

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
“DR. ANTONIO FRAGA MOURET”

**“PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS G894T Y T786C DE LA
SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS) EN CELULAS
DE SANGRE TOTAL Y CARACTERISTICAS CLINICAS DE
PACIENTES MEXICANOS CON ESCLEROSIS SISTEMICA”**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
MEDICINA INTERNA

PRESENTA
Dr. David Miranda Pasaye

ASESOR:
Dra. María del Pilar Cruz Domínguez
Dra. María de Los Ángeles Martínez Godínez



MÉXICO, D. F.

MARZO DE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

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
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. Olga Lidia Vera Lastra
Investigadora Asociada
Profesor Titular del Curso de Especialización en Medicina Interna
Servicio de Medicina Interna
UMAE Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional La Raza
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. David Miranda Pasaye
Residente del Curso de Especialización en Medicina Interna
Servicio de Medicina Interna
UMAE Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional La Raza
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. María del Pilar Cruz Domínguez
Profesor Adjunto del Curso de Especialización en Medicina Interna
Asesora de tesis
Servicio de Medicina Interna
UMAE Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional La Raza
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Ángel Miliar García
Doctor en Ciencias
Investigador Asociado
Profesor de Biología Molecular
Posgrado Escuela Superior de Medicina
Instituto Politécnico Nacional

Dra. María de Los Ángeles Martínez Godínez
Maestra en Ciencias en Farmacología
Investigadora Asociada
Alumna de Doctorado en Ciencias en Investigación en Medicina
Profesora de Posgrado Escuela Superior de Medicina
Instituto Politécnico Nacional

Número de registro:

R-2010-785-056



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

"2010 Año de la Patria. Bicentenario del Inicio de la Independencia y Centenario del Inicio de la Revolución"

08 de octubre de 2010

Ref. 09-B5-61-2800/201000/1668

Dra. María del Pilar Cruz Domínguez

Servicio de Medicina Interna
UMAE Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional La Raza
Presente

Informo a usted que el protocolo titulado: **Prevalencia de polimorfismos G894T y T786C de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y características clínicas de pacientes mexicanos con esclerosis sistémica**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales de la Comisión de Ética y Científica, se ha emitido el dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: **2010-785-056**.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de Junio y Diciembre de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente,



Dr. Fabio Salamanca Gómez
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Con copia:

- Dr. José Arturo Gayosso Rivera. Director de la UMAE, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional la Raza
- Dr. Luis Javier Jara Quezada. Director de Educación e Investigación en Salud, UMAE, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional la Raza

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	6
Introducción	8
Materiales y métodos	16
Resultados	18
Discusión	24
Conclusiones	28
Bibliografía	29
Anexos	32

RESUMEN

Título:

Prevalencia de Polimorfismos G894T Y T-786C de la sintasa de oxido nítrico endotelial (eNOS) en células de sangre total y características clínicas de pacientes mexicanos con Esclerosis Sistémica.

Objetivo:

Determinar la prevalencia de los polimorfismos G894T Y T-786C de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en pacientes mexicanos con esclerosis sistémica. Analizar la frecuencia en la variabilidad genética de los polimorfismos G894T Y T-786C de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en pacientes mexicanos con esclerosis sistémica con respecto a un grupo control

Materiales y métodos:

Para la realización de este estudio se incluyeron 139 pacientes con diagnóstico de Esclerosis Sistémica de acuerdo a los criterios de clasificación de la ACR a los cuales se les determinó las variantes alélicas correspondientes a los polimorfismos G894T Y T-786C de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) a partir de una muestra de sangre total de cada paciente, con la cual se extrajo DNA genómico para realizar estudios de genotipificación utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Se correlacionaron los resultados de los estudios de genotipificación con las características clínicas como variedad de esclerosis sistémica y manifestaciones vasculares como hipertensión arterial pulmonar, fenómeno de Raynaud e hipertensión arterial sistémica. Para el cálculo del riesgo relativo de los polimorfismos de padecer Esclerosis Sistémica se realizó la determinación de dichos polimorfismos a un grupo control de 139 pacientes sin Esclerosis Sistémica pareados por edad y género.

Se corroboró la variación alélica del polimorfismo T-786C mediante el método de secuenciación a partir del DNA obtenido de cada uno de los tres genotipos localizados.

Resultados:

Se incluyeron un total de 139 que cumplieron con los criterios de inclusión con una edad media de 50.13 ± 13.08 años. La variedad de ES más frecuente fue la limitada 74 pacientes (53.2%) y de la difusa 65 pacientes (46.7%). La prevalencia del polimorfismo G 894T en pacientes con Esclerosis sistémica para el genotipo homocigoto fue del 2.15%; para el genotipo heterocigoto la prevalencia fue de 19.42%. Para el polimorfismos T-786G la prevalencia fue del 2.87% y 25.17% para los genotipos homocigoto y heterocigoto respectivamente. La prevalencia en el grupo control para el polimorfismo T-786G fue del 2.15% para el genotipo homocigoto y del 29.4% en el caso de la variedad heterocigota. El riesgo (OR) de padecer Esclerosis sistémica fue de 1.26 ± 0.22 (IC 95% 1.04 - 1.48) para el genotipo homocigoto, y de 0.78 ± 0.21 (IC 95% 0.57 - 0.99) en el genotipo heterocigoto.

El polimorfismo G894T la prevalencia en el grupo control fue del 2.87% para la variedad homocigota y del 23.02% para la variedad heterocigota. La asociación de este polimorfismo con esclerosis sistémica fue de 0.95 ± 0.19 (IC 95% 0.76 - 1.14) para la variedad homocigota y del 0.8 ± 0.18 (IC 95% 0.62 - 0.98) para el genotipo heterocigoto. No existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de manifestaciones vasculares ni al grado de de severidad de dichas manifestaciones entre los grupos.

Conclusiones:

El genotipo homocigoto para el polimorfismo T-786G representó un riesgo de padecer Esclerosis Sistémica y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al grado de severidad de las manifestaciones vasculares en relación a la presencia o ausencia de los genotipos homocigoto y heterocigoto en ambos polimorfismos

Palabras claves: Esclerosis Sistémica, sintasa de oxido nítrico endotelial, polimorfismos G894T Y T-786C.

ABSTRACT

Title:

Prevalence of polymorphisms T-786C and G894T of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in whole blood cells and clinical features of Mexican patients with systemic sclerosis.

Objective:

To determine the prevalence of polymorphisms T-786C and G894T of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in whole blood cells in Mexican patients with systemic sclerosis compared with a sample of Mexican patients without scleroderma.

