



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
U. M. A. E. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
DR. BERNARDO SEPULVEDA G.
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

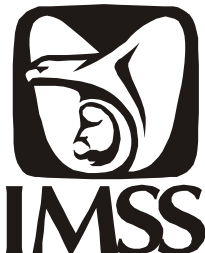
ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ARTERITIS DE TAKAYASU

TESIS

PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO EN LA
ESPECIALIDAD DE:
REUMATOLOGÍA

PRESENTA:
DR. ARTURO VILLARREAL ORTEGA

ASESORES DE TESIS:
DR. MIGUEL ANGEL VÁZQUEZ ZARAGOZA
DR. ADOLFO CAMARGO CORONEL
DRA. LEONOR ADRIANA BARILE FABRIS



MÉXICO, D. F. FEBRERO DEL 2011



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.

Dra. Diana G. Menez Díaz
JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION EN SALUD
U.M.A.E HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

Dra. Leonor A. Barile Fabris
JEFE DEL SERVICIO DE REUMATOLOGIA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE REUMATOLOGIA
U.M.A.E HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Dr. Miguel Angel Vázquez Zaragoza
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE REUMATOLOGIA
U.M.A.E HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

Dr. Adolfo Camargo Coronel
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE REUMATOLOGIA
U.M.A.E HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Protocolo en salud presentado, cuyo título es:

Estrés oxidativo en la arteritis de Takayasu

No. De Registro
F-2010-3601-70



IMSS

REGISTRO NACIONAL DE TESIS DE ESPECIALIDAD

Delegación: 3 SUROESTE

Unidad de Adscripción: UMAE CMN Siglo XXI

Autor

Apellido:

Paterno: Villarreal

Materno: Ortega

Nombre: Arturo

Matricula: 99205767

Especialidad: Reumatología

Fecha de Graduación: 28/02/2012

Número de Registro: F-2010-3601-70

Título de la Tesis:

Estrés oxidativo en Arteritis de Takayasu.

Resumen:

La arteritis de Takayasu (AT) es una vasculitis granulomatosa de etiología desconocida, la cual afecta a la aorta, arterias pulmonares y sus ramas principales. La patogénesis de la arteritis Takayasu es poco conocida. Se sabe que existe daño al endotelio vascular, caracterizado por inflamación granulomatosa con presencia de células gigantes en la capa media (9).

Anteriormente al endotelio vascular era considerado un recubrimiento pasivo para los vasos sanguíneos; actualmente es reconocido como factor determinante para la salud vascular (16). El estrés oxidativo se define como la perturbación entre el balance oxidante y antioxidante, a favor del primero que conduce a un daño potencial del endotelio (18). La peroxidación lipídica altera las funciones de las membranas celulares, generando al mismo tiempo un estado inflamatorio, el producto de esta peroxidación de lípidos es el malondialdehído (37).

El objetivo primario será demostrar la presencia de malondialdehído y alteraciones en la concentración de óxido nítrico en los pacientes con arteritis de Takayasu.

El objetivo secundario es asociar la presencia de óxido nítrico y malondialdehído con actividad de AT.

Los pacientes con AT se reclutaron de la clínica de Takayasu del hospital de especialidades centro médico nacional siglo XXI en el periodo correspondiente a mayo-octubre 2009. Los pacientes cumplen con los criterios de clasificación del American College of Rheumatology (ACR) de 1990 para arteritis de Takayasu. Se determinó edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad y tratamiento actual; además se evaluó la actividad de la enfermedad en base a los criterios de Kerr del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos (26), clasificando a los pacientes como activos y no activos. El resultado del suero de estos pacientes se comparó con el suero de pacientes sanos obtenidos del banco de sangre del centro médico nacional siglo XXI.

Se seleccionaron 21 pacientes consecutivos con diagnóstico de arteritis de Takayasu (19 mujeres y 2 hombres). Los pacientes incluidos tenían una edad mayor a 18 años; la edad media fue 41.52 (± 14.19) años, con una media de evolución en el diagnóstico en años de 13.46 (± 9.3), nueve se encontraban activos y once inactivos. Se determinó malondialdehído y óxido nítrico en pacientes con arteritis de Takayasu y se comparó contra los controles sanos, el análisis se realizó con T de Student con una diferencia estadística significativa de $p \leq 0.001$ para el grupo de malondialdehído y óxido nítrico.

En nuestro estudio se encontró elevación de malondialdehído estadísticamente significativa en los pacientes con AT versus controles; esta alteración conlleva un papel importante en la inflamación endotelial y un riesgo elevado de presentar complicaciones asociadas como la formación de placa ateromatosa; así mismo la disminución del óxido nítrico en los pacientes con AT frente a controles nos muestra la existencia de disfunción endotelial la cual puede ser consecuencia de las zonas de estenosis arterial presente en estos pacientes.

Palabras claves:

1) Arteritis de Takayasu. 2) Óxido nítrico 3) Malondialdehído 4) Criterios de actividad de Kerr 5) Estrés oxidativo,

Tipo de Investigación:

Tipo de diseño:

Tipo de Estudio:

1. Datos del alumno	
Apellido paterno	Villarreal
Apellido Materno	Ortega
Nombre	Arturo
Teléfono	5518999115
Universidad	Universidad Autónoma de México
Facultad o escuela	Facultad de Medicina
No. De cuenta	509221975
2. Datos de Asesor	
Apellido paterno	Barile
Apellido Materno	Fabris
Nombre (s)	Leonor Adriana
	Vázquez
	Zaragoza
	Miguel Angel
	Camargo
	Coronel
	Adolfo
3. Datos de tesis	
Título	Estrés oxidativo en arteritis de Takayasu
No de paginas	42 paginas
Año	2011

Agradecimientos:

A mi Madre y mi Padre.

A mi Familia.

***A mis maestros; los médicos del servicio de
Reumatología.***

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	4
MATERIALES Y METODOS	11
RESULTADOS.....	20
CONCLUSIONES.....	25
DISCUSION.....	26
ANEXO	29
REFERENCIAS.....	32

RESUMEN

Introducción:

La arteritis de Takayasu (AT) es una vasculitis granulomatosa de etiología desconocida, la cual afecta a la aorta, arterias pulmonares y sus ramas principales. La patogénesis de la arteritis Takayasu es poco conocida. Se sabe que existe daño al endotelio vascular, caracterizado por inflamación granulomatosa con presencia de células gigantes en la capa media (9). La inflamación constante de la pared arterial puede progresar guiado hasta la capa íntima y adventicia comprometiendo la luz vascular.

