con esclerosis sistémica difusa (Tabla 4 y figura 7).

**Tabla 4. Marcadores de daño oxidativo por número de órganos afectados.**

# órganos afectados	# pacientes	MDA	CAPT	Ditirosinas	Carbonilos	NBT	p
3	2 (7%)	19.2 ± 10.4	-2.9 ± 0.8	698.6 ± 548	2.3 ± 0.25	13.76 ± 7.4	ns
4	5 (18%)	15.96 ± 3.4	-2.6 ± 0.5	504.3 ± 109	1.7 ± 0.18	17.15 ± 3.8	ns
5	5 (18%)	16.2 ± 3.9	-3.5 ± 1.8	527.8 ± 127	1.7 ± 0.4	16.4 ± 2.9	ns
6	11 (40%)	18.7 ± 12.5	-2.5 ± 0.56	508.7 ± 104	1.7 ± 0.38	17.7 ± 2.8	ns
7	4 (14%)	17.2 ± 2.7	-2.3 ± 0.9	547 ± 77.9	1.6 ± 0.5	17.6 ± 4	ns
8	1 (3%)	14.12	-2.85	513.9	2.1	21.32	ns

No se encontró correlación entre el número total de órganos afectados con los niveles incrementados de los marcadores de estrés oxidativo. MDA, Malondialdehído; CAPT, capacidad antioxidante total del plasma; NBT, nitroazul de tetrazolio

### Correlación entre MDA y órganos afectados

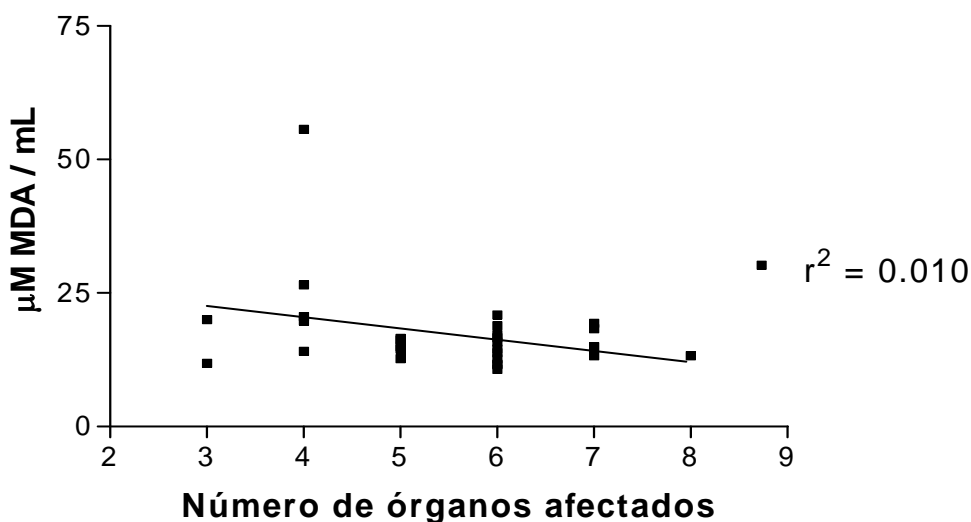


Figura 7. Correlación de los niveles de malondialdehído con el número de órganos afectados en pacientes con esclerosis sistémica difusa.

Tampoco se encontró asociación entre los niveles plasmáticos incrementados de los marcadores de estrés oxidativo en relación con el grado de afección a piel (figura 8), ni con la afección vascular (figura 9).