Materials and methods:

This study included 180 patients diagnosed with systemic sclerosis according to the classification criteria of the ACR. The determination of polymorphisms T-786C and G894T of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in whole blood cells was performed through the extraction of genomic DNA by PCR in real time. The association between the clinical subtype of systemic sclerosis and the clinical features such as pulmonary hypertension, Raynaud's phenomenon and systemic hypertension was investigated to calculate the relative risk associated to systemic sclerosis, the determination of these polymorphisms was also performed in 180 healthy controls.

Results:

We included 139 patients mean age of 50.13 ± 13.08 years. The prevalence of limited subtype was the 74 patients (53.2%) and the diffuse 65 patients (46.7%). The frequency of the 894T G polymorphism in patients with systemic sclerosis was of 2.15% homozygous, 19.42% heterozygous. For T-786G polymorphism prevalence was 2.87% and 25.17% for homozygous and heterozygous respectively. The frequency in the control group for the T-786G polymorphism was 2.15% for homozygous and 29.4% the heterozygous. The relative risk (RR) of developing systemic sclerosis was 1.26 ± 0.22 (95% CI 1.04 - 1.48) for homozygous, and 0.78 ± 0.21 (95% CI 0.57 to 0.99) for heterozygous. The prevalence of G894T polymorphism prevalence in the control group was 2.87% and 23.02% for homozygous and heterozygous respectively of the latter. There was not an association between G894T polymorphism and systemic sclerosis. The RR was 0.95 ± 0.19 (95% CI 0.76 - 1.14) for homozygous and 0.8 ± 0.18 (95% CI 0.62 to 0.98) for heterozygous range. There was no statistical significance between the frequency of vascular events or the degree of severity of such events and the prevalence of this polymorphisms.

Conclusions:

The homozygous T-786G polymorphism was a slightly associated with sclerosis, but none of the two studied polymorphisms was related to vascular clinical manifestations.

Key words:

Systemic sclerosis, Endothelial nitric oxide synthase, G894T Y T-786C polymorphisms.

INTRODUCCIÓN

La esclerosis sistémica es una enfermedad autoinmune de etiología aun desconocida que se caracteriza por fibrosis y daño endotelial con disfunción del tono vascular. ⁽¹⁾

La incidencia anual es estimada de 10 a 20 casos por millón de personas mientras que la prevalencia es de 4 a 253 casos por millón de personas. La esclerosis sistémica predomina en el género femenino, con una relación mujer: hombre de 3:1; esta diferencia es mayor de 7:1 en los grupos de edad menores de 50 años. Por lo general, la edad de inicio de esta enfermedad es alrededor de los 45 y 65 años ^(1,2)

Los pacientes pueden ser clasificados en 2 formas clínicas debido a los patrones de afección dérmica y alteración orgánica así como por la producción de autoanticuerpos, dicha clasificación comprende la forma difusa, forma de presentación en el 60% de los casos y la forma limitada presente en el 35% ^(1,2,3). La forma limitada es diagnosticada cuando el engrosamiento de la piel está limitado a aéreas distales a codos y rodillas; el síndrome de CREST (calcinosis cutis, fenómeno de Raynaud, disfunción esofágica, esclerodactilia y telangiectasia) es una variante de la forma limitada. La esclerosis sistémica sin esclerodermia es menos común (5%) y se caracteriza por afección orgánica en ausencia de alteración dérmica. ^(1,3),

El hallazgo clínico más aparente y casi universal de la Esclerosis Sistémica consiste en engrosamiento y fibrosis de la piel; sin embargo múltiples órganos internos entre ellos corazón, pulmones, tracto gastrointestinal, riñones así como a la vasculatura periférica están siempre involucrados en algún grado aunque esto no sea siempre clínicamente evidente ^(2,3).

En 1970 un subcomité de la Asociación Americana de Reumatología desarrollo los criterios de clasificación para Esclerosis Sistémica. El primero de ellos consistía en esclerosis y engrosamiento de la piel proximal a las articulaciones metacarpofalángicas; y el segundo criterio consistía en 2 de los siguientes: esclerodactilia, úlceras o cicatrices digitales y fibrosis intersticial. Con dichos criterios se incluía al 50% de los pacientes con síndrome de CREST, quedando excluidos pacientes quienes tenían únicamente esclerodactilia y pacientes con dismotilidad gastrointestinal severa ^(2,3). Los autoanticuerpos

fueron identificados hasta 1960 presentes en el 95% de los pacientes, identificándose 2 patrones asociados a los subtipos de la enfermedad ya descritos; los anti Scl 70 un anticuerpo para la enzima topoisomerasa I fue asociado clínicamente a la esclerodermia difusa clásica; y el anticuerpo anticentromero, un anticuerpo dirigido contra el centrómero del núcleo fue asociado a el clásico síndrome CREST^(4,5). A principios de 1980 diversas observaciones mostraron que los 2 tipos eran similares y que el síndrome de CREST no era una enfermedad benigna como se había considerado hasta la fecha, ya que la hipertensión pulmonar la cual es vista casi exclusivamente en estos pacientes mostro ser una complicación mortal en pacientes con CREST. Lo anterior confirmo la existencia de 2 subtipos de esclerodermia, aclarando que el síndrome de CREST no era una enfermedad benigna y que compartía diversas manifestaciones casi idénticas a la forma difusa^(5,6).

La forma limitada se caracteriza por un largo periodo de fenómeno de Raynaud seguido de edema digital persistente, ardor, úlceras digitales, gangrena y pérdida de la punta de los dedos ya sea por úlceras crónicas o por acroosteolisis. Pacientes con esta variedad de la enfermedad rara vez tiene afección de la piel por encima de la parte distal de las extremidades, presentan además cambios faciales como úlceras orales, y telangiectasias en cara y lengua, además de en los dedos^(4,6). Después de muchos años de evolución desarrollan calcinosis, la mayoría en la punta de los dedos, los antebrazos y las piernas. Las alteraciones gastrointestinales están casi siempre presentes con dismotilidad esofágica, así como del intestino delgado con malabsorción y pseudoobstrucción, además de severa hipomotilidad del colon en etapas tardías. La fibrosis intersticial severa y las crisis renales casi nunca ocurren pero la hipertensión arterial pulmonar ocurre en cerca del 20%, siendo la causa de muerte en la mitad de pacientes con la variedad limitada⁽⁶⁾.