Anteriormente al endotelio vascular era considerado un recubrimiento pasivo para los vasos sanguíneos; actualmente es reconocido como factor determinante para la salud vascular (16). El estrés oxidativo se define como la perturbación entre el balance oxidante y antioxidante, a favor del primero que conduce a un daño potencial del endotelio (18). El término disfunción endotelial se refiere a una disminución de la capacidad correcta del endotelio para mantener la homeostasis vascular; aunque el término se utiliza a menudo para referirse a la pérdida de la biodisponibilidad del óxido nítrico (17). La peroxidación lipídica altera las funciones de las membranas celulares, generando al mismo tiempo un estado inflamatorio, el producto de esta peroxidación de lípidos es el malondialdehído (37).

Objetivo:

El objetivo primario será demostrar la presencia de malondialdehído y alteraciones en la concentración de óxido nítrico en los pacientes con arteritis de Takayasu.

El objetivo secundario es asociar la presencia de óxido nítrico y malondialdehído con actividad de AT.

Materiales y métodos:

Los pacientes con AT se reclutaron de la clínica de Takayasu del hospital de especialidades centro médico nacional siglo XXI en el periodo correspondiente a mayo-octubre 2009. Los pacientes cumplen con los criterios de clasificación del American College of Rheumatology (ACR) de 1990 para arteritis de Takayasu. Se determinó edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad y tratamiento actual; además se evaluó la actividad de la enfermedad en base a los criterios de Kerr del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos (26), clasificando a los pacientes como activos y no activos. El resultado del suero de estos pacientes se comparó con el suero de pacientes sanos obtenidos del banco de sangre del centro médico nacional siglo XXI.

Resultados:

Se seleccionaron 21 pacientes consecutivos con diagnóstico de arteritis de Takayasu (19 mujeres y 2 hombres). Los pacientes incluidos tenían una edad mayor a 18 años; la edad media fue 41.52 (± 14.19) años, con una media de evolución en el diagnóstico en años de 13.46 (± 9.3), nueve se encontraban activos y once inactivos. Se determinó malondialdehído y óxido nítrico en pacientes con arteritis de Takayasu y se comparó contra los controles sanos, el análisis se realizó con T de Student con una diferencia estadística significativa de $p \leq 0.001$ para el grupo de malondialdehído y óxido nítrico.

Conclusión:

La presencia elevada de malondialdehído en los pacientes con arteritis de Takayasu versus controles, habla de el proceso inflamatorio endotelial al cual se encuentran sujetos este grupo de pacientes independientemente de la clasificación clínica de la enfermedad. Pudiera existir una progresión subclínica de la enfermedad asociada los niveles elevados

de esta molécula. La determinación de esta molécula se podría tomar en cuenta para futuros estudios para evaluar su trascendencia en esta patología.

La disminuida consistentemente de óxido nítrico en los pacientes con AT es de etiología multifactorial, y no habla de la disfunción endotelial a la cual se encuentra en este grupo de pacientes.

Discusión:

La hipótesis de nuestro estudio se basa en que el daño al endotelio se manifiesta por la presencia de malondialdehído y cursa con disminución en la producción de óxido nítrico.

En nuestro estudio se encontró elevación de malondialdehído estadísticamente significativo en los pacientes con AT versus controles; esta alteración conlleva un papel importante en la inflamación endotelial y un riesgo elevado de presentar complicaciones asociadas como la formación de placa ateromatosa; así mismo la disminución del óxido nítrico en los pacientes con AT frente a controles nos muestra la existencia de disfunción endotelial la cual puede ser consecuencia de las zonas de estenosis arterial presente en estos pacientes.

Este estudio es útil pues nos da una perspectiva de un mecanismo de daño endotelial presente en esta enfermedad, que no se logra establecer una diferencia en pacientes activos y no activos con la AT, tal vez con un estudio de mayor número de casos y un seguimiento en la evolución del paciente con nuevas determinaciones en momentos claves de la enfermedad ampliaría el panorama y comprenderíamos mejor esta asociación

INTRODUCCION.

La arteritis de Takayasu (AT) es una vasculitis granulomatosa de etiología desconocida, la cual afecta a la aorta, arterias pulmonares y sus ramas principales. La primera descripción de esta enfermedad posiblemente data entre 1700 y 1800 donde existen algunos reportes de pacientes sin pulso y con enfermedad aortica (1). El termino de arteritis de Takayasu fue utilizado por primera vez en 1952 por Caccamise and Whitman (2). Esta enfermedad tiene una distribución mundial con mayor prevalencia en Asia (3-5); donde existen estudios japoneses que demuestran el predominio en el sexo femenino 9:1 (6). En Japón se estiman una incidencia de 150 casos nuevos por año (7); mientras que estudios realizados en Norte América, (Minnesota) se demostró una incidencia de 2.6 casos por millón (8).

La patogénesis de la arteritis Takayasu es poco conocida. Se sabe que existe daño al endotelio vascular, caracterizado por inflamación granulomatosa con presencia de células gigantes en la capa media (9). La inflamación constante de la pared arterial puede progresar guiado hasta la capa íntima y adventicia comprometiendo la luz vascular. Esta destrucción de la capa intima y media también puede conducir a una dilatación aneurismática del vaso afectado.

En el examen histopatológico del tejido aórtico de pacientes con AT se ha demostrado infiltración celular principalmente por linfocitos T gamma delta (10), estas células pueden causar lesión vascular por liberación de grandes cantidades de perforina citolítica; además de células natural killer, macrófagos y células T helper (11).

En la adventicia también se localizan células inflamatorias junto con miembros de la familia de genes RANTES (regulación en la activación, células T expresadas y secretadas) (12); donde existe la posibilidad de que puedan producir múltiples quimiocinas activas,

Existen estudios in vitro que indican que algunas citocinas como la interleucina 1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón-gamma inducen la expresión de moléculas de adhesión celular como VCAM o molécula de adhesión celular 1 (ICAM) en las células endoteliales y musculo liso (13-14).

