

Evaluación de estrés oxidativo en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico y su posible relación con la exposición ambiental a agroquímicos

Assessment of oxidative stress in patients with Systemic Lupus Erythematosus and its possible relationship with environmental exposure to agrochemicals

Martinez, Leonardo N.¹; Mastandrea, Carlos¹; Benavente, Emilio³; Roverano, Susana³; Paíra Sergio³; Poletta, Gisela^{1,2}; Simoniello, M. Fernanda¹

¹Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL. Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Av. Rivadavia 1917 (C1033AAJ). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. ³Servicio de Reumatología del Hospital Provincial José María Cullen. Santa Fe, Argentina

*fersimoniello@yahoo.com.ar

Recibido: 18 de mayo de 2015

Aceptado: 10 de mayo de 2016

Resumen. Los agroquímicos son un método efectivo para controlar especies perjudiciales a los intereses del hombre, pero aplicados indiscriminadamente provocan diversos impactos a nivel ambiental y en la salud. Uno de los mecanismos más importantes por el cual los agroquímicos se ponen en contacto directo con las poblaciones de zonas periurbanas es mediante la deriva. El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que posee un amplio rango de presentaciones clínicas y severidad. Si bien su etiología es desconocida, se la asocia con diversas causas ambientales dentro de las que podrían estar presentes los agroquímicos. El objetivo de este estudio fue evaluar, el posible daño oxidativo generado por exposición ambiental a mezclas de agroquímicos en pacientes con LES y personas sanas que residen en zonas rurales expuestas a mezclas de plaguicidas y contrastar los resultados con pacientes y personas sanas de zonas urbanas no expuestas. Se evaluaron 44 pacientes con diagnóstico de LES y 58 personas sanas (controles), se utilizaron como marcadores: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), la relación glutatión oxidado/reducido (GSH/GSSG) y lipoperoxidación (TBARS). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para TBARS y SOD al comparar los resultados del grupo LES urbano con su control y el grupo LES rural con el suyo ($p < 0,01$ en ambos). Al realizar las comparaciones entre LES urbano y LES rural se halló un incremento en TBARS del 18,3% ($p = 0,014$). Esta investigación demuestra la importancia de la utilización de biomarcadores de daño oxidativo en el seguimiento clínico de pacientes con LES, con el fin de establecer pautas de tratamiento adecuadas y considerar la relación entre la exposición ambiental a plaguicidas y el aumento de daño oxidativo en pacientes con LES.

Palabras clave: Estrés oxidativo; Lupus Eritematoso Sistémico; Agroquímicos; Biomarcadores.

Abstract. The agrochemicals are an effective method to control harmful species of interests to humans, but when they are applied indiscriminately, they can cause environmental and health damage to people. Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that has a wide range of clinical manifestations and severity. While the etiology of SLE is unknown, it is associated with various environmental causes, being one possibility the exposure to agrochemicals. The aim of this study was to evaluate the possible oxidative damage generated by environmental exposure to agrochemical mixtures in SLE patients and healthy people living in rural areas and compare them with patients and healthy people living in urban, unexposed areas. Forty four patients diagnosed with SLE and 58 healthy individuals (controls) were evaluated, using the following markers: Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), the oxidized/reduced glutathione ratio (GSH / GSSG) and lipid peroxidation (TBARS). Statistically significant differences were found in TBARS and SOD by comparing the results of the urban SLE group with its control and rural SLE group with its control ($p < 0.01$ for both cases). When making comparisons between urban SLE group and the rural SLE group, an increase of 18.3% was found in TBARS ($p = 0.014$). This research demonstrates the importance of using biomarkers of oxidative stress in the clinical monitoring of patients with SLE, in order to establish guidelines for appropriate treatment and consider the relationship between environmental exposure to pesticides and increased oxidative damage in patients with SLE.

Keywords: Oxidative stress; Systemic Lupus Erythematosus; Agrochemicals; Biomarkers.

Introducción

La problemática generada por el uso de agroquímicos se incrementa rápidamente en la provincia de Santa Fe, Argentina. En la década

del 90, con el desarrollo del cultivo de soja asociado a tecnologías de semillas transgénicas, la frontera agrícola fue avanzando ver-

tiginosamente (Alvarez y Steinbach 2009). Conjuntamente al auge del cultivo de soja, el consumo de plaguicidas aumentó 858 % en los últimos 22 años (CASAFE 2012).

Los agroquímicos constituyen el método más efectivo para controlar vegetales y animales perjudiciales a los intereses del hombre, pero aplicados indiscriminadamente, y mediante la deriva y otros mecanismos de disipación, pueden provocar exposición en personas que viven en áreas rurales (Caffarini y col. 2001).

En la región pampeana, la exposición de las personas a los plaguicidas se vió incrementada debido al creciente uso de estos productos (Muñoz de Toro y col. 2006 a, b; Poletta y col. 2012). Es necesario generar una visión amplia que contemple no solamente los efectos agudos derivados de su utilización, sino que explore cambios en la tendencia secular de algunos eventos de salud que podrían poner de manifiesto efectos acumulativos del uso de estas sustancias en la salud humana (Carballo y col. 2012).