En la forma difusa el fenómeno de Raynaud es usualmente el primer síntoma y el tiempo de desarrollo de este antes de otros síntomas es variable; la mayoría desarrolla edema digital dentro de los primeros 2 años de aparición del Raynaud; las úlceras digitales, la gangrena y la acroosteolisis ocurren de forma más frecuente en pacientes dicha variedad y la mayoría de los pacientes tienen afección de

diversas articulaciones y tendones^(4,5,6). La mayoría de los pacientes tiene cambios cutáneos difusos aunque 30% de los pacientes tiene cambios de progresión lenta y la mitad de estos no tiene afección difusa. Generalmente la progresión del engrosamiento de la piel ocurre de forma temprana. La alteración cardíaca y la crisis renal ocurren más a menudo en pacientes con progresión rápida de los cambios dérmicos. La enfermedad pulmonar severa es común en pacientes con variedad difusa aunque afortunadamente no todos los pacientes la desarrollan, la alveolitis ocurre de forma temprana; la afección pulmonar suele ser la causa de la muerte de estos pacientes^(5,6).

La etiología de la esclerosis sistémica aun es desconocida y se ha considerado que ésta es de tipo multifactorial con influencia de factores autoinmunes, ambientales y genéticos ^(4,5,6). Aunque la enfermedad no tiene un patrón de herencia Mendeliana clásica, existe fuerte evidencia de que factores genéticos contribuyen al desarrollo de la enfermedad y de las manifestaciones clínicas ^(7,8). Diversos estudios han demostrado que existe una elevada prevalencia de ciertos alelos de antígenos del leucocito humano (HLA) y complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) entre grupos étnicos diferentes y entre pacientes con diferentes subtipos clínicos de la enfermedad, además se ha visto la existencia varios casos de esclerosis sistémica en una misma familia, datos a favor de la participación genética en la etiología de la esclerodermia ^(9, 10, 11). Los agentes ambientales juegan un papel crucial y más importante que las influencias genéticas como lo demuestra la baja concordancia de Esclerosis sistémica en gemelos monocigotos ⁽¹²⁾; algunas infecciones, químicos y agentes físicos han sido postulados como iniciadores de la enfermedad ^(13,14). La hipótesis de que las infecciones son causantes de la esclerosis sistémica ha sido ampliamente estudiada, algunas investigaciones sugieren que la producción de autoanticuerpos específicos es el resultado de la respuesta a antígenos autodirigidos causados por mimetismo molecular; concepto que propone que los autoanticuerpos contra autoantígenos son producidos debido a que dichos antígenos contienen epitopes similares estructuralmente con proteínas virales o bacterianas. Infecciones por virus herpes, retrovirus y citomegalovirus han sido asociadas al desarrollo de Esclerosis Sistémica. ^(14, 15).

El hallazgo clínico más aparente y casi universal de la Esclerosis Sistémica consiste en engrosamiento y fibrosis de la piel; sin embargo múltiples órganos internos están siempre involucrados en algún grado aunque esto sea siempre clínicamente evidente. La piel esta engrosada, indurada, y firmemente unida a tejido celular subcutáneo, los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y sebáceas están atrofiadas; la piel de las manos y de la cara son las más frecuentemente afectadas.^(14,15)

Las manifestaciones vasculares ocurren en la mayoría de pacientes con Esclerosis sistémica; el fenómeno de Raynaud es la manifestación más común de la enfermedad y ocurre en el 95% de los pacientes consistente en vasoespasmo de lechos capilares digitales capaz de provocar isquémica digital resultando en úlceras y cicatrices digitales y en algunas ocasiones gangrena y acroosteolisis; clínicamente manifiesto por cambios de coloración de los dedos característicamente de forma trifásica precipitados por la exposición al frío o por estrés emocional.⁽¹⁵⁾ La hipertensión arterial pulmonar es otra de las manifestaciones vasculares de la esclerosis sistémica actualmente es considerada la principal complicación en este tipo de pacientes con una prevalencia reportada en diversas series del 10 al 15% con rangos desde el 5 hasta el 50% siendo más prevalente en pacientes con la variedad limitada de la enfermedad y asociado a la presencia de anticuerpos anticentrómero; dicha complicación se ha convertido en una de las principales causas de morbilidad en estos pacientes con una supervivencia del 50% a los 12 meses cuando esta se presenta y una mortalidad del 20% a los 20 meses cuando esta es mayor de 30mmHg y una supervivencia global de 1 a 3 años cuando la hipertensión pulmonar es severa.⁽¹⁵⁾

Los cambios patológicos en Esclerosis Sistémica comprenden un espectro de diversas etapas de desarrollo y progresión de 3 procesos mayores en tejidos afectados: 1). Fibrosis severa con depósito exagerado de colágena y otros componentes de la matriz extracelular. 2) Inflamación crónica ocurriendo predominantemente en etapas tempranas de la enfermedad y caracterizada por infiltración con células mononucleares y células T. 3) Enfermedad microvascular caracterizada por proliferación de la íntima, depósito concéntrico subendotelial de colágena y material mucinoso, y estenosis y trombosis

del lumen vascular.^(15,16) La progresión de los cambios vasculares y fibróticos y la disminución del componente inflamatorio son características de etapas avanzadas con atrofia de órganos afectados.^(15,16)

Los hallazgos histopatológicos en la piel incluyen marcado engrosamiento de la dermis con acumulación masiva de colágena densa causando atrofia epidérmica y reemplazo de glándulas sudoríparas y sebáceas así como folículos pilosos; un prominente infiltrado inflamatorio está presente en la interfase dérmica-adiposa.⁽¹⁶⁾ Los vasos pequeños de la dermis muestran engrosamiento fibroso pero no evidencia de vasculitis. En los pulmones la arquitectura de la membrana alveolocapilar y el parénquima intersticial esta marcadamente alterada por fibrosis e infiltración severa por células mononucleares. Las anormalidades vasculares con proliferación de la intima y estenosis secundarias u obliteración completa de pequeños vasos son frecuentes. A nivel renal la lesión característica es la estenosis y obliteración de arteriolas de mediano tamaño debido a acumulación subíntima de tejido conectivo y fibrosis perivascular.^(15,16)