Por otra parte la elastina es un componente de las fibras elásticas, que es sintetizada por las células del musculo liso y que constituyen una estructura importante para la integridad de muchos tejidos. Dentro de la fisiopatología de la artritis de takayasu se ha vinculado la producción de ciertas metaloproteasas en la degradación de la elastina; teniendo como hipótesis de que el subtipo 2 de estas metaloproteasas sean útiles para el diagnostico, y los subtipos 3 y 9 funcionen como marcadores de actividad. (15).

Anteriormente al endotelio vascular era considerado un recubrimiento pasivo para los vasos sanguíneos; actualmente es reconocido como factor determinante para la salud vascular (16). El termino disfunción endotelial se refiere a una disminución de la capacidad correcta del endotelio para mantener la homeostasis vascular; aunque el termino se utiliza a menudo para referirse al la perdida de la biodisponibilidad del oxido nítrico (17). El incremento del estrés oxidativo en el sistema vascular es otro mecanismo importante de disfunción endotelial.

El estrés oxidativo se define como la perturbación entre el balance oxidante y antioxidante, a favor del primero que conduce a un daño potencial (18). Los radicales libres y otras especies reactivas se encuentran en constante producción in vivo por todos los tejidos del cuerpo, principalmente durante la fosforilación oxidativa en la matriz mitocondrial (19).

En circunstancias normales, las especies reactivas de oxigeno (ERO) son eliminadas por defensas celulares enzimáticas y no enzimáticas. Si las ERO no son eliminadas adecuadamente pueden causar daño oxidativo celular, tales como la peroxidación de

lípidos (membranas y organelos), proteínas y DNA (20). El resultado de la peroxidación de lípidos inactiva el óxido nítrico y disminuye la adecuada respuesta de los tejidos diana (16). Uno de estos productos finales de la peroxidación de los lípidos es el malondialdehído. (21).

Numerosos estudios han relacionado la disfunción endotelial y consiguiente aterosclerosis con la resistencia a la insulina y diabetes mellitus (29-32)

En nuestro conocimiento no existe un marcador serológico de actividad de la enfermedad con adecuada especificidad para el seguimiento de la misma. Los niveles de óxido nítrico y malondialdehído podrían encontrarse presentes en pacientes con AT como reflejo de disfunción endotelial y podrían ser útiles como marcadores de actividad de la enfermedad.

JUSTIFICACION.

La arteritis de Takayasu es una enfermedad de etiología desconocida, en donde actualmente se desconoce si el daño endotelial presente en esta enfermedad se puede asociar a la presencia de malondialdehído y disminución de oxido nítrico; y a su vez que estos se asocien con la actividad de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe evidencia de la participación del endotelio en los padecimientos vasculares inflamatorios como la arteritis de Takayasu, sin embargo no se ha demostrado a través de moléculas de inflamación o de moléculas derivadas del estrés oxidativo esta hipótesis; de demostrarse podríamos identificar a alguna de estas moléculas como un marcador de actividad de la enfermedad. Por lo tanto las preguntas derivadas y en secuencia podrían ser:

¿Se encuentran presentes el óxido nítrico y malondialdehído en pacientes con arteritis de Takayasu?

¿Su presencia se podría asociar con la escala de actividad de la enfermedad?

HIPOTESIS

¿Se encuentra presente el malondialdehído en la arteritis de Takayasu?

¿La arteritis de Takayasu estará asociada a alteraciones en el oxido nítrico?

OBJETIVOS:

El objetivo primario será demostrar la presencia de malondialdehído y alteraciones en la concentración de oxido nítrico en los pacientes con arteritis de Takayasu.

El objetivo secundario es asociar la presencia de oxido nítrico y malondialdehído con actividad de AT.

MATERIALES Y METODOS

Los pacientes con AT se reclutaron de la clínica de Takayasu del hospital de especialidades centro médico nacional siglo XXI en el periodo correspondiente a mayo-octubre 2009. Los pacientes cumplen con los criterios de clasificación del american college of rheumatology (ACR) de 1990 para arteritis de Takayasu. Se determinó edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad y tratamiento actual; además se evaluó la actividad de la enfermedad en base a los criterios de Kerr del instituto nacional de salud (NIH) de los Estados Unidos (26), clasificando a los pacientes como activos y no activos. El resultado del suero de estos pacientes se comparó contra el suero de pacientes sanos obtenidos del banco de sangre del centro médico nacional siglo XXI.

La muestra de sangre venosa de los pacientes con AT se obtuvo del sobrante utilizado en la muestra para los estudios de laboratorio de la consulta subsecuente; la muestra de sangre de los pacientes control se obtuvo del banco de sangre. Se colocó la sangre en un tubo estéril con EDTA, se separó el plasma del suero y se congeló a -80 grados centígrados. Se determinó malondialdehído y óxido nítrico en el laboratorio de investigación del centro médico nacional siglo XXI para los pacientes con arteritis de Takayasu y los controles. La curva de calibración para la determinación de óxido nítrico, se basó en la determinación de nitritos de acuerdo al procedimiento de Griess y los resultados se reportaron en $\mu\text{M/L}$ (23). En este caso todos los reactivos se adquirieron de la marca Sigma. Para la determinación de malondialdehído se empleó el método de incubación con TBARS con algunas modificaciones y basado en el propuesto por Mihara et al. y los resultados se reportaron en $\mu\text{M/L}$ (24).

DISEÑO:

Transversal, descriptivo, analítico.

Análisis: T de Student

Se utilizó el programa de análisis estadístico (software) Prima V. 4.0 de InStat Graphics, San Diego CA, EUA

UNIVERSO DE TRABAJO

Pacientes con diagnóstico de Arteritis de Takayasu del hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se empleó una muestra por conveniencia.

CRITERIOS DE INCLUSION

Los pacientes deben cumplir con los criterios de clasificación para arteritis de Takayasu del ACR de 1990.

Pacientes que hayan firmado la hoja de consentimiento informado.

CRITERIOS DE NO INCLUSION

Pacientes que rechacen firmar consentimiento informado.

Variables

Independiente: arteritis de Takayasu, género, edad, origen, evolución

Dependiente o de desenlace: Óxido nítrico, malondialdehído.