Es sabido que la exposición a agroquímicos causa diversas alteraciones al organismo (Bolognesi 2003), entre ellas la afectación al normal funcionamiento del sistema endocrino. Ansar Ahmed y col. (2000) postularon una probable relación entre la perturbación endocrina y la alteración de la homeostasis de las células B y T, lo cual podría favorecer estados de desregulación inmune y derivar en una enfermedad autoinmune (EA). Por lo general, se acepta que las EA son el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales (Lleo y col. 2010).

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una EA del tejido conectivo que posee un amplio rango de presentación clínica y severidad. Se la asocia con infecciones virales, drogas, anticoncepción oral, dieta, hábito tabáquico, exposición a luz ultravioleta y a compuestos tóxicos, dentro de los cuales podrían estar presentes los agroquímicos. La naturaleza inflamatoria del LES implica un estado de estrés oxidativo que contribuye a la disfunción de las células inmunes, producción de autoantígenos y reactivación de autoanticuerpos (Ahsan y col. 2003; Zhang y col. 2010). Es importante considerar que la ocupación de agricultor se ha asociado con enfermedades reumáticas autoinmunes en diferentes poblaciones y usando diferentes diseños de estudio (Clegg y Van Gemert 1999). Por lo tanto, las exposiciones ambientales a los agroquímicos po-

drían activar determinados mecanismos celulares y así predisponer a algunas personas a desarrollar LES o exacerbar su presentación clínica. Entre los antecedentes que alentaron esta investigación se encuentran los trabajos de Balluz y col. (2001) y Parks y col. (2008), realizados en Estados Unidos, en los cuales se halló una asociación positiva entre la residencia rural y el LES.

En los pacientes con LES se observa un estado oxidante aumentado directamente relacionado con las especies reactivas de oxígeno (EROs). El equilibrio de reducción-oxidación intracelular supone la presencia de compuestos antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, capaces de destruir o neutralizar las EROs. Cuando este equilibrio se rompe, se produce lo que se conoce como estrés oxidativo (Andresen y col. 2006; Ramos-Ibarra y col. 2006). Este mecanismo general de daño celular se ha asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social (Ames y col. 1993).

El estrés oxidativo puede ser producido por un amplio abanico de factores entre los que se encuentran los plaguicidas (Banerjee y col. 1999; Halliwell 2002). En este sentido, Simoniello y col. (2010), demostraron que trabajadores agrícolas de la región pampeana expuestos a plaguicidas, presentaron modificaciones en el equilibrio oxidativo y alteraciones enzimáticas.

A fin de mantener el equilibrio y evitar daños a los componentes celulares, el organismo cuenta con defensas constituidas por enzimas, eliminadores de radicales, sistemas reparadores de biomoléculas y sistemas eliminadores de componentes celulares oxidados. Entre las enzimas se destacan la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (CAT) y entre los eliminadores de radicales, el glutatión (GSH). Como biomarcadores de capacidad antioxidante frecuentemente se utilizan las mediciones de la actividad de las enzimas SOD y CAT, debido a que un cambio en las mismas reflejan eventos que pueden conducir a un estado de estrés oxidativo (Pérez Gastell y Pérez de Alejo 2000). De igual manera la cuantificación de la relación glutatión reducido sobre glutatión oxidado (GSH/GSSG) es una buena medida del balance oxidativo de un organismo (Jones y col. 2000; Nogueira y col. 2004) ya que los estresores oxidativos pueden disminuir el

contenido de GSH y cambiar el balance dinámico entre GSH y GSSG (Machado y col. 2008). Por otra parte, la peroxidación lipídica (POL) es probablemente el proceso inducido por EROs más investigado, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular.

Para la cuantificación de la POL, la medición de las sustancias reactivas con el ácido tio-barbitúrico (TBARS) se convirtió en el ensayo de elección para el screening o monitoreo, debido a su sensibilidad (Halliwell y Chirico 1993).

Por otra parte, las variables más usadas para describir la exposición a plaguicidas son la butirilcolinesterasa (BChE) y la acetilcolinesterasa (AChE). La disminución de la actividad de estas enzimas se relaciona, fundamentalmente, con exposición a compuestos organofosforados y metilcabamatos (Hernandez y col. 2006).

En el presente trabajo se utilizaron como biomarcadores BChE, AChE, SOD, CAT, GSH/GSSG y TBARS con el objetivo de evaluar el estrés oxidativo de habitantes de áreas rurales que padecen LES ya que estas personas podrían estar ambientalmente expuestas a agroquímicos y sufrir desbalances en el estado oxidante mayores a los naturalmente generados por la enfermedad del Lupus.

Materiales y métodos

Población en estudio

Se invitaron a participar del estudio los pacientes con LES que se encontraban en seguimiento en el Servicio de Reumatología del Hospital Provincial José María Cullen de la ciudad de Santa Fe (Argentina) entre octubre de 2012 y diciembre de 2013. Por cada paciente con LES se invitó a participar una persona del mismo sexo y semejante edad, que resida en la misma localidad pero que no padezca LES para formar parte de la población control. En total aceptaron participar 102 personas, cuyo rango de edades era de 18 a 69 años. Dentro de estos, 44 eran pacientes con diagnóstico de LES (American College of Rheumatology 1997), y 58 personas sanas que conformaron el grupo control.

Los participantes de ambos grupos fueron divididos en: I) residencia actual e histórica en la ciudad de Santa Fe o Santo Tomé, departa-

mento La Capital, que no tenían contacto directo o indirecto con agroquímicos (urbanos), II) residentes de distintos departamentos de la región centro-norte de la provincia de Santa Fe en los que se desarrolla una intensa actividad agrícola (rurales).