### Correlación entre Afección a piel y concentración MDA

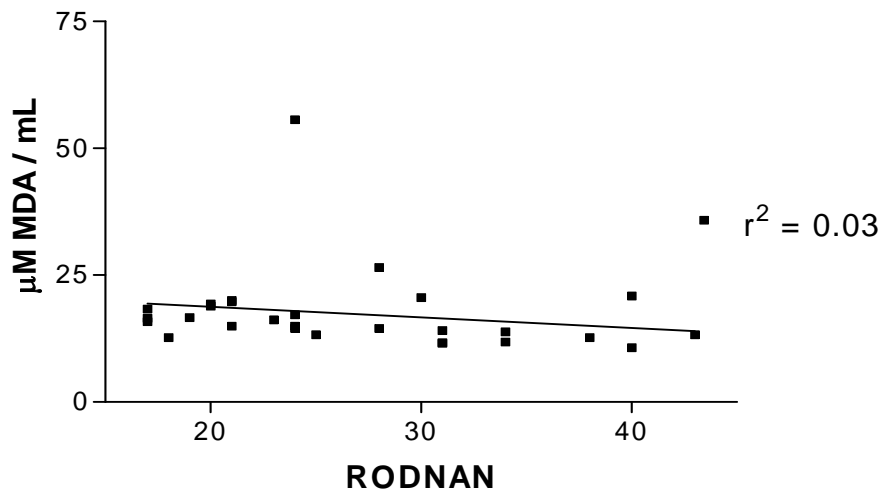


Figura 8. Correlación entre la severidad de la afección a piel y los niveles plasmáticos de malondialdehído.

### RAYNAUD EN ESCLERODERMIA

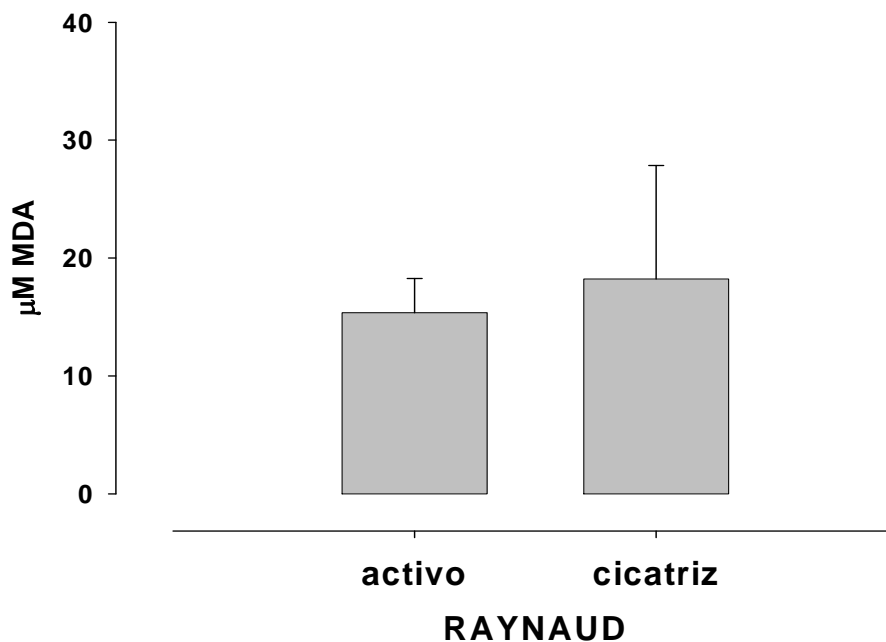


Figura 9. Correlación entre los niveles plasmáticos de malondialdehído y la afección vascular en pacientes con esclerosis sistémica difusa.

## **DISCUSION:**

En el presente estudio apoya la hipótesis de que la lesión vascular secundaria a la producción de radicales libres de oxígeno (RLO), es un evento pivote en la fisiopatología de la enfermedad (9, 17); debido a que se encontraron niveles plasmáticos más altos de marcadores de lipoperoxidación y de biomarcadores de daño proteico, comparado con controles sanos.

La generación de radicales libres en esta enfermedad se asocia principalmente con los fenómenos de isquemia reperfusión secundarios al fenómeno de Raynaud (17, 30), pero en este estudio se demostró que la inflamación (medida por VSG y PCR; las cuales se encontraron elevadas en nuestros pacientes), es por si misma un mecanismo muy importante en la generación de radicales libres de oxígeno (RLO), ya que los niveles plasmáticos de estos permanecieron elevados independientemente del tiempo de evolución de la enfermedad e incluso no se correlacionaron con el grado de afección vascular.