La Esclerosis Sistémica se caracteriza por un depósito excesivo de colágena y otras macromoléculas de tejido conectivo en la piel y múltiples órganos internos, con severas alteraciones en la microvasculatura y anormalidades inmunológicas celulares y humorales ^(17,18). La patogénesis es extremadamente compleja, sin embargo anormalidades fundamentales en al menos 3 tipos celulares están íntimamente involucradas en el desarrollo de de las manifestaciones clínicas y patológicas de la enfermedad y estos son: 1) fibroblastos, 2) células endoteliales, 3) linfocitos B y T ⁽¹⁸⁾. Las alteraciones en esas células resultan en la triada de cambios patológicos característica de la enfermedad: fibrosis cutánea y visceral progresiva, obliteración de la luz de arterias y arteriolas y anormalidades inmunológicas humorales y celulares ⁽¹⁹⁾. Histopatológicamente el hallazgo vascular más frecuente es la fibrosis severa de la intima con diversos grados de adelgazamiento de la íntima lo que se ha asociado a estenosis y obstrucción vascular ^(20, 21). La activación y daño vascular son eventos tempranos ⁽²²⁾. La evidencia histopatológica del daño vascular se presenta antes de la fibrosis así como del fenómeno de Raynaud; evidencia clínica de dicha vasculopatía es demostrada por la presencia de telangiectasias

cutáneas, alteraciones en los pliegues de las uñas, hipertensión arterial pulmonar, estasis vascular antral gástrica y crisis de escleroderma renal con hipertensión maligna ⁽²²⁾. En fases tardías de la enfermedad existe una sorprendente escasez de pequeños vasos sanguíneos en las lesiones de piel y de otros órganos siendo en esta fase un componente crucial en la patogénesis la activación persistente y no regulada de genes codificadores de varios tipos de colágena y otras proteínas de la matriz extracelular en los fibroblastos; originando una producción y depósito tisular incontrolada de colágena resultando en la fibrosis orgánica y vascular patológica ⁽²³⁾. La disfunción endotelial existente en la Esclerosis Sistémica es clave para explicar las diferentes manifestaciones vasculares que se presentan en esta enfermedad; la endotelina y el óxido nítrico han sido relacionados con este daño vascular clínicamente traducido en fibrosis tisular ⁽²⁴⁾. El óxido nítrico es una molécula reactiva y de vida corta con funciones en la señalización biológica que se caracteriza tanto como un neurotransmisor y como una hormona ^(25, 26); desempeña un papel de vasodilatación, media la lesión endotelial a través de formación de radicales libres de oxígeno y recientemente se ha determinado que posee actividad citotóxica y antineoplásica; regula el tono vascular y contribuye a mantener la integridad funcional y estructural de la pared vascular ^(26, 27). El óxido nítrico se sintetiza a partir de L-arginina través de la óxido nítrico sintasa (NOS) de la cual existen 3 isoformas: NOS1 y NOS3 son expresadas constitutivamente en diversas clases de células, mientras que NOS2 (iNOS) solo se expresa en presencia de un estímulo; es decir es inducible por diversos estímulos como el IF gamma, el FNT- α , IL-1 y lipopolisacáridos bacterianos ^(27, 28), y se expresa en endotelio, células de músculo liso, fibroblastos, macrófagos y otros tipos de células, por lo que se ha considerado que esta es la mayor fuente de producción de ON ⁽²⁹⁾. La NOS1 es una forma neuronal (nNOS) que se expresa en el sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y otros tipos de células ⁽³⁰⁾ y contribuye a funciones como liberación de neurotransmisores, desarrollo y regeneración, plasticidad sináptica y regulación de la expresión de genes ⁽³¹⁾. La NOS2 es la forma endotelial (eNOS) y de acuerdo a estudios de inmunohistoquímica esta se expresa constitutivamente en endotelio vascular y es regulada por fuerzas de tensión de la pared vascular, endotelina, neuropéptidos

y ciertas citocinas ⁽³²⁾. La eNOS también se le ha localizado en fibras parasimpáticos perivasculares modulando el tono vascular y flujo sanguíneo además está presente en macrófagos y linfocitos ⁽³²⁾ y la mayoría de los tipos de células de la piel expresan a la sintasa de óxido nítrico ⁽³²⁾. La eNOS es codificada por un gen localizado en el cromosoma 7q35-36 y comprende 26 exones, del cual se han descrito tres polimorfismos a saber; el T-786C en la región promotora, una mutación sin sentido E298D en el exón 7 y la repetición de 27 pares de bases en el intrón 4 ⁽³³⁾. Así mismo se ha reportado otro polimorfismo que consiste en la sustitución G – T en la posición 894 del gen de eNOS el cual se ha asociado a riesgo de padecer Esclerosis Sistémica ⁽³³⁾, sin confirmarse de forma certera dicha asociación ⁽³³⁾. La función de la eNOS en el mantenimiento del tono vascular y en la prevención de vasoespasmo y activación plaquetaria es de vital importancia en una enfermedad como la esclerosis sistémica, en la cual la vasoconstricción es la piedra angular en su patogénesis y en la promoción del desarrollo de complicaciones ⁽³⁴⁾. En la piel humana saludable el óxido nítrico juega un papel importante regulando diferentes procesos pero también participa en muchos eventos fisiopatológicos ⁽³⁴⁾. El óxido nítrico es sintetizado de acuerdo a la demanda y se difunde intracelularmente en los tejidos blanco ⁽³⁵⁾. La producción de bajas concentraciones de ON por las sintasas de óxido nítrico constitutivas tiene efectos vasoprotectores al inhibir la adhesión plaquetaria y la degranulación leucocitos, al disminuir la permeabilidad capilar y a largo plazo inhibir también la migración y proliferación de músculo liso y fibroblastos la íntima ⁽⁴⁰⁾. Una síntesis anormal y excesiva de ON generada principalmente por la sintasa de óxido nítrico inducible, asociados a estados proinflamatorios como en enfermedades autoinmunes tiene consecuencias deletéreas al disminuir el ON liberado por sintasas de ON constitutivas provocando un desequilibrio en el control del tono vascular y un aumento en la adhesividad plaquetaria, degranulación de leucocitos y engrosamiento de la pared vascular eventos cruciales en la fisiopatología de la esclerosis sistémica⁽³⁶⁾; por lo que el rol de ON es ambivalente con efectos tanto positivos como negativos a nivel microvascular en la esclerosis sistémica ⁽³⁶⁾. De igual forma una disponibilidad alterada de oxido nítrico debido a polimorfismos de nucleótido

único en la región de codificación del gen de la eNOS puede incrementar el estrés de la pared vascular así como incrementar la viscosidad sanguínea influenciada por la deformabilidad de los eritrocitos, con aumento de la adhesividad plaquetaria así como activación de leucocitos favoreciendo el estado inflamatorio característico de la Esclerosis Sistémica.⁽³⁶⁾ Estudios recientes demuestran que los polimorfismos G894T Y T-786C de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) afectan la deformabilidad de los eritrocitos y la viscosidad sanguínea.⁽³⁶⁾ Una reducción en el óxido nítrico derivado de eNOS ha sido encontrado en esclerodermia así como se ha demostrado disminución de la expresión de RNA mensajero de NOS 3 en células endoteliales microvasculares dérmicas en pacientes con esclerodermia documentándose que el polimorfismo G894T el cual ejerce influencia en la actividad de la eNOS y en la cantidad de NO generada, representa un factor predisponente para esclerosis sistémica.⁽³⁶⁾ Todos estos hallazgos, en conjunto sugieren que existe una diferencia clave en la expresión de las isoformas de la sintasa de óxido nítrico lo cual podría resultar en la existencia de cierta predisposición a padecer esta enfermedad, sin embargo aun existen pocos datos reportados a nivel mundial y no existe información alguna en la población mexicana.