A todos los voluntarios se les explicó los objetivos del trabajo y se obtuvo el consentimiento informado según las normativas establecidas por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Además, se realizó una encuesta que incluyó datos socio-demográficos: edad, sexo, localidad, localización de la vivienda respecto a la zona de cultivo, servicio de salud; hábitos: consumo y frecuencia de cigarrillos y alcohol, enfermedad actual o crónica; datos laborales: tipo de trabajo, antigüedad laboral, horas de la jornada (Simoniello y col. 2008, 2010).

Se midió el SLEDAI o índice de actividad de la enfermedad en los pacientes con LES al momento de la toma de muestra de sangre (Bombardier y col. 1992). Este índice mide la severidad y compromiso sistémico de la enfermedad. El SLEDAI es un sistema de puntuación cuyo rango va desde 0 a 105 e incluye la revisión de diversos sistemas. Se seleccionaron exclusivamente pacientes con una actividad leve o inactiva, con una puntuación baja (de 0 a 4). Además al tratarse de personas con LES, en la anamnesis de los pacientes se consideraron variables clínicas como edad al diagnóstico, tiempo de evolución, tratamiento recibido en la actualidad (Roverano y col. 2001).

Obtención de las muestras

De cada donante se obtuvo una muestra de sangre (5 ml) por punción venosa, utilizando como anticoagulante una solución equilibrada de sales sódicas y potásicas de EDTA de pH 7,2 (Wiener lab). Las muestras así preparadas fueron transportadas refrigeradas al laboratorio y procesadas dentro de las 2 h.

Se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos para la separación de los eritrocitos. La capa leucocitaria y el plasma se removieron y los eritrocitos restantes se lavaron tres veces en solución salina fría (8,9 g l⁻¹ de NaCl) por centrifugación 5 minutos a 1300 g y 4 °C.

Se realizó el dosaje de hemoglobina en sangre entera (Método de cianometahemoglobina de Drabkin 1970) con la finalidad de expre-

sar los resultados en relación a la concentración de hemoglobina en la muestra. Las alícuotas de los glóbulos rojos se mantuvieron a -80°C para las determinaciones del estado oxidativo por un tiempo no superior a ocho semanas.

Marcadores de exposición a organofosforados y carbamatos

La AChE hidroliza a la acetiltiocolina y su actividad puede ser medida utilizando el método de Ellman et al (1961). Se empleó como muestra una dilución 1/10 del paquete globular lavado y como sustrato yoduro de acetil tiocolina, 156 mmol/l (Sigma A 5751). El producto de la hidrólisis reacciona con el ácido 5,5-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB, Sigma 8130) en solución tampón de fosfatos, pH 7,2 formando el compuesto coloreado que fue medido a 405 nm. La actividad de la enzima se determinó a temperatura constante de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (23). Para la determinación de BChE se utilizó un kit de reactivos comercial (Wiener lab®).

Marcadores de estado oxidativo

Actividad de catalasa (CAT)

Para determinar CAT por espectroscopia UV, se utilizó el método de Aebi (1984). A 3 ml de H_2O_2 54 mM en 50 mM de solución tampón de fosfatos, pH 7 se le adicionaron 10 μl de hemolizado (Glóbulos rojos lavados al 1 %). La disminución de H_2O_2 se midió a 240 nm a 25°C en 60 seg. La actividad de CAT se calculó por diferencia de absorbancia a 240 nm en espectrofotómetro Genwey Geneva UV-Visible y los resultados se expresan como kUg^{-1}Hb .

Porcentaje de inhibición de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

Se utilizó el kit de reactivos Sigma 19160. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La tasa de la reducción de oxígeno está linealmente relacionada con la actividad de la xantina oxidasa (XO), y es inhibida por la acción de SOD. Las lecturas se realizaron a 440 nm utilizando un lector de placa Rayto. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad de SOD.

Relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG)

Se utilizó la técnica propuesta por Venturino

y col. (2001), para determinar los tioles totales (GSH+GSSG) presentes en la muestra. En esta técnica se utiliza la enzima Glutathion Reductasa (GR) que logra la conversión cuantitativa del GSSG en GSH. La técnica usa el equilibrio de la reacción desplazado hacia GSH en forma prácticamente total.

La determinación colorimétrica de tioles totales se realizó con DTNB a 412 nm medida espectrofotométricamente con espectrofotómetro Genwey Geneva UV-Visible (Ellman 1959). Los resultados se expresan a través de la relación GSH/GSSG.

Determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La medición de la POL fue realizada mediante el método descrito por Buege y Aust (1978). El Malondialdehído (MDA) forma un 1,2 aducto con el ácido Tiobarbitúrico (TBA), lo que produce el complejo MDA:TBA (1:2) una base de Schiff color rosa fluorescente, que fue medida por espectrofotometría a 532 nm con espectrofotómetro Genwey Geneva UV-Visible. Los resultados se expresan como nmol de TBARS g^{-1}Hb .

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS, versión 17.0.

Las muestras fueron codificadas en el momento de la extracción y decodificadas antes del análisis estadístico para la comparación. La distribución de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas se testeó utilizando la prueba de Levene. Las variables categóricas se resumieron mediante frecuencias y porcentajes, mientras que las variables continuas fueron presentadas como la media y el desvío estándar o la mediana. Se analizó la independencia estadística de variables cualitativas mediante la prueba χ^2 o la de Fisher exacta según correspondiera. Las comparaciones univariadas entre grupos se realizaron mediante Mann-Whitney o la prueba T-Student, según correspondía.