Nuestro estudio comprueba también lo reportado en la literatura (26, 27, 30, 31), ya que encontramos niveles plasmáticos de lipoperoxidación y daño proteico incrementados, pero a diferencia de otros estudios donde se evaluó los niveles de 8-isoprostanos (26) y F2-isoprostanos (27), como marcadores de estrés oxidativo y que encontraron correlación de estos con la afección a pulmonar, vascular renal y el patrón de capilaroscopia, en este estudio no encontramos relación alguna de los biomarcadores de estrés oxidativo medidos con el número total de órganos afectados, ni con el grado de afección para cada órgano en particular.

Un motivo por el que tal vez no encontramos la correlación con el grado de afección pulmonar es que nuestros pacientes presentaban daño pulmonar crónico ya establecido y ninguno de ellos tenía manifestaciones agudas de la enfermedad a este órgano.

Algo importante y que no se había descrito en estudios previos en cuanto a la afección endocrinológica, es que el tiempo de evolución de la enfermedad se relaciona con la presentación de las manifestaciones a este nivel, ya que los pacientes en estadio tardío presentaron más frecuentemente hipotiroidismo, microadenoma hipofisiario, aracnoidocele, osteoporosis e hiperprolactinemia, en comparación con el estadio temprano de la enfermedad donde solo se encontró en un paciente hipotiroidismo y microadenoma hipofisiario, siendo esta diferencia significativa; por tal motivo debemos vigilar periódicamente la función endocrinológica que incluya densidad mineral ósea, en todos los pacientes con esclerosis sistémica difusa, haciendo énfasis en aquellos que se encuentran en el estadio tardío de la enfermedad, con el propósito de ofrecerles una mejor calidad de vida.

La etiopatogenia de la esclerosis sistémica continúa siendo desconocida (9, 10), pero el papel que juega el estrés oxidativo en la fisiopatología de esta enfermedad ha quedado demostrado en este y otros estudios publicados (26, 27, 30, 31), por tal motivo, se deben realizar investigaciones encaminadas a evaluar el efecto de tratamientos con antioxidantes en los diferentes estadios de la enfermedad para tratar de minimizar el efecto nocivo de los RLO a las moléculas de importancia biológica y que se traduce clínicamente en la esclerosis sistémica como fibrosis y disfunción orgánica.



## **CONCLUSIONES:**

1. El estrés oxidativo se encontró significativamente incrementado en el plasma de pacientes mexicanos con esclerosis sistémica difusa al compararlo con un grupo control.
2. El estrés oxidativo fue similar en los pacientes con esclerosis sistémica difusa temprana en comparación con la tardía.
3. El estrés oxidativo se encontró mas elevado en pacientes con esclerosis sistémica tardía en comparación con el grupo control.
4. No existió correlación entre el estrés oxidativo y el número de órganos afectados en pacientes con esclerosis sistémica difusa.
5. No se encontró correlación de los niveles plasmáticos de estrés oxidativo y la afección de algún órgano en particular en pacientes con esclerosis sistémica.