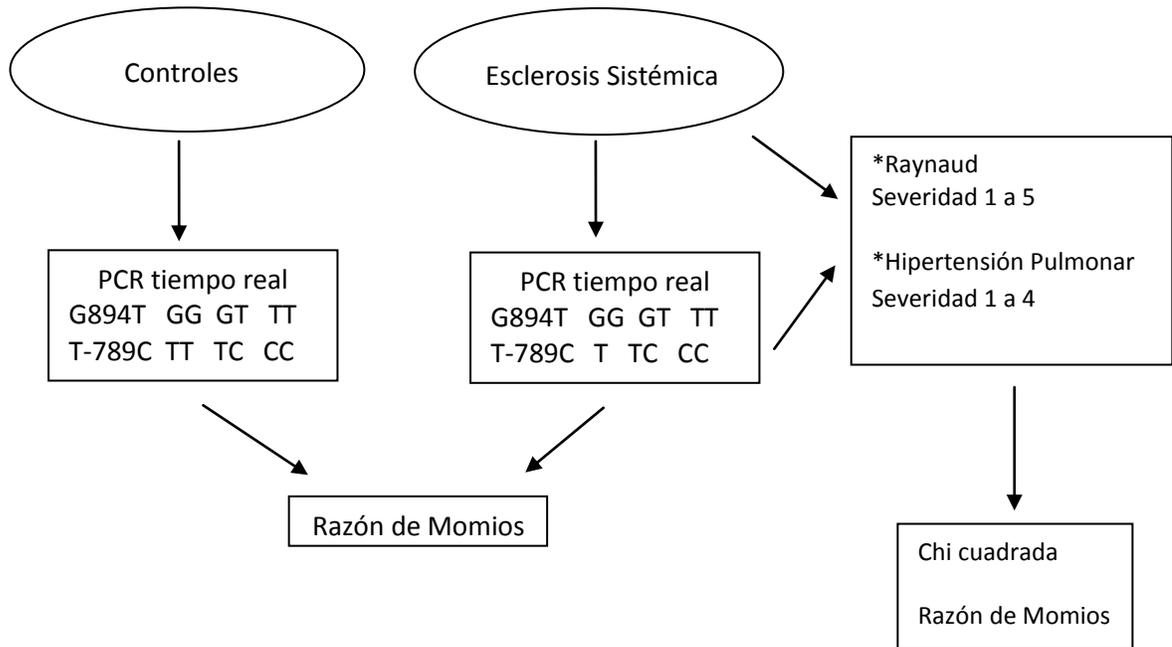
MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, observacional, trasversal analítico y casos y controles en período comprendido de marzo del 2009 a Mayo del 2010 en el servicio de Medicina Interna de la UMAE Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret” del Centro Médico Nacional IMSS “La Raza”.

Se incluyeron pacientes mayores de 16 años que cumplían con el diagnóstico de esclerosis sistémica de acuerdo a los criterios de American College of Rheumatology, que fueran derechohabientes del IMSS delegación norte y que tuvieran consentimiento bajo información firmado. Se excluyeron a aquellos pacientes con cualquier otra enfermedad autoinmune y se eliminaron a los pacientes que solicitaron salir del estudio y aquellos pacientes que retiraron su consentimiento informado firmado.

Se definió un tamaño muestral de 40 sujetos de acuerdo a la fórmula para el cálculo de la muestra en poblaciones tomando en cuenta una población total de 180 pacientes y una prevalencia de la enfermedad del 15% sin embargo se incluyó la totalidad de pacientes. Posteriormente se procedió a la toma de muestra de 3ml de sangre periférica mediante venopunción la cual se conservó a -70° C en tubos falcon con EDTA. y se determinó la presencia de los polimorfismos G894T Y T-786C de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) para lo cual se utilizó el protocolo de extracción de DNA genómico por medio de digestión enzimática (disolventes orgánicos; fenol, cloroformo o ambos). Para la cuantificación del DNA se utilizó un espectrofotómetro (JENWAY 6305). Las longitudes de onda fueron de entre 260nm y 280nm y se diseñaron sondas específicas para el análisis e identificación de las variantes alélicas a estudiar mediante PCR-tiempo real. Para la correlación con el tipo de afección (limitada o difusa), y la presencia de condiciones clínicas vasculares (Raynaud, Hipertensión pulmonar, hipertensión arterial sistémica) se empleó una hoja de recolección de datos a partir de los expedientes clínicos. Para el análisis de los datos se utilizó la fórmula de Prevalencia y las comparaciones se realizaron con la prueba chi cuadrada ya que todas nuestras variables son cualitativas y comparativas

entre dos grupos. El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Windows



RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 185 pacientes que cumplieran con criterios de American College of Rheumatology para el diagnóstico de ES; de éstos se excluyeron 46 pacientes por no contar con datos completos en el expediente en el momento del análisis. De los 139 pacientes incluidos en el estudio el rango de edad fue de 16 a 82 años (media \pm SD.: 50.13 \pm 13.08 años). 128 pacientes (92.75%) fueron mujeres, 11 pacientes (7.25%) fueron hombres.

La variedad de ES más frecuente fue la limitada 74 pacientes (53.2%) y de la difusa 65 pacientes (46.7%).

De los 139 pacientes el rango de PSAP fue de 20 a 110mmHg (media \pm SD: 35 \pm 12.6 mmHg); encontrándose HAP leve en 24 pacientes (17.26%) moderada en 18 pacientes (12.94%) y severa en 4 pacientes (2.87%).

La Hipertensión arterial sistémica se documentó en 18 pacientes (12.94%) así como dentro de las alteraciones vasculares periféricas el 81.29% (113) de las pacientes presentó fenómeno de Raynaud, el 4.31% (6) cicatrices digitales, el 5.03% (7) úlceras digitales; únicamente 1 paciente presentó gangrena digital.