Los factores de confusión continuos (edad, tiempo residencia) se dicotomizaron calculando la mediana y comparando los grupos generados con los valores superiores e inferiores a esta.

Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Ambos grupos (pacientes y controles) no presentaron diferencias significativas al considerar sexo y lugar de residencia como factor (Chi cuadrado, $p > 0,05$).

A partir de los datos obtenidos de las encuestas, los pacientes con LES, al igual que los controles, fueron divididos en urbanos y rurales en función de su domicilio de residencia. Los resultados de la actividad enzimática de BChE fueron $7052,56 \pm 786,22$ U l⁻¹ y $5879,33 \pm 631,56$ U l⁻¹ para personas pertenecientes a ámbitos urbanos y rurales,

respectivamente ($p < 0,01$). Los valores medios hallados para AChE fueron $7389,15 \pm 884,31$ U l⁻¹ de eritrocitos, para las personas de Santa Fe y Santo Tome mientras que para las personas de las comunidades rurales fue de $6012,20 \pm 526,28$ U l⁻¹ de eritrocitos ($p < 0,01$). El domicilio de residencia y los marcadores de exposición permitieron formar 4 subgrupos: LES urbano, control urbano, LES rural, control rural. En cada uno se calculó la edad promedio de las personas y se lo caracterizó considerando el hábito de fumar y de consumir alcohol (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de la población estudiada, en cuanto a número de personas incluidas, edades promedio, consumo de tabaco y alcohol.

		LES Urbano	Control Urbano	LES Rural	Control Rural
Número de personas		27	30	17	28
Edad $\bar{X} \pm SD$		35,7 \pm 11,1	27,4 \pm 10,1	38,0 \pm 11,6	41,9 \pm 12,3
Consumo de tabaco n (%)	SI	9 (33)	5 (16,7)	5 (29,4)	5 (18)
	NO	18 (67)	25 (83,3)	12 (70,6)	23 (82)
Consumo de alcohol n (%)	SI	2 (7,4)	5 (16,7)	4 (23,5)	11 (39)
	NO	25 (92,6)	25 (83,3)	13 (76,5)	17 (61)

La distribución por sexo, tanto en los casos como en los controles, sigue la proporción esperada para la patología lúpica, la relación mujer/varón es de 9 a 1.

Al comparar las edades entre ambos subgrupos de pacientes con LES no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,521$; Test-T). Del análisis de los datos clínicos de los pacientes con LES se pudo observar que el 71 % de los pacientes consume más de una medicación, al analizar el consumo de corticoides, hidroxicloroquina e inmunosupresores, se observó que los porcentajes de consumo de cada fármaco, en ambos subgrupos analizados es similar ($p > 0,085$).

Utilizando el índice SLICC, la proporción de pacientes urbanos con daño crónico (17 de 40) no es estadísticamente diferente de la proporción de pacientes rurales (11 de 32) ($p = 0,838$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en tiempo de evolución ($p = 0,607$) ni en edad de diagnóstico ($p = 0,343$) entre ambos grupos.

Los resultados obtenidos de los parámetros de estado oxidativo CAT y GSH/GSSG de los controles y los de pacientes con LES considerando el lugar de residencia (urbano o rural) no arrojaron diferencias significativas en las comparaciones realizadas (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados obtenidos para CAT ($\text{kU g}^{-1} \text{Hb}$) y GSH/GSSG en pacientes con LES y controles según residencia urbana o rural.

	LES Urbano	Control Urbano	LES Rural	Control Rural
CAT ($\text{kU g}^{-1} \text{Hb}$)	252,6±106,7	270,2±73,6	270,2±73,0	294,4±94
GSH/GSSG	0,986±0,367	0,939±0,125	0,940±0,250	0,958±0,167

Al comparar los valores de SOD del subgrupo de pacientes con LES urbano con el subgrupo control urbano por un lado, y el subgrupo de pacientes con LES rural con el control rural por otro, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$; Test-T). Estas diferencias pueden observarse en la *figura 1*, la cual muestra un aumento estadísticamente significativo del 69,5 % para los ni-

veles de SOD en el subgrupo de pacientes con LES urbanos con respecto al control urbano ($p < 0,001$; Test-T). También muestra un aumento del 34,9 % para los niveles de SOD en el subgrupo de pacientes con LES rural con respecto al control del mismo origen ($p < 0,001$; Test-T). La comparación de SOD entre pacientes con LES urbanos y rurales no arrojó diferencias significativas.