DEFINICION OPERATIVA DE VARIABLES

La arteritis de Takayasu es una vasculitis crónica que afecta la aorta y sus ramas principales. La enfermedad se define según los criterios de clasificación del American College of Rheumatology de 1990, los cuales son: edad de inicio de la enfermedad menor o igual a 40 años, claudicación de las extremidades (desarrollo y empeoramiento de la fatiga y malestar en los músculos de una o más extremidades mientras se están usando, especialmente las extremidades superiores), reducción de pulso arterial braquial (reducción de pulsación en una o en ambas arterias braquiales), diferencia de la presión arterial mayor a 10 mmHg (diferencia de 10 mmHg de presión arterial en ambas arterias braquiales), soplo sobre arteria subclavia o aortica (sonido audible en la auscultación sobre una o ambas arterias subclavas o la aorta abdominal), anomalías arteriográficas (estrechamiento, aneurisma u oclusión de toda la aorta, sus ramas primarias o las arterias grandes en las extremidades proximales superiores e inferiores no debidas a arterioesclerosis, displasia fibromuscular o causas similares, usualmente cambios focales o segmentales) (25).

La enfermedad activa se definió de manera arbitraria en conformidad con los criterios de Kerr (26), como nueva aparición o empeoramiento de al menos dos de las siguientes cuatro características: I características sistémicas, sin otra explicación (fiebre, malestar general, pérdida de peso, sudores nocturnos, dolores musculares, dolor de articulaciones), II elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG), III isquemia vascular o inflamación (claudicación, pulso disminuido, soplos, dolor vascular, asimetría en la lectura de presión arterial de los miembros), IV hallazgos angiográficos con estenosis arterial. La puntuación de la actividad es la suma de los 4 parámetros. Interpretación: puntaje mínimo de actividad 0, puntaje máximo de actividad es 4. Se considera actividad con un puntaje igual o mayor a 2.

Para la remisión se considero uno o ambos de los siguientes criterios: I reducción completa de las características clínicas, II estabilización de los hallazgos con lesiones vasculares fijas. Remisión parcial se considero con uno o dos de los siguientes criterios: I reducción en los síntomas clínicos, II mejoría en el estado clínico en ausencia de remisión completa (26).

Oxido nítrico (ON) es producido por diferentes tipos de células y sirve como señalización y molécula efectora en la biología de los mamíferos. Para la formación de ON se requiere L-arginina como sustrato y complejo de 5 electrones en una reacción reducción-oxidación, para convertir uno de los nitrógenos guanidino del aminoácido en ON, en presencia de oxígeno y otros cofactores como el mononucleótido de flavina, dinucleótido de flavina adenina, hierro- protoporfirina IX y tetrahidrobiopterina (27).

El malondialdehído es producto final de la peroxidación de lípidos (21).

Hipertensión arterial se define como una presión arterial sanguínea igual o mayor a 140/90mm/Hg.(33)

Índice de masa corporal (IMC), es un índice simple de peso para la talla que se utiliza comúnmente para clasificar bajo peso, el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se define como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros (kg/m²). Rango normal 18.50 a 24.99, Exceso de peso \geq 25.00, Sobrepeso 25.00 a 29.99, Obeso \geq 30.00, Obeso clase I (30.00 – 34.99), Obeso clase II (35.00 a 39.99), Obeso clase III \geq 40.00. (34)

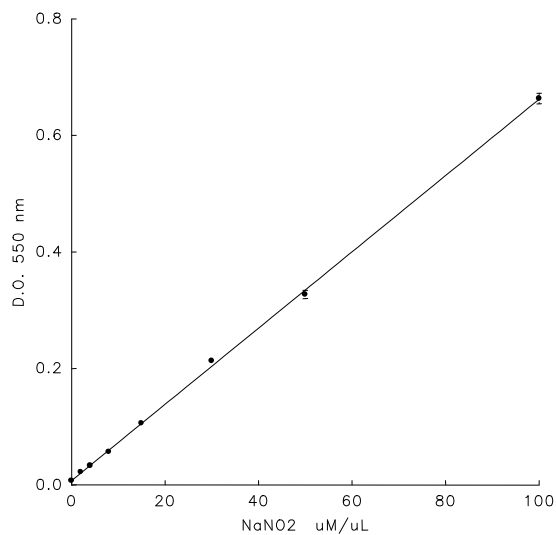
CURVA DE CALIBRACIÓN DE OXIDO NÍTRICO (NITRITOS)

La curva de calibración para la determinación de óxido nítrico, se basó en la determinación de nitritos de acuerdo al procedimiento de Griess. En este caso todos los reactivos se adquirieron de la marca Sigma

Cuadro 1. Procedimiento para realizar la curva de calibración de óxido nítrico plasmático y urinario reacción de Griess (Green et al, 1982).

Concentración de NaNO ₂	Volumen final de estándar de NaNO ₂ (100 µM) µL	Agua destilada µL	Sulfanilamida 1.0% µL		NED 0.1% µL		
0	0	50	50	Agitar suavemente e incubar a 22°C por 15 minutos en oscuridad	50	Agitar suavemente e incubar a 22 °C por 15 minutos en oscuridad	Leer a 540 nm
2	1	49	50		50		
4	2	48	50		50		
8	4	46	50		50		
15	7.5	42.5	50		50		
30	15	35	50		50		
50	25	25	50		50		
100	50	0	50		50		
Plasma	10 µL	40	50		50		
Orina	10 µL	40	50	50			
Saliva	10 µL	40	50	50			

Volumen de la muestra 20 o 50 μL (desproteinizada).



Curva de calibración de óxido nítrico, cada punto se realizó por triplicado, la línea totalmente recta corresponde a la regresión lineal.

Preparación de reactivos

Reactivo de Sulfanilamida al 1%

- 1). 100 mg de sulfanilamida o ácido sulfanílico (Sigma).
- 2). Aforar a 10 mL con ácido fosfórico al 5%
- 3). Agitar e incubar a 30°C por 10 min para facilitar la disolución
- 4). Conservar en oscuridad y a 0°C

Reactivo de N-1-Naftilendiamino (NED) al 0.1%

- 1). 10 mg de NED (Sigma)
- 2). Aforar a 10 mL con ácido fosfórico al 2%

- 3). Conservar en oscuridad y a 0 °C

Estándar de Nitrito de sodio (concentrado) 100 mM/mL

- 1). Nitrito de sodio 69 mg (Productos Químicos Monterrey. Monterrey, NL. Mex)
- 2). Aforar a 10 mL con agua destilada
- 3). Es estable indefinidamente a temperatura ambiente

Estándar de Nitrito de sodio (solución de trabajo) 100 µM/mL

- 1). 10 µL de la solución concentrada de NaNO₂
- 2). Aforar a 10 mL con agua destilada
- 3). Es estable indefinidamente a temperatura ambiente

Ácido fosfórico al 5%

- 1). 500 µL de ácido fosfórico concentrado ()
- 2). Aforar a 10 mL con agua destilada
- 3). Es estable indefinidamente a temperatura ambiente

Ácido fosfórico al 2%

- 1). 200 µL de ácido fosfórico concentrado ()
 - 2). Aforar a 10 mL con agua destilada
- o
- a). 4 mL de ácido fosfórico al 5%

- b) 6 mL de agua destilada
- 3). Es estable indefinidamente a temperatura ambiente

DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHIDO (MDA). Ohkawa et al., (1) previamente reportado (2,3).