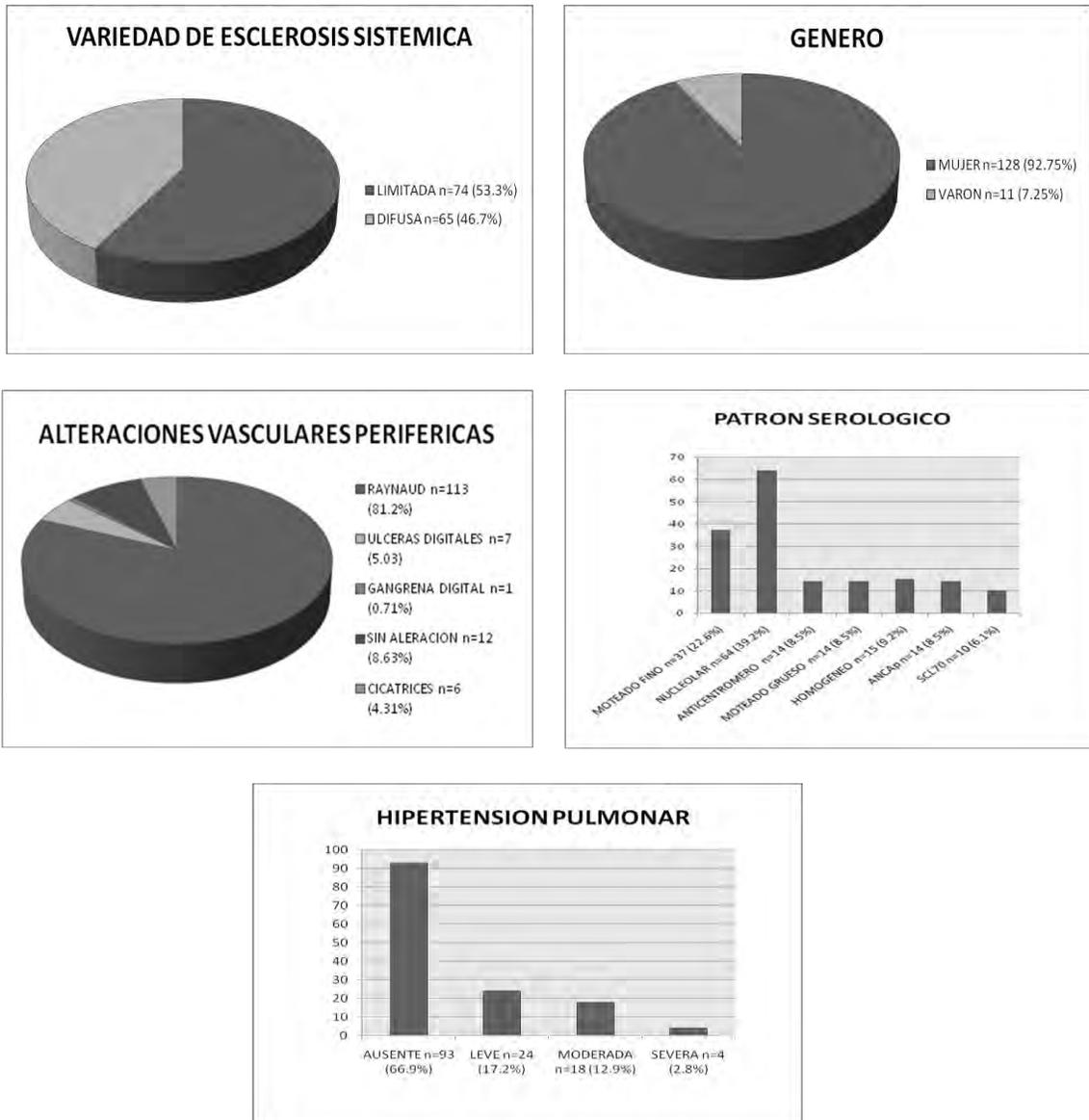
El patrón de anticuerpos antinucleares de mayor prevalencia fue el nucleolar en 64 pacientes (39.26%) seguido del moteado fino en 37 pacientes (22.69%) y en tercer lugar el homogéneo en 15 pacientes (9.20%); los anticuerpos anticentrómero solo se encontraron en 14 pacientes (8.58%) así como los anticuerpos anti ScL70 se encontraron en 10 pacientes (6.13%); cabe mencionar que algunos pacientes tuvieron 2 y hasta 3 patrones diferentes de anticuerpos y mención especial merecen los anticuerpos ANCAp que se documentaron en 14 pacientes (8.58%).

El genotipo homocigoto del polimorfismo G 894T se encontró en 3 pacientes con una prevalencia de 2.15%; así como el genotipo heterocigoto de dicho polimorfismo se encontró en 27 pacientes con una prevalencia del 19.42%.

En el caso del polimorfismo T-786G la prevalencia para el genotipo homocigoto fue del 2.87% (4 pacientes) y para el genotipo heterocigoto del 25.17% (35 pacientes) siendo este el polimorfismo de mayor prevalencia. En 20 pacientes se encontraron ambos polimorfismos y de éstos, el 75% (15 pacientes) fueron del genotipo heterocigoto.

CARACTERISTICAS DE PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	
EDAD	50.13± 13.08
GENERO	
HOMBRE	11 (7.25)
MUJER	128 (92.75)
TOTAL	139(100)
VARIEDAD DE POLIMORFISMOS	
T-786G HOM	4 (2.87)
G894T HOM	3 (2.15)
T-786G HET	35 (25.17)
G894T HET	27 (19.42)
COMBINACION DE POLIMORFISMOS	
T-786G HOM/G894T HOM	0 (0)
T-786G HET/G894T HOM	3 (2.15)
T-786G HOM/G894T HET	2 (1.43)
T-786G HET/G894T HET	15 (10.79)
T-786G HET/G894T WT	15(10.79)
T-786G HOM/G894T WT	2(1.43)
T-786G WT/G894T WT	93(66.90)
T-786G WT/G894T HET	9(6.47)
T-786G WT/G894T HOM	0(0)
TOTAL	139 (100)
VARIEDAD	
DIFUSA	65 (46.7)
LIMITADA	74 (53.2)
PSAP	
35± 12.6	
HAP	
AUSENTE	93 (66.90)
LEVE	24 (17.26)
MODERADA	18(12.94)
SEVERA	4 (2.87)
HAS	
18 (12.94)	
RAYNAUD	113 (81.29)
CICATRICES DIGITALES	6 (4.31)
ULCERAS DIGITALES	7 (5.03)
GANGRENA DIGITAL	1 (0.71)
SIN ALTERACION	12 (8.63)
ANTICUERPOS	
ANA MOTEADO FINO	37 (22.69)
ANA NUCLEOLAR	64 (39.26)
ANA ANTICENTROMERO	14 (8.58)
ANA HOMOGNEO	15 (9.20)
ANA MOTEADO GRUESO	9 (5.52)
ANCA	14 (8.58)
ANTI SCL70	10 (6.13)