## **BIBLIOGRAFIA:**

- 1.- Halliwell B, Gutteridge J, Oxygen Toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
- 2.- Olivares I, Guzmán A. Especies reactivas del oxígeno (ERO): bioquímica inorgánica y biomedicina. En: Hicks J, editor. *Bioquímica*. Distrito Federal, México: Interamericana McGraw-Hill; 2006. p. 689-708.
- 3.- Ahsan H, Ali R, Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 2003; 131:398-404.
- 4.- Machlin LJ, Bendich A, Free radical tissue-damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1:441-445.
- 5.- Janssen YM, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993; 69(3):261-274.
- 6.- Lledías F, Hansberg W, Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol* 2000; 319:110-119.
- 7.- Opara E, Oxidative Stress. *Dis Mon* 2006; 52: 183-198.
- 8.- Ames B, Shigenaga M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-7922.
- 9.- Jiménez S, Der. C, Following the molecular pathways an Understanding of the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Ann Intern Med* 2004; 140:37-50.
- 10.- Jiménez S, Aguiló S, Delgado G, Esclerosis sistémica: *Medicine* 2005; 9: 1953-1964.
- 11.- Wollheim F, Classification of systemic sclerosis. Vision and reality, *Rheumatology* 2005; 44:1212-1216.
- 12.- Medsger T, Natural history of systemic sclerosis and the assessment of disease activity, severity, functional status, and psychologic well-being, *Rheum Dis Clin N Am* 2003; 29: 255-273.
- 13.- Steen V, Medsger T, The palpable tendon friction rub: an important physical examination finding in patients with systemic sclerosis, *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1146-1151.
- 14.- Vera O, Esclerosis sistémica y tracto gastrointestinal. Abordaje diagnóstico y terapéutico, *Reum Clin*. 2006; 2 Supl 3: S24-30.
- 15.- Steen V, Medsger T, Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2437-2444.

- 16.- Carwile E, Systemic Sclerosis A vascular Perspective. *Rheum Dis Clin N Am* 1996 ; 22 (4): 675-694.
- 17.- Simonini G, Pignone A, Generini S, Falcini F, Matucci Cerinic M, Emerging potentials for an antioxidant therapy as a new approach to the treatment of systemic sclerosis. *Toxicology* 2000; (155): 1-15.
- 18.- Murrel D, A radical proposal for pathogenesis of scleroderma. *J. Am Acad. Dermatol* 1993; (28): 78-85.
- 19.- Plane F, Jacobs M, Mcmanus D, Bruckdorfer K, Probuocol and other antioxidants prevent the inhibition of endothelium-dependent relaxation by low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1993; 103: 73-79.
- 20.- Sambo P, Jannino L, Candela M. Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J Invest Dermatol.* 1999: 112; 78-84.
- 21.- Sambo P, Baroni S, Luchetti M. Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:2653-2664.
- 22.- Granger D, Holloerth M, Parks D, Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 1986; 548: 47-63.
- 23.- Nedeljkovic Z, Gokce N, Loscalzo J, Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction, *Postgrad Med J* 2003; 79: 195-200.
- 24.- Shingu M, Yoshioka K, Nobunaga M, Human vascular smooth muscle cells and endothelial cells lack catalase activity and are susceptible to hydrogen peroxide. *Inflammation* 1985; 9: 309-320.
- 25.- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 15S-25S.
- 26.- Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Hasegawa M, Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis, *Rheumatology* 2006; 45: 815-818.
- 27.- Volpe A, Biasi D, Caramaschi P, Montavani W, Bambara L, Levels of F2-isoprostane in systemic sclerosis: correlation with clinic features, *Rheumatology* 2006; 45: 314-320.
- 28.- Adachi J, Matsushita S, Yoshioka N, Plasma phosphatidylcholine hydroperoxide as a new marker of oxidative stress in alcoholic patients. *J Lipid Res* 2004; 45: 967-971.

29.- Torres Y, Sierra M, Olivares I, Hicks J. Marcadores plasmáticos de estrés oxidante en población mexicana sana de 31 a 60 años de edad. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2006; 19 (3): 206-213.

30.- Simonini G, Matucci M, Generini S, Zoppi M, Anichini M, et al. Oxidative Stress in Systemic Sclerosis. *Mol and Cell Bioch.* 1999; 196: 85-91.

31.- Allanore Y, Borderie D, Lemaréchal H, Garabed O, Kahan A. Acute Sustained Effects of Dihydropyridine-Type Calcium Channel Antagonists on Oxidative Stress in Systemic Sclerosis. *Am J Med* 2004; 116:595-600.

32. - Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 1998; 108: 101-106.

## ANEXOS

### Anexo 1

#### Carta de Consentimiento Informado.



#### INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACION CLINICA.

Lugar y Fecha: México DF. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2008.