En tubos de borosilicato de 16 x 80 mm tubos de 5 mL

300 (75) uL de plasma aforado a 1.0 ml con NaCl (0.9%)

4 (1) mL del reactivo de TBA (preparados ese mismo día)

Cubrir con canicas de vidrio

Incubar a 95 °C por 80 min (baño de maría)

Enfriar en agua con hielo

4 mL (1) de reactivo de extracción

Tapar con parafilm

Agitar en vortex 1 minuto

Incubar por 15 segundos a temperatura ambiente

Centrifugar 3000 rpm (rotor de 10 cm de radio) por 15 min

Tomar una alícuota de 1.5 mL (en cubeta semimicro plástica (Fisher Scientific))

REACTIVO DE TBA

- 40.5 mL de TBA al 0.8% en agua
- 40.5 mL de ácido acético glacial al 20% (Mallinkrodt) a pH de 3.5 amortiguado con NaOH 1 M. (Monterrey)
- 13. mL de SDS al 8.2%
- 6 mL de agua destilada

(Preparados ese mismo día)

- Solución de extracción:
 - 15 mL de n-butanol (lab),
 - 3 ml de agua destilada
 - 1 mL de piridina

RESULTADOS.

Se seleccionaron 21 pacientes consecutivos que cumplieron con los criterios de clasificación del ACR para el diagnóstico de arteritis de Takayasu (19 mujeres y 2 hombres). Los pacientes incluidos tenían una edad mayor a 18 años; con una edad media de 41.52 (± 14.19) años, el tiempo de evolución del diagnóstico fue de 13.46 (± 9.3) años. Nueve de los pacientes se encontraban activos y 11 inactivos, el resto de valores bioquímicos se muestran en la tabla 1. Catorce pacientes tienen el diagnóstico de hipertensión arterial sistémica; la presión arterial sistólica media fue de 130.95 mm/Hg (± 20.71) y la diastólica fue de 77.62 mm/Hg (± 8.89) ver tabla 2.

Tabla 1. Características bioquímicas de los pacientes con enfermedad de Takayasu.

		Todos	Activos	Inactivos
Edad	Años	41.52 (± 14.19)	30.55 (± 11.86)	49.75 (± 9.57)
Mujeres		19	8	11
Hombres		2	1	1
IMC	Kg/m ²	26.27 \pm 4.96	27.46 \pm 6.16	25.39 \pm 3.88
Glucosa	mg/dL	91.76 (± 17.23)	89.88 (± 24.26)	93.17 (± 10.36)
Colesterol	mg/dL	209 (± 58.29)	204.44 (± 77.54)	212 (± 42.13)
Creatinina	mg/dL	0.98 (± 0.41)	0.84 (± 0.3)	1.09 (± 0.46)
LDL	mg/dL	124.6 (± 28.55)	120.16 (± 26.88)	158.25 (± 110.16)
HDL	mg/dL	55.2 (± 9.49)	59.33 (± 12.24)	52.44 (± 6.54)
Triglicéridos	mg/dL	154.52 (± 108.58)	149.55 (± 112.87)	127.56 (± 30.83)
Hemoglobina	g/dL	13.58 (± 1.22)	13.3 (± 1.13)	13.79 (± 1.3)
Hematocrito	%	40.16 (± 3.80)	39.47 (± 3.11)	40.68 (± 4.32)
Leucocitos	10 ³ / μ L	11.60 (± 17.04)	8.64 (± 3.5)	7.45 (± 2.14)
Acido úrico	mg/dL	5.94 (± 1.89)	4.6 (± 1.52)	7.07 (± 1.41)
PCR	mg/dL	1.35 (± 1.57)	1.53 (± 1.54)	1.22 (± 1.65)
VSG	mm/H	28.52 (± 12.35)	31.67 (± 13)	26.17 (± 11.85)

Los datos se muestran como el promedio \pm una desviación estándar.

Tabla 2. Cambios en la presión arterial de los pacientes con Takayasu.

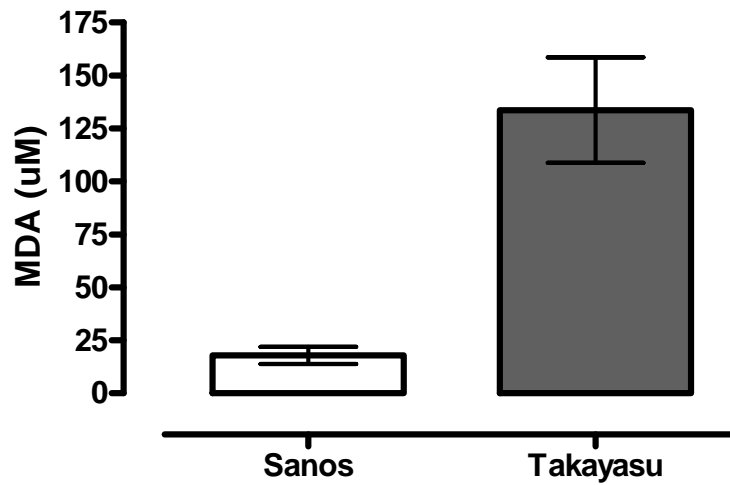
	Todos	Activa	Inactiva
Normotensos	7	3	4
Hipertensión arterial sistémica	14	5	9
Presión arterial sistólica	130.95 ± 20.71	122.22 ± 10.93	137.5 ± 24.17
Presión arterial diastólica	77.62 ± 8.89	75.56 ± 5.27	79.17 ± 10.84

Los datos se muestran como el promedio ± una desviación estándar.