Características generales del grupo de pacientes con esclerosis sistémica



Polimorfismo G894T

El genotipo homocigoto del polimorfismo G894T se encontró únicamente en pacientes con la variedad limitada de la enfermedad a diferencia del genotipo heterocigoto que se encontró en 27 pacientes, de éstos el 66.6% fueron de variedad clínica limitada (18 pacientes) y el 33.4% variedad difusa (9 pacientes). El promedio de la PSAP en los pacientes con el genotipo homocigoto fue de 22.3 ± 4.04 y en el caso del genotipo heterocigoto fue de 36.2 ± 11.13 ; en pacientes con la variante alelica nativa de dicho polimorfismo el promedio de la PSAP fue de 34.9 ± 13.90 ; de acuerdo al grado de severidad de la

hipertensión pulmonar solo el 3.75 de pacientes con el genotipo heterocigoto presento hipertensión pulmonar severa (1 paciente), el 18.5% (5 pacientes) moderada y el 11.1% (3 pacientes) leve. En el caso del genotipo homocigoto no se encontraron pacientes con hipertensión pulmonar. Al comparar las cifras de PSAP entre los grupos de los genotipos homocigotos y heterocigotos no tuvieron una distribución normal con la prueba de shapiro wilk por lo que se aplico la prueba de kruskal wallis de una vía obteniendo una p de 0.06. En el caso de la hipertensión arterial solo 3 pacientes (11.1%) con el genotipo heterocigoto cursaron con la misma. El fenómeno de Raynaud se presento en el 100% de pacientes con el genotipo homocigoto y solamente el 3.7% de pacientes con el genotipo heterocigoto presento ulceras y el 3.7% cicatrices digitales.

POLIMORFISMO G894T				
	WILD TYPE (T/T) N=109 (%)	HETEROCIGOTO (G/T) N=27(%)	HOMOCIGOTO (G/G) N=3(%)	VALOR DE P
EDAD	50.5± 13.71	48.8± 14.77	47.3± 7.50	NS
VARIEDAD				
LIMITADA	63 (57.7)	18 (66.6)	3 (100)	NS
DIFUSA	46 (42.3)	9 (33.4)	0 (0)	NS
PSAP	34.9± 13.90	36.2± 11.13	22.3± 4.04	NS
HAP				
AUSENTE	72 (66)	18 (66.6)	3 (100)	NS
LEVE	19(17.4)	3 (11.1)	0 (0)	NS
MODERADA	16 (14.6)	5 (18.5)	0 (0)	NS
SEVERA	2 (1.8)	1 (3.7)	0 (0)	NS
HAS				
RAYNAUD	15 (13.7)	3 (11.1)	0	NS
CICATRICES DIGITALES	56 (51.3)	16 (59.2)	3 (100)	NS
ULCERAS DIGITALES	5 (4.5)	1 (3.7)	0	NS
GANGRENA DIGITAL	6 (5.5)	1 (3.7)	0	NS
SIN ALTERACION	1 (0.91)	0 (0)	0	NS
SIN ALTERACION	41 (37.6)	9 (33.3)	0	NS
ANTICUERPOS				
MOTEADO FINO	31 (24.40)	5 (13.88)	2 (40)	NS
NUCLEOLAR	50 (39.37)	12 (33.33)	1 (20)	NS
ANTICENTROMERO	14 (11.03)	2 (5.55)	0 (0)	NS
HOMOGENEO	10 (7.87)	6 (16.66)	0	NS
MOTEADO GRUESO	8 (6.29)	2 (5.55)	0	NS
ANCA	8 (6.29)	5 (13.88)	1 (20)	NS
ANTI SCL70	6 (4.72)	4 (11.11)	0 (20)	NS

NS= p>0.05

Polimorfismo T-786C

En el caso del polimorfismo T-786C se encontró en 4 pacientes con genotipo homocigoto; el 50% con variedad clínica limitada (2 pacientes) y el 50% variedad difusa (2 pacientes). El genotipo heterocigoto se encontró en 35 pacientes; de estos el 66.6% (19 pacientes) fueron variedad limitada y el 33.4% (16

pacientes) fueron variedad difusa. El promedio de la PSAP en los pacientes con el genotipo homocigoto fue de 27 ± 4.69 ; en el caso del genotipo heterocigoto fue de 34.4 ± 13.04 ; en pacientes con el genotipo nativo del polimorfismo el promedio de la PSAP fue de 34.5 ± 12.72 ; de acuerdo al grado de severidad de la hipertensión pulmonar solo el 50% de pacientes con el genotipo homocigoto tuvo hipertensión pulmonar leve (2 pacientes); de los pacientes con el genotipo heterocigoto solo 1 paciente tuvo HAP severa (2.8%) 4 moderada (11.4%) y 5 leve (14.2%). Al comparar las cifras de PSAP entre los grupos de ambos genotipos no tuvieron una distribución normal con la prueba de shapiro wilk por lo que se aplico la prueba de kruskal wallis de una vía obteniendo una p de 0.3. La hipertensión arterial se documento en el 14.2% de pacientes con el genotipo heterocigoto (5 pacientes) y ningún paciente con el genotipo homocigoto cursó con hipertensión arterial. El fenómeno de Raynaud se presento en el 50% de pacientes con genotipo homocigoto y en el 65.7% de pacientes con genotipo heterocigoto; solamente el 8.5% de pacientes con el genotipo heterocigoto presento ulceras digitales.

POLIMORFISMO T- 786C				
	WILD TYPE (C/C) N=100(%)	HETEROCIGOTO (T/C) N=35(%)	HOMOCIGOTO (T/T) N=4(%)	VALOR DE P
EDAD	50.0± 13.23	51.7± 13.66	49.7± 5.85	NS
VARIEDAD				
LIMITADA	43 (57.7)	19 (66.6)	2 (50)	NS
DIFUSA	57 (42.3)	16 (33.4)	2 (50)	NS
PSAP	34.5± 12.72	34.4± 13.04	27± 4.69	NS
HAP				
AUSENTE	66 (66)	25 (71.4)	2 (50)	NS
LEVE	19 (19)	5 (14.2)	2 (50)	NS
MODERADA	14 (14)	4 (11.4)	0 (0)	NS
SEVERA	1 (1)	1 (2.8)	0 (0)	NS
HAS	14 (14)	5 (14.2)	0	NS
RAYNAUD	51 (51)	23(65.7)	2 (50)	NS
CICATRICES DIGITALES	6 (6)	0 (0)	0	NS
ULCERAS DIGITALES	4 (4)	3 (8.5)	0	NS
GANGRENA DIGITAL	1 (1)	0 (0)	0	NS
SIN ALTERACION	38 (38)	9 (25.7)	2(50)	NS
ANTICUERPOS				
MOTEADO FINO	26 (21.48)	8 (19.51)	2 (50)	NS
NUCLEOLAR	49 (40.49)	17 (41.46)	0 (0)	NS
ANTICENTROMERO	10(8.26)	5 (12.19)	0 (0)	NS
HOMOGENEO	12 (9.91)	2 (4.87)	1 (25)	NS
MOTEADO GRUESO	5 (4.13)	3 (7.31)	1 (25)	NS
ANCA	9 (7.43)	5 (12.19)	0 (0)	NS
ANTI SCL70	10 (8.26)	1 (2.43)	0 (0)	NS

NS=p>0.05

Riesgo relativo

Se realizó la determinación de ambos polimorfismos en un grupo control de 139 sujetos sanos y se comparó con el grupo de pacientes con Esclerosis sistémica. Para el polimorfismo T-786G la prevalencia para el genotipo homocigoto fue del 2.15% y para el genotipo heterocigoto del 29.4%; con un OR del 1.26 ± 0.22 (IC 95% 1.04 - 1.48) para el genotipo homocigoto y del 0.78 ± 0.21 (IC 95% 0.57 – 0.99) para el genotipo heterocigoto.