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado: **“ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA DE PACIENTES MEXICANOS CON ESCLEROSIS SISTEMICA DIFUSA”**.

Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:

El objetivo del estudio es: determinar el estrés oxidativo en plasma de pacientes mexicanos con esclerosis sistémica difusa y compararlo con un grupo control.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: permitir que se me realice interrogatorio y exploración física, se me tomó en una sola ocasión 2 mililitros de sangre por venopunción periférica para determinar como se encuentran los niveles de estrés oxidativo en mi sangre.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: dolor secundario a la venopunción y riesgo de posible formación de hematoma en el sitio puncionado. El beneficio obtenido por participar en esta investigación será que si se concluyen resultados favorables para la investigación se podría iniciar en un futuro tratamiento que me disminuya el estrés oxidativo y las complicaciones crónicas de esta enfermedad.

El investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán acabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que reservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

\_\_\_\_\_  
**Nombre, firma y dirección del paciente**

**Dra. Maria del Pilar Cruz Dominguez. Matricula 8826013**

\_\_\_\_\_  
**Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable**

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dr. Marco Antonio Silva Medina, teléfono 5537172792 y Dra. Maria del Pilar Cruz Domínguez, teléfono 55375889 y 5523390769.

Testigos:

\_\_\_\_\_  
Nombre, firma, dirección y teléfono

\_\_\_\_\_  
Nombre, firma, dirección y teléfono

**Anexo 2. Hoja de captura de datos para pacientes con esclerosis sistémica difusa, donde se registrara la afección a órganos, sistemas y niveles de estrés oxidativo en plasma.**

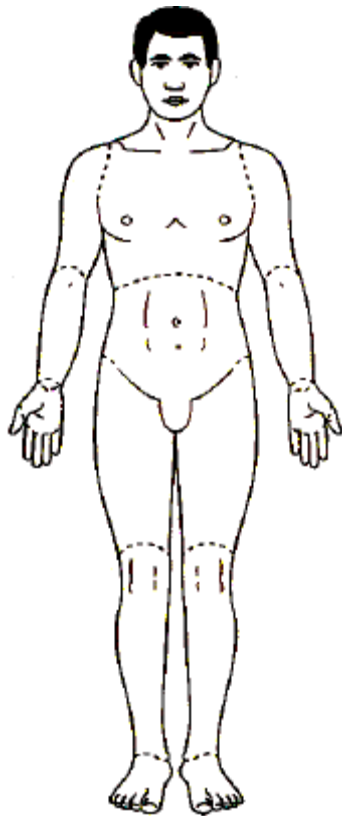
1) Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Afiliación: \_\_\_\_\_

2) Dirección: \_\_\_\_\_

3) Edad en años \_\_\_\_\_ 4) Sexo: M F 5) Teléfono: \_\_\_\_\_

6) Tiempo de diagnostico de la enfermedad: \_\_\_\_\_ Meses.

**ESCALA DE RODNAN PARA DESCRIBIR LA AFECCION CUTANEA**  
 Piel Normal = 0, Piel con afección leve (dificultad leve para pellizcar) = 1, Piel con afección Moderada (se pellizca con mucha dificultad)= 2, y Piel con afección severa (imposible pellizcar)= 3.



<b>CARA</b>	
<b>CUELLO</b>	
<b>TORAX ANTERIOR</b>	
<b>ABDOMEN</b>	
<b>ESPALDA ALTA</b>	
<b>ESPALDA BAJA</b>	
<b>PUNTUACION TOTAL</b>	
<b>PUNTUACION MAXIMA</b>	

	<b>DERECHO</b>	<b>IZQUIERDO</b>
<b>BRAZO</b>		
<b>ANTEBRAZO</b>		
<b>MANO</b>		
<b>DEDOS DE MANO</b>		
<b>MUSLO</b>		
<b>PIERNA</b>		
<b>PIE</b>		
<b>PUNTUACION TOTAL</b>		