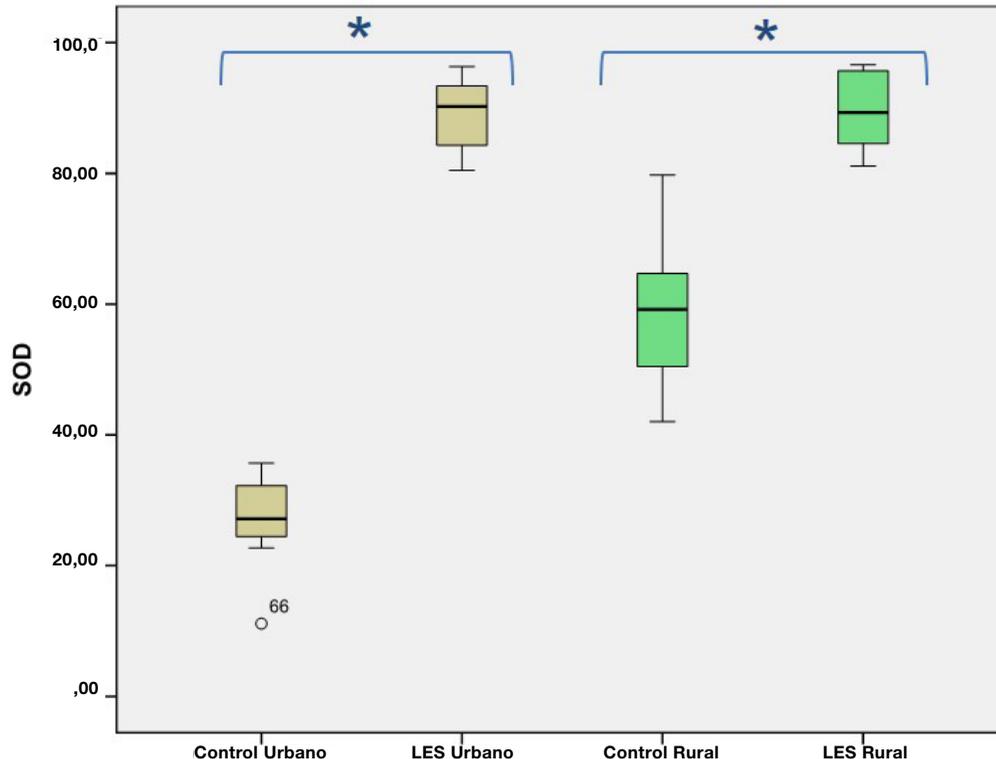


Figura 1. Box-Plots de los resultados de SOD de los pacientes con LES y los controles considerando el origen de su residencia (urbanos y rurales). Los resultados se expresan en porcentaje de actividad de la enzima SOD. * $p < 0,001$; Test-T.

Por otro lado, en la *figura 2* pueden observarse los resultados obtenidos para TBARS. Se encontró un aumento estadísticamente significativo del 25,8 % en el subgrupo de pacientes con LES urbano con respecto al control urbano ($p < 0,001$; Test-T). También se halló un aumento estadísticamente significativo

del 25,4 % en el subgrupo de pacientes con LES rural con respecto al control del mismo origen ($p < 0,001$; Test-T). Además, el subgrupo de pacientes con LES rurales mostró un incremento significativo del 18,3 % respecto a los pacientes con LES urbano ($p = 0,014$; Test-T).

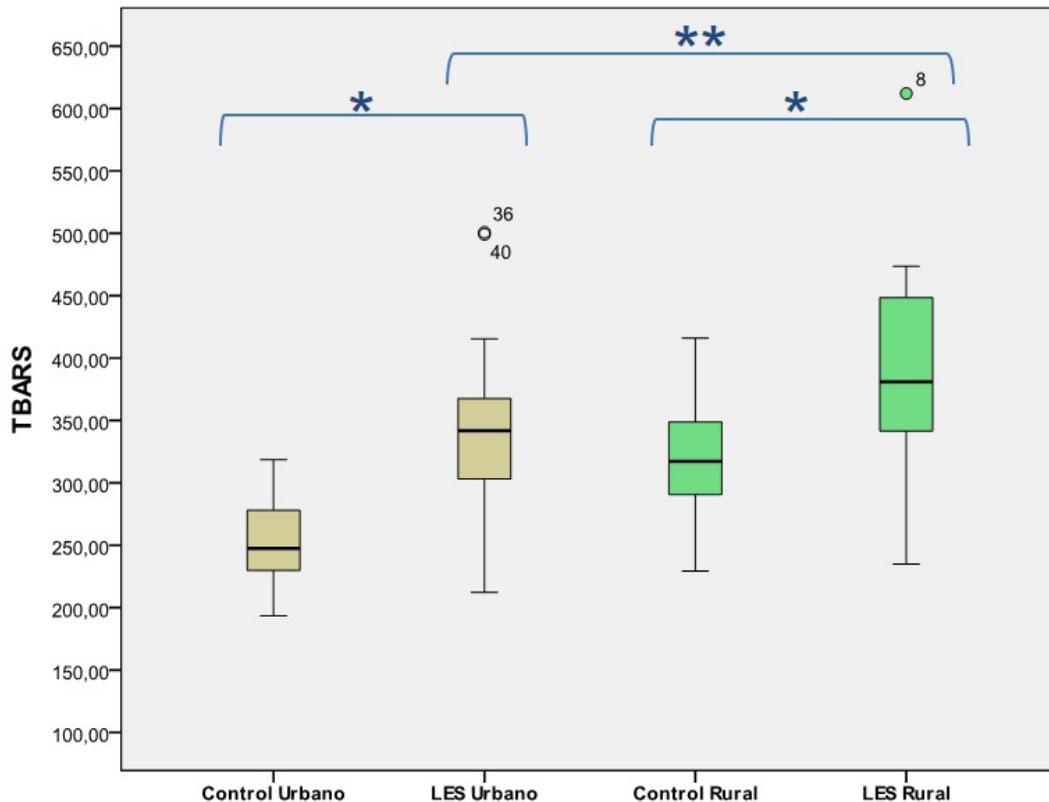


Figura 2. Box-Plots de los resultados de TBARS de los pacientes con LES y los controles considerando el origen de su residencia (urbanos y controles). Los resultados son expresados en nmol de TBARS g⁻¹Hb. * $p < 0,001$; ** $p = 0,014$; Test-T.