Se determinó malondialdehído y óxido nítrico en pacientes con arteritis de Takayasu y se comparó contra los controles sanos, el análisis se realizó con T de student encontrando una diferencia estadística significativa con una $p < 0.001$.

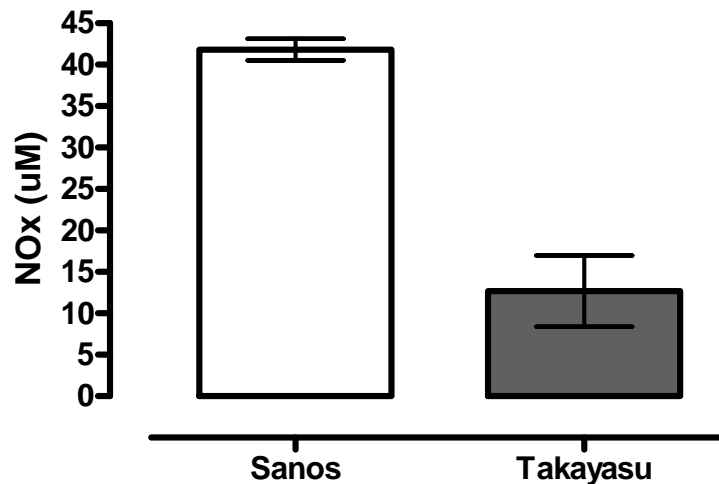
El promedio de concentración de malondialdehído obtenido en pacientes con arteritis de Takayasu fue de $148.01 \mu\text{M}$ contra $17.95 \mu\text{M}$ de controles sanos $p < 0.001$ (gráfica 1). Para el óxido nítrico el promedio fue de $14.28 \mu\text{M}$ en pacientes con arteritis de Takayasu y de $41.80 \mu\text{M}$ en pacientes sanos $p < 0.001$ (gráfica 2).

MDA Sanos vs Takayasu



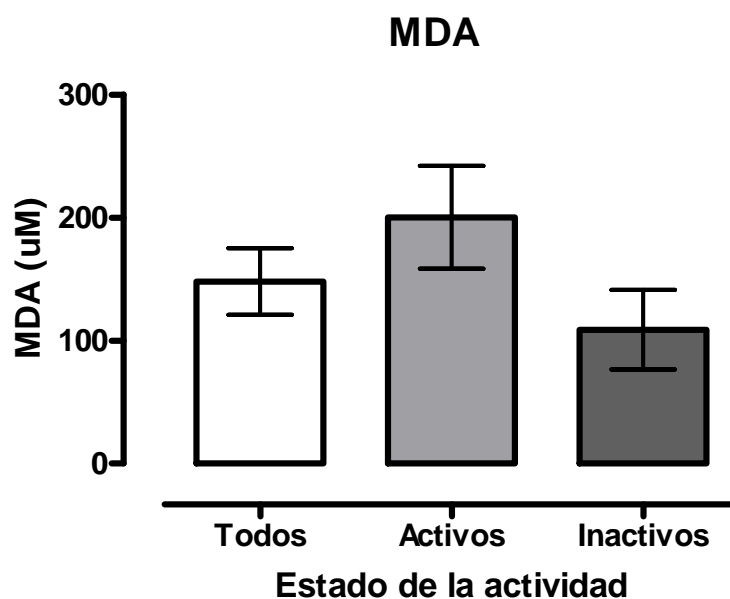
Grafica 1: Resultados de malondialdehído en controles sanos contra pacientes con AT. Los datos se muestran como el promedio \pm una desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de “*T*” de *student*, la diferencia estadística es de $P \leq 0.001$

Óxido nítrico Sanos vs. Takayasu

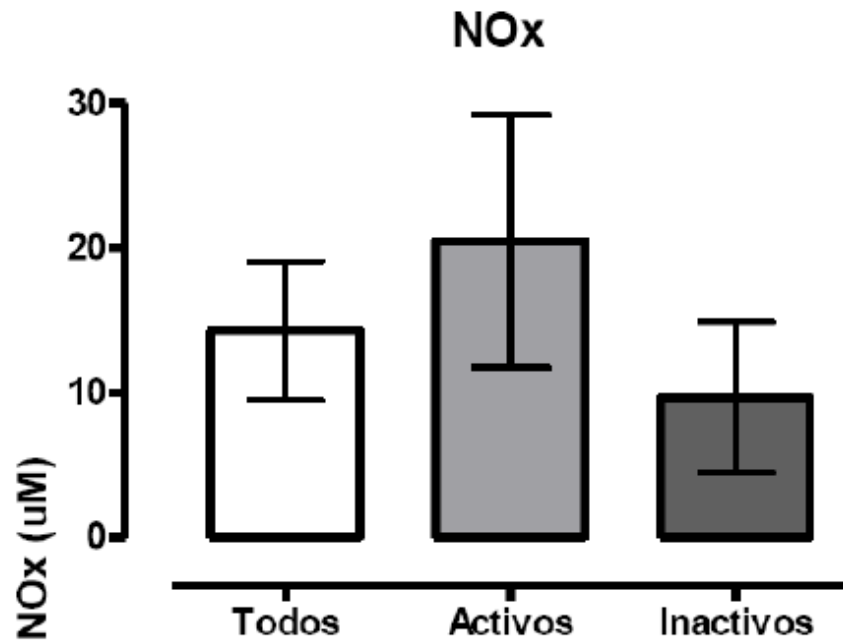


Grafica2: Resultado de oxido nítrico en controles sanos contra pacientes con AT. Los datos se muestran como el promedio \pm una desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de “*T*” de *student*, la diferencia estadística es de $P \leq 0.001$.

Posteriormente fueron comparados dentro del grupo de pacientes con AT los valores de malondialdehído y óxido nítrico entre los pacientes activos y no activos. Los resultados obtenidos entre pacientes activos e inactivos para malondialdehído fue de 200.27 μM contra 108.82 μM respectivamente, el promedio para el óxido nítrico fue de 20.45 μM contra 9.66 μM respectivamente.



Grafica 3: Se compara los resultados obtenidos de malondialdehído (MDA) en los pacientes activos e inactivos con AT. Los resultados se muestran como el promedio \pm una desviación estándar. El análisis de varianza de una vía sin diferencias estadísticas.