**PUNTUACION TOTAL SUMA** \_\_\_\_\_

## ORGANOS AFECTADOS

**I) Afección a piel:** puntuación cutánea modificada de Rodnan: \_\_\_\_\_  
Piel normal \_\_\_\_\_ Afección leve \_\_\_\_\_ Afección moderada \_\_\_\_\_ Afección severa \_\_\_\_\_

**II) Afección vascular:** Fenómeno de Raynaud activo \_\_\_\_\_ Inactivo \_\_\_\_\_ Ausente \_\_\_\_\_

**III) Afección a tendones:** (Articulaciones: manos, muñecas, codos, rodillas o tobillos)

Ausente de sintomatología: \_\_\_\_\_ Presencia de fricción \_\_\_\_\_ Contractura en flexión \_\_\_\_\_

**IV) Muscular:** Presente \_\_\_\_\_ Ausente \_\_\_\_\_

a) Debilidad proximal: SI o NO b) nivel de CK: \_\_\_\_\_

**V) Aparato digestivo:** Presente \_\_\_\_\_ Ausente \_\_\_\_\_

a) Sintomatología: disfagia, pirosis, saciedad temprana, dolor epigástrico, vómito, diarrea, constipación, distensión: SI o NO.

b) Reporte de auxiliares de diagnóstico: serie esófago gastroduodenal, endoscopias de aparato digestivo alto, colonoscopia o rectosigmoidoscopia, manométrica, USG hígado y vías biliares, PFH o Biopsias:

**VI) Pulmón:** Presente \_\_\_\_\_ Ausente \_\_\_\_\_

a) cuadro clínico; disnea, tos, estertores crepitantes, dolor pleurítico: SI o NO

b) Reporte de auxiliares de diagnóstico: radiografía de tórax, pruebas de función respiratoria, tomografía pulmonar de alta resolución, ecocardiograma transtorácico:

Tipo de Afección: \_\_\_\_\_

**VII) Corazón:** Presente \_\_\_\_\_ Ausente \_\_\_\_\_

a) Cuadro clínico Palpitaciones, dolor precordial, vértigo, síncope, edema, congestión venosa: SI o NO

b) Reporte de auxiliares de diagnóstico: Electrocardiograma, ecocardiograma transtorácico:

Tipo de afección: \_\_\_\_\_

**VIII) RENAL:** Presente \_\_\_\_\_ Ausente \_\_\_\_\_

a) Presión arterial: \_\_\_\_\_ b) Creatinina sérica: \_\_\_\_\_ c) Urea \_\_\_\_\_ d) BUN \_\_\_\_\_

e) Depuración de creatinina en orina de 24 hrs: \_\_\_\_\_ f) Albúmina en orina de 24 hrs: \_\_\_\_\_

**IX) Endocrinológico:** Presente \_\_\_\_\_ Ausente \_\_\_\_\_

a) Reporte de perfiles hormonales:

b) Reporte de TC de silla turca:

Tipo de afección: \_\_\_\_\_

**X) Niveles plasmáticos de estrés oxidativo:**

Nombre y firma de quien captura: \_\_\_\_\_

Fecha que se capturo: \_\_\_\_\_



**Anexo 3. Hoja de Recolección de datos de control sano, donde se registrará los niveles de estrés oxidativo en plasma, edad y género.**

1) Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Afiliación: \_\_\_\_\_

2) Dirección:

\_\_\_\_\_

3) Edad en años \_\_\_\_\_ 4) Sexo: M F 5) Teléfono: \_\_\_\_\_

6) Negatividad para factores que incrementen el estrés oxidativo: SI o NO\*

Este control se encuentra pareado con el paciente número \_\_\_\_\_ de esclerosis sistémica difusa.

\* Nota: Pacientes con factores que incrementan el estrés oxidativo como: tabaquismo, diabetes, hipertensión, dislipidemias, enfermedades infecciosas o agudas, serán excluidos del estudio.

Nombre y firma de quien captura: \_\_\_\_\_

Fecha que se capturo: \_\_\_\_\_