Como factores de confusión se analizaron la edad, el hábito de fumar y el tiempo de residencia (*Tabla 3*). En estos análisis, los parámetros de estado oxidativo fueron comparados en cada subgrupo, no obteniéndose diferencias significativas en ninguna de las comparaciones. El factor consumo de alcohol no se consideró debido al bajo número de personas con este hábito.

Discusión

En la mayoría de los individuos que desarrollan LES, la enfermedad se produce como resulta-

do de una mezcla entre su carga genética y los factores medio ambientales. Debido a la contribución de las hormonas sexuales quizás, las mujeres superen el umbral riesgo-enfermedad más fácilmente que los hombres, es decir, con una carga genética y una exposición ambiental relativamente menor (Mohan 2006).

En la actualidad, está claro que la patología inmune asociada con EA como el LES comienza muchos años antes que las manifestaciones clínicas, pudiendo estar influenciada por factores ambientales experimentados en la vida temprana. Es posible, que un individuo

Tabla 3. Comparación de parámetros de estado oxidativo considerando la edad (≤ 32 vs >32), tiempo de residencia (<26 vs ≥ 26) y consumo de tabaco como factores de confusión en pacientes con LES y controles categorizados según su residencia.

			CAT (kUg ⁻¹ Hb)	GSH/GSSG	TBARS (nmol de TBARS g ⁻¹ Hb)	SOD (% actividad)
LES Urbano	Edad (años)	≤ 32	295,1 \pm 127,4	0,913 \pm 0,155	336,4 \pm 59,1	88,2 \pm 4,1
		>32	223,4 \pm 81,7	1,036 \pm 0,457	339,9 \pm 80,9	89,6 \pm 6
	Consumo tabaco	SI	235,5 \pm 87,4	1,007 \pm 0,423	335,1 \pm 60,4	88,7 \pm 6,2
		NO	287,7 \pm 136,7	0,943 \pm 0,234	345,1 \pm 93,9	89,7 \pm 4,7
	Tiempo de residencia	<26	250,2 \pm 88,2	0,954 \pm 0,278	320,4 \pm 50,7	88 \pm 4
		≥ 26	254,3 \pm 120,6	1,008 \pm 0,425	350,9 \pm 82,2	89,6 \pm 6
Control Urbano	Edad (años)	≤ 32	263,9 \pm 64,1	0,934 \pm 0,127	250,2 \pm 34,3	27,2 \pm 6,6
		>32	311,3 \pm 124,7	0,972 \pm 0,122	273,8 \pm 42,5	---
	Consumo tabaco	SI	269,8 \pm 68,3	0,941 \pm 0,134	251,7 \pm 6,7	27,5 \pm 6,9
		NO	272,4 \pm 106,3	0,930 \pm 0,072	261,7 \pm 48,8	23,7 \pm ----
	Tiempo de residencia	<26	263,7 \pm 58,3	0,933 \pm 0,134	251 \pm 33,1	26,8 \pm 7,5
		≥ 26	291,7 \pm 114,1	0,958 \pm 0,095	261 \pm 45,1	28,4 \pm 3,9
LES Rural	Edad (años)	≤ 32	265,9 \pm 65,7	0,952 \pm 0,334	391,8 \pm 89,3	88,5 \pm 7,5
		>32	273,3 \pm 81,1	0,925 \pm 0,188	405,2 \pm 86,5	90,6 \pm 3,8
	Consumo tabaco	SI	264,8 \pm 80,7	0,955 \pm 0,263	408,8 \pm 84,1	90,7 \pm 4,9
		NO	283,2 \pm 55,8	0,901 \pm 0,236	377,9 \pm 93,3	86,9 \pm 7,7
	Tiempo de residencia	<26	271,8 \pm 82,1	0,979 \pm 0,304	435,1 \pm 92,5	92 \pm 5
		≥ 26	268,6 \pm 69	0,903 \pm 0,200	368,2 \pm 68,1	85,9 \pm 5,1
Control Rural	Edad (años)	≤ 32	340,6 \pm 86,7	0,990 \pm 0,270	308,8 \pm 61,5	11,6 \pm 5,1
		>32	279,1 \pm 93,2	0,947 \pm 0,124	321 \pm 41,6	10,1 \pm 3,1
	Consumo tabaco	SI	297,7 \pm 96,8	0,963 \pm 0,181	319,1 \pm 47,1	57,8 \pm 11,1
		NO	279,3 \pm 88,4	0,931 \pm 0,089	312,6 \pm 47,8	60,7 \pm 7,5
	Tiempo de residencia	<26	269,2 \pm 68,1	0,884 \pm 0,142	315,7 \pm 60,1	54,5 \pm 8,3
		≥ 26	304,6 \pm 102,4	0,987 \pm 0,170	318,8 \pm 41,5	59,2 \pm 10,9