Grafica 4: Se compara los resultados obtenidos de oxido nítrico (NOx) en los pacientes activos e inactivos con AT. Los datos se muestran como el promedio \pm una desviación estándar. El análisis de varianza de una vía sin diferencias estadísticas.

CONCLUSIONES.

La presencia elevada de malondialdehído en los pacientes con arteritis de Takayasu contra controles, habla del proceso inflamatorio endotelial al cual se encuentran sujetos este grupo de pacientes independientemente de la clasificación clínica de la enfermedad. Pudiera existir una progresión subclínica de la enfermedad asociada los niveles elevados de esta molécula.

También se observa una disminución estadísticamente significativa de los valores de óxido nítrico en los pacientes con AT contra controles sanos, lo que indica claramente disfunción endotelial y pudiera jugar un papel importante en la regulación del tono vascular y el sistema inmune.

Al tener obtenidos los resultados antes mencionado en este estudio, cobra vital importancia la determinación nuevamente de estos marcadores de manera más estandarizada y en una población mayor para lograr una asociación más completa con esta enfermedad.

DISCUSION.

La arteritis de Takayasu es una vasculitis de grandes vasos, de etiología y patogénesis desconocida. Se caracteriza histológicamente como una panarteritis de los vasos arteriales. El proceso inflamatorio observado en la etapa temprana consiste en la infiltración de neutrófilos y monocitos predominantemente en la adventicia; la fase avanzada de la enfermedad se caracteriza por fibrosis de la capa media, la adventicia y la intima en un grado variable (35). Los criterios para determinar la enfermedad activa comúnmente aceptados, son los establecidos por el NIH (National Institute of Health) pero cuenta con varios inconvenientes; uno de ellos es que utiliza la VSG como marcador de inflamación, y esta presenta baja sensibilidad y especificidad. Otra desventaja es que requiere examen angiográfico, al ser un procedimiento invasivo y utilizar medio de contraste limita su uso; por lo anterior es difícil determinar con exactitud si el paciente se encuentra con actividad de la enfermedad al momento de la revisión médica.

Por otra parte la vaso-relajación dependiente del endotelio es anormal en enfermedades como la insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus e hipertensión arterial (36); desordenes donde existe una pérdida en la producción y/o biodisponibilidad de NOx a nivel endotelial. Esta alteración de la función vascular se ha denominado en la literatura científica disfunción endotelial (37). Toda célula genera continuamente radicales libres a una tasa metabólica determinada, ya que es un proceso fisiológico; cuando existe inestabilidad se origina estrés oxidativo, situación en que las concentraciones intracelulares de las especies activadas del oxígeno se encuentran incrementadas por sobre los valores fisiológicos. Esta situación puede estar producida por un aumento en la velocidad de producción de especies oxidantes, una disminución en los niveles de antioxidantes, o una combinación de ambas situaciones.

La peroxidación lipídica altera las funciones de las membranas celulares, generando al mismo tiempo un estado inflamatorio, el producto de esta peroxidación de lípidos es el malondialdehído (37).

La hipótesis de nuestro estudio se basa en que el daño al endotelio se manifiesta por la presencia de malondialdehído y cursa con disminución en la producción de óxido nítrico.

En nuestro estudio se encontró elevación de malondialdehído estadísticamente significativo en los pacientes con AT versus controles; esta alteración conlleva un papel importante en la inflamación endotelial y un riesgo elevado de presentar complicaciones asociadas como la formación de placa ateromatosa; así mismo la disminución del óxido nítrico en los pacientes con AT frente a controles nos muestra la existencia de disfunción endotelial la cual puede ser consecuencia de las zonas de estenosis arterial presente en estos pacientes.

El objetivo secundario en el estudio fue asociar estas moléculas (MDA y ONx) en los pacientes con enfermedad activa y no activa. No se logró encontrar diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos; esto pudiera explicarse por tener una muestra pequeña de pacientes que no lograra encontrar una tendencia hacia uno de los grupos, otra causa; esta en relación con la herramienta que se utilizó para clasificar a los pacientes como activos y no activos ya que carece de buena sensibilidad, debido a que la gran mayoría de nuestros pacientes no fue posible realizar estudio angiográfico (al ser un estudio invasivo y utilizar medio de contraste su costo/beneficio es algo discutible), esto acarrea una disminución aun más grande en la sensibilidad de esta clasificación, asimismo algunos pacientes clasificados como inactivos con un punto en la escala de Kerr podrían estar activos al adicionar el criterio de imagen; otro punto a mencionar es que el daño

endotelial consecuencia del aumento de MDA y disminución de ONx no tuviera una representación clínica inmediata y apareciera tiempo después. Este estudio es útil, nos da una perspectiva de un mecanismo de daño endotelial presente en esta enfermedad; no se logra establecer una diferencia en pacientes activos y no activos con la AT, tal vez con un estudio de mayor número de casos y un seguimiento en la evolución del paciente con nuevas determinaciones en momentos claves de la enfermedad ampliaría el panorama y comprenderíamos mejor esta asociación.

ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES

CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

REUMATOLOGIA

ANALISIS DE LAS MOLECULAS DE INFLAMACION ENDOTELIAL EN ARTERITIS DE TAKAYASU, Y SU CORRELACION CON LA ACTIVIDAD CLINICA

1. Propósito del estudio

Lo estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se llevará a cabo en el Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en el que se analizará si su padecimiento conocido como arteritis de Takayasu está relacionado a inflamación por medio de la identificación de algunos marcadores bioquímicos en su sangre y que contribuya a un mejor diagnóstico y tratamiento.

Al igual que usted, muchas personas con arteritis de Takayasu serán invitadas a participar, y su incorporación al estudio es totalmente voluntaria.

Lea por favor la carta con consentimiento para que nos haga las preguntas que considere necesarias antes de firmar su autorización voluntaria

2. Procedimientos

Si usted acepta participar, será incluido a través de una historia clínica en el servicio de Reumatología; se le harán exámenes de laboratorio para identificar si tiene o no estos marcadores

A usted se le informará de sus resultados en la visita subsiguiente.

La confidencialidad de sus datos se mantendrá permanentemente seguras, dado que se le identificará con un número de seguridad social, que permitirá que solo a través del expediente electrónico su médico tratante conozca sus datos

El médico responsable del estudio será el Dr. Vazquez y Camargo, Reumatólogos dedicados y encargado de la Clínica de Takayasu en el servicio Reumatología

3. Posibles riesgos y molestias.

- El riesgo es mínimo en caso de que usted acepte participar, serán molestias leves al solicitarle se le tomen un par de muestras de sangre.

4. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.

- Si acepta participar el beneficio en caso de encontrar los marcadores en su sangre, podrían darnos mejor idea de cómo va su padecimiento y eventualmente monitorear mejor su tratamiento o incluso encontrar otras formas de tratamiento más eficaces. También nos permitiría de alguna forma identificar con mayor precisión su pronóstico.

5. Resultados o información nueva sobre alternativas de tratamiento.

- En caso de desear retirarse del estudio, usted lo podrá hacer en cualquier momento sin que por ello se retire su atención médica.

6. Para cualquier duda o aclaración, estaremos permanentemente a sus ordenes en persona o en los teléfonos que se le anotan

DECLARACION FINAL

Se me ha informado con claridad en qué consiste el estudio, además he leído el contenido del formato; se me dio la oportunidad de plantear preguntas a todas mis dudas y se me entregará una copia del formato.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

Nombre del Testigo 1

Parentesco con

participante

Firma del Testigo

Fecha

REFERENCIAS

- 1.- Marc C. Hochberg, Alan J. Silman, Josef S Smolen, Michael E. Weinblatt, Michael H. Weisman, editors; Rheumatology; Mosby 2003; p 1657-63
2. Caccamise wc, Whitman jf; Pulseless disease. Preliminary case report. *Am heart j* 1952; 44: 629-33.
3. Dabague J; Reyes PA; Takayasu arteritis in Mexico: a 38-year clinical perspective through literature review. *Int J Cardiol* 1996; 54 Suppl:S103-9.
4. Hall S; Barr W; Lie JT; Stanson AW; Kazmier FJ; Hunder GG; Takayasu arteritis. A study of 32 North American patients. *Medicine (Baltimore)* 1985;64(2):89-99.
5. Ishikawa K; Natural history and classification of occlusive thromboaropathy (Takayasu's disease). *Circulation* 1978;57(1):27-35.
6. Hall S, Barr W, Lie JT, Stanson AW, Kazmier FJ, Hunder GG; Takayasu arteritis. A study of 32 North American patients. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64: 89–99.
7. Koide K; Takayasu arteritis in Japan, *Heart Vessels Suppl* 1992; 7: 48-54.
8. Chugh KS, Sakhuja V. Takayasu´s arteritis as a cause of renovascular hypertension in asian countries. *Am J Nephrol* 1992; 12: 1-8.
9. Nasu T. Takayasu's truncoarteritis; Pulseless disease or aortitis syndrome. *Acta Pathol Jpn* 1982; 32 Suppl 1:117-31.
10. Seko Y; Minota S; Kawasaki A; Shinkai Y; Maeda K; Yagita H; Okumura K; Sato O; Takagi A; Tada Y; et al. Perforin-secreting killer cell infiltration and expression of a 65-kD heat-shock protein in aortic tissue of patients with Takayasu's arteritis. *J Clin Invest* 1994; 93(2):750-8.
11. Noris M, Diana E, Gamba S, Bonazzota S, Remuzzi G; Interleukin-6 and RANTES in Takayasu Arteritis: A guide for therapeutic decisions? *Circulation* 1999; 100:55– 60.

12. Veena Dhawan a, Nitin Mahajan a, Sanjay Jain b; Role of C–C chemokines in Takayasu’s arteritis disease, *International Journal of Cardiology* 112 (2006) 105 – 111.
13. Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: Physiology and pathology. *Am J Pathol* 1988;133:426– 33.
14. Couffmahl T, Dupala C, Moreau C, Lainaziere JMD, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cell. *Circ Res* 1994;74:225– 34
15. Kashine, Ayumu Hirata, Tadashi Nakamura, Shizuya Yamashita and Yuji Matsuzawa Akifumi Matsuyama, Naohiko Sakai, Masato Ishigami, Hisatoyo Hiraoka, Susumu; *Circulation* 2003;108;1469-1473.
- 16 *Rev Endocr Metab Disord.* 2010; 11(1): 61–74.
17. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149–1160.
18. Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91, 31S–38S.
19. Adam-Vizi, V, Chinopoulos, C, 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 639–645.
20. Ana C. Andreazza a,b,c, Marcia Kauer-Sant’Anna a, Benicio N. Frey d, David J. Bond a, Flavio Kapczinski b, L. Trevor Young a, Lakshmi N. Yatham; Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis, *Journal of Affective Disorders* 111 (2008) 135–144.
21. Garcia, Y.J., Rodriguez-Malaver, A.J., Penalzoza, N., 2005. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J. Neurosci. Methods* 144, 127–135.
22. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.

23. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrite, nitrate and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
24. Mihara H, Uchiyama M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 1:271-8.
25. Arend WP, Michel BA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 1129-1134.
26. Kerr GS, Hallahan CW, et al. Takayasu arteritis. *Ann Intern Med.* 1994; 120: 919-929.
27. Courtney M. Townsend Jr. R. Daniel Beauchamp, B. Mark Evers, Kenneth L. Mattox, editors;
Sabiston textbook of surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice, Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
28. Jens Lykkesfeldt, Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking; *Clinica Chimica Acta* 380 (2007) 50–58.
29. Beckman, JA.; Libby, P.; Creager, MA. Diabetes mellitus, the metabolic syndrome, and atherosclerotic vascular disease. In: Zipes, DP.; Libby, P.; Bonow, RO.; Braunwald, E., editors. Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 1035-1046
30. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113:1888– 1904.
31. Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* 2009;335:165–189.

32. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev* 2001;22:36–52
33. Aram V. Chobanian; George L. Bakris; Henry R. Black. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003; 289:2560-2572
34. http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.
35. Hottchi M. Pathological Study On Takayasu's Arteritis. *Heart Vessels* 1992;7:11 – 7
36. Moncada S, Higgs A: Mechanisms Of Disease: The L-Argininenitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012.
37. G. Zalba, A. González*, J. Beaumont, G. San José, U. Moreno, B. López, S. Ravassa, P. Muñiz, A. Fortuño, M. A. Fortuño Y J. Díez; Enfermedad Cardiovascular E Insuficiencia Renal; Nefrología. Vol. XXI. 2001; 61-66.