genéticamente susceptible a desarrollar LES sólo alcance el "umbral" y desarrolle la enfermedad si es expuesto a múltiples estímulos ambientales durante su infancia (Edwards y Cooper 2006). La exposición ambiental a agroquímicos, evaluada en este trabajo a través de las enzimas colinesterasas, puede claramente ser un estímulo y constituir un riesgo real para las poblaciones rurales que se encuentran rodeadas por campos de explotaciones agrícolas. El análisis estadístico para la enzima CAT (*Tabla 2*) no evidenció diferencias significativas en ninguna de las comparaciones. Shah y col. (2011 y 2013) reportaron una disminución en la actividad de esta enzima en pacientes con LES con respecto a personas sanas, mientras que Mansour y col. (2008) reportan un aumento. Zhang y col. (2010) encontraron una correlación negativa entre CAT y el índice de severidad SLEDAI de los pacientes. Asimismo, la comparación de la relación GSH/GSSG entre las distintas poblaciones no fueron significativas (*Tabla 2*). Shah y col. (2013) observaron una disminución de GSH/GSSG en pacientes con LES respecto a los controles, hallando también una correlación negativa entre GSH/GSSG y el SLEDAI.

Las correlaciones negativas entre CAT y SLEDAI y entre GSH/GSSG y SLEDAI encontradas en estos trabajos previos ponen de manifiesto que ambos marcadores podrían modificarse en función de la severidad y el compromiso sistémico de la enfermedad del LES. En el presente estudio, se seleccionaron exclusivamente pacientes con una actividad leve o inactiva con una puntuación baja (de 0 a 4) con el fin de disminuir factores clínicos confundentes, lo que podría explicar la falta de diferencias significativas tanto en CAT como en GSH/GSSG.

El aumento de la actividad de SOD (*Figura 1*) coincide con el hallado por Zhang y col. (2010), en el cual compararon un grupo de personas sanas con uno de pacientes con LES, mientras que otros autores reportaron una disminución en la actividad de SOD en pacientes con LES (Turgay y col. 2007; Shah y col. 2011).

Zhang y col. (2010) mostraron mayor actividad de SOD en pacientes con LES que en los controles pero una relación inversa entre la actividad de SOD y el SLEDAI. Estos investigadores plantean la hipótesis que los pacientes con LES tienen un incremento en

las citoquinas pro-inflamatorias, que podrían generar como consecuencia, un aumento en la producción de EROs. El aumento de estas especies incrementaría la actividad de SOD para contrarrestar posibles daños, pero cuando los pacientes tienen un aumento de la actividad de la enfermedad (SLEDAI) durante un tiempo prolongado, SOD sería masivamente consumida, resultando en una disminución significativa de su actividad. Tosson y col. (2006) encontraron resultados similares. En estudios previos consultados (Turgay y col. 2007; Zhang y col. 2010; Shah y col. 2011) se observaron diferencias en la actividad de SOD en pacientes con LES con respecto a los controles, ya sea hallándose un aumento o una disminución en su actividad. Las variaciones en la severidad de la enfermedad podrían explicar las diferencias halladas en otros estudios respecto a la actividad de esta enzima. En este trabajo, el aumento de la actividad de SOD se explicaría por los bajos valores de SLEDAI de los pacientes.

Los resultados de TBARS (*Figura 2*) concuerdan con los hallados en otras investigaciones, Tewthanom (2008) y Shah y col. (2011) hallaron un incremento en plasma y Shah y col. (2010) en eritrocitos de pacientes con LES. Un aumento en TBARS indicaría una producción excesiva de EROs generada por los mecanismos de patogenicidad propios del LES (Shah y col. 2011). Cuando se analizaron los resultados obtenidos para los pacientes con LES considerando la residencia, se detectó un aumento en TBARS del 18,3 % en los pacientes de zonas rurales respecto a los de zonas urbanas. La POL, expresada como un incremento de TBARS, se ha sugerido como uno de los mecanismos moleculares implicados en la toxicidad inducida por agroquímicos (Banerjee y col. 1999). Varios autores reportaron un incremento de MDA en humanos y animales ante la exposición a distintos pesticidas (Kale y col. 1999; Gultekin y col. 2000; Prakasam y col. 2001; Nasuti y col. 2003; Catalgol y col. 2007), resultados que coinciden con los de Kisby y col. (2009) y Simoniello y col. (2010) que evaluaron personas expuestas ocupacionalmente a mezclas de plaguicidas.

Otros trabajos han intentado establecer una relación entre la exposición ambiental a agroquímicos y la enfermedad de LES. Balluz y col. (2001) estudiaron una población de Estados Unidos expuesta ambientalmente a mez-

clas de agroquímicos en la cual la prevalencia de la enfermedad era superior a la media del país. Si bien no lograron establecer una asociación estadística entre la enfermedad y la exposición a agroquímicos, encontraron en esta población elevados niveles de metabolitos de plaguicidas, superiores a la media de referencia de Estados Unidos. Por otro lado, Parks y col. (2008) encontraron una asociación positiva entre la residencia rural y LES.

No se hallaron diferencias significativas para ninguno de los factores de confusión considerados (Tabla 3). Los resultados para el factor edad coinciden con los de Pansarasa y col. (1999) quienes establecieron que los marcadores GSSG, POL y SOD, se modifican significativamente después de la séptima década de vida y que CAT y GSH no se muestran modificados por la edad.

Si bien el hábito de fumar está asociado a estrés oxidativo, la ausencia de diferencias significativas en los marcadores evaluados, se podría relacionar con la frecuencia y cantidad de cigarrillos consumidos, como también con el consumo de antioxidantes que podrían influir en el estado oxidativo, entre otros factores (Rodríguez Perón y col. 2001; Valko y col. 2007; Valverde y Rojas 2009, Simoniello y col. 2010).

La mayoría de las personas incluidas en el estudio poseían una residencia superior a 10 años, en este contexto, el tiempo de exposición a supuestos estresores ambientales fue elevado para todos los casos y explicaría la ausencia de diferencias observando este factor.

Conclusión

Los pacientes con LES residentes en zonas rurales de la Provincia de Santa Fe (Argentina) poseen niveles de POL superiores a los pacientes residentes en zonas urbanas (Santa Fe y Santo Tome).

Sin dejar de considerar las limitaciones del presente trabajo, esta evidencia permite relacionar la residencia rural con la patología del LES. Basándose en estos resultados y en trabajos previos que vinculan al LES con el ambiente rural, se podría sugerir que los pacientes con LES habitantes de zonas rurales estarían en riesgo de sufrir niveles de daño oxidativo superiores a los propios generados por la enfermedad.

Agradecimientos: Los autores agradecen a las personas que aceptaron participar en este trabajo y a médicos y enfermeras de los Hospitales Provinciales: Cullen, Protomédico e Iturras-

pe. Además, los autores agradecen a la Mg. Ing. Liliana Contini (Unidad de Biometría, departamento Matemática, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina) por su asistencia estadística. M.F. Simoniello a CAI+D UNL N° 50120110100196.

Bibliografía citada

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.

Ahsan H., Ali A., Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol.* 2003;31(3):398-404.

Álvarez R. y Steinbach H.S. A review of the effects of tillage systems on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in the in the Argentine Pampas. *Soil and Tillage Research.* 2009;104(1):1-15.

American College of Rheumatology. [en línea]. Update of the 1982 American College of Rheumatology Revised Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus. 1997. [consulta: 15 de enero 2012]. Disponible en: <http://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/1997%20Update%20of%201982%20Revised.pdf>

Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1993;90(17):7915-7922.

Andresen H.M., Regueira H.T., Leighton F. Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Revista Médica de Chile.* 2006;134(5):649-656.

Ansar Ahmed S. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology.* 2000;150(1):191-206.

Balluz L., Philen R., Ortega L., Rosales C., Brock J., Barr D., Kieszak S. Investigation of systemic lupus erythematosus in Nogales, Arizona. *American journal of epidemiology.* 2001;154(11):1029-1036.

Balluz L., Philen R., Ortega L., Rosales C., Brock J., Barr D., Kieszak S. Investigation of systemic lupus erythematosus in Nogales, Arizona. *Am J Epidemiol.* 2001;154(11):1029-1036.

- Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T., Chakraborty A.K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett.* 1999;107(1):33-47.
- Buege J.A. y Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52: 302-310.
- Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res-Rev.* 2003;543(3):251-272.
- Bombardier C., Gladman D.D., Urowitz M.B., Caron D., Chang C.H., Austin A., Schur P.H. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630-640.
- Caffarini P.M., Della Penna A., Giuffré L. Consecuencias Ambientales del uso de Plaguicidas. En Giuffré, L. (ed.). *Impacto ambiental en agroecosistemas.* Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina 2001;193-212.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFA). [en línea] Estadísticas. Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios / Año 2011 vs 2012. 2012. [consultado 15 de agosto 2014]. Disponible en: <http://www.casa-fa.org/biblioteca/estadisticas>.
- Carballo M.A., Kleinsorge E.C., Simoniello M.F. Occupational exposure to pesticides mixtures: oxidative balance, enzymatic biomarkers and genetic damage in an Argentinian population study. En: (Ed) Jokanovic. *Wyoming The Impact of Pesticides.* Academy Publish. 2012:78-104.
- Catalgol B., Ozden S., Alpertunga B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(8):1538-1544.
- Clegg D.J., Van Gemert M. Determination of the reference dose for chlorpyrifos: proceedings of an expert panel. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 1999;2(3):211-255.
- Drabkin DL. Heme binding and transport a spectrophotometric study of plasma glyco-lobulin hemochromogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971. 68:609-613.
- Edwards C.J., Cooper C. Early environmental exposure and the development of lupus. *Lupus.* 2006;15(11):814-819.
- Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-77.
- Ellman G.L., Curtney K.D., Andrews V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7: 88-95.
- Gultekin F., Ozturk M., Akdogan M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Arch Toxicol.* 2000;74(9):533-538.
- Halliwell B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? 1, 2. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(10):968-974.
- Halliwell B. y Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(5):715S-724S.
- Hernández A.F., Gómez M.A., Vidal Pérez J. V, García-Lario G.P., Pena G., Gil F., López O., Rodrigo L., Pino G., Pla A. Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. *Environ Res.* 2006;102:70-76.
- Jones D.P., Carlson J.L., Mody V.C., Cai J.Y., Lynn M.J., Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(4):625-635.
- Kale M., Rathore N., John S., Bhatnagar D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett.* 1999;105(3):197-205.
- Kisby G.E., Muniz J.F., Scherer J., Lasarev M.R., Koshy M., Kow Y.W., McCauley L. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. *J Agromedicine.* 2009;14(2):206-214.