En el caso del polimorfismo G894T la prevalencia en el grupo control fue del 2.87% para el genotipo homocigoto y del 23.02% para el genotipo heterocigoto con un OR del 0.95 ± 0.19 (IC 95% 0.76 - 1.14) para el genotipo homocigoto y del 0.8 ± 0.18 (IC 95% 0.62 – 0.98) para el genotipo heterocigoto.

FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTEMICA Y CONTROLES			
POLIMORFISMOS DE eNOS	PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTEMICA N=139 (%)	CONTROLES N=139(%)	OR (IC95%)
G894T			
WILD TYPE (T/T)	109 (78.41)	103 (74.10)	
HETEROCIGOTO (G/T)	27 (19.42)	32 (23.02)	0.8 ± 0.18 (IC 95% 0.62 – 0.98)
HOMOCIGOTO (G/G)	3 (2.15)	4 (2.87)	0.95 ± 0.19 (IC 95% 0.76 - 1.14)
T-786G			
WILD TYPE (C/C)	4 (2.87)	3 (2.15)	
HETEROCIGOTO (T/C)	35 (25.17)	41 (29.4)	0.78 ± 0.21 (IC 95% 0.57 – 0.99)
HOMOCIGOTO (T/T)	100 (71.94)	95 (68.34)	1.26 ± 0.22 (IC 95% 1.04 - 1.48)

DISCUSIÓN

Las características encontradas en nuestro grupo de pacientes con esclerosis sistémica son compatibles con las reportadas en la literatura a nivel mundial con predominio del género femenino con relaciones varón: mujer que van del 1:3 al 1:7 en nuestro caso se encontró que el 92.7% de los pacientes en el estudio fueron mujeres con una relación varón-mujer de 1:11; la edad promedio de nuestras pacientes fue de 50 años similar a la descrita como edad de mayor prevalencia con rangos que van de los 45 a 65 años. La prevalencia encontrada de Hipertensión arterial pulmonar fue del 20.14% ligeramente superior a lo reportado en la literatura en donde se han descrito prevalencias del 10 al 15%; con una PSAP media de 35 ± 12.6 mmHg con rangos de 20 a 110mmHg. La afección vascular periférica representada por el fenómeno Raynaud con sus diversos grados de severidad hasta la gangrena digital se presentó en el 90.63% cifra que concuerda con lo reportado a nivel mundial. La hipertensión arterial sistémica se encontró en el 12.94%, cifra similar a la reportada por la ENSANUT 2006 en la población general sin esclerosis sistémica la cual va del 11.4 al 18.7% sin representar dicha condición riesgo incrementado de padecer Hipertensión arterial. El patrón serológico más frecuente encontrado fue el de tipo nucleolar en el 46.04% siendo compatible con la mayor prevalencia de variedad clínica limitada que se encontró en el 53.2%, a diferencia de la variedad difusa que se encontró en el 46.7% misma distribución encontrada en el estudio de Fatini y Gensini en el que se encontró una variedad limitada del 64% y una variedad difusa de 36%.

Al evaluar la prevalencia de los polimorfismos encontramos que para el polimorfismo G894T el genotipo homocigoto tuvo una prevalencia de 2.15% y para el genotipo heterocigoto del 19.42%, prevalencia mucho menor a la reportada en el estudio de población italiana de Fasini en el que la prevalencia para el genotipo homocigoto fue del 15% y para el genotipo heterocigoto del 49%; así mismo la prevalencia encontrada en nuestra población fue menor que la descrita en poblaciones

caucásicas en la que Marroni encontró una prevalencia del 32.8% así como en la población negra en la que se encontró una prevalencia de 15.1%, ambas para el genotipo homocigoto.

En el caso del polimorfismo T-786C nosotros encontramos una prevalencia del 2.87% y 25.17% para los genotipos homocigotos y heterocigotos respectivamente que al igual que para el polimorfismo G894T fueron inferiores a lo reportado en investigaciones previas como es el caso de la población italiana en donde se encontraron prevalencias del 15 y 49% para los genotipos homocigotos y heterocigotos de acuerdo a las investigaciones de Fasini; así mismo en el estudio de Marroni se encontró una prevalencia del genotipo homocigoto para el polimorfismo T-786C de 41.9% en población caucásica a diferencia de la población de raza negra en la que se encontró una prevalencia del 19.5% siendo en ambos casos superior a la de la población mexicana.

Cabe destacar que en el estudio de Fasini únicamente se evaluaron a 73 pacientes a diferencia del estudio de Marroni en el que se incluyeron 136 pacientes de raza negra y 154 caucásicos; en nuestro estudio evaluamos 139 sujetos y la prevalencia resulto inferior a lo reportado de forma internacional lo que nos orienta a pensar que las diferencias genéticas interraciales son de importancia para la expresión de dichos polimorfismos.

Dentro de la literatura mundial existen pocos estudios que evalúen el riesgo de padecer Esclerosis sistémica que confieren las variantes alélicas de los polimorfismos G894T y T-786C; en nuestro estudio comparamos la prevalencia de dichos polimorfismos en pacientes con Esclerosis Sistémica con la prevalencia de los mismos polimorfismos en pacientes sin dicha patología determinando el riesgo relativo y encontrando que únicamente el ser portador del genotipo homocigoto del polimorfismo T-786C confiere un riesgo incrementado de padecer Esclerosis Sistémica con un riesgo de 1.26 veces; sin lograr corroborar los resultados de estudios previos como el estudio Italiano de Fasini en el que a diferencia del nuestro, el polimorfismo T-786C no confería mayor riesgo de ser portador de la enfermedad con un OR del 0.8 (IC 95% 0.4 - 1.5) $p=0.4$; siendo el genotipo homocigoto del

polimorfismo G894T el que se asoció a mayor riesgo de padecer Esclerosis sistémica con un OR del 1.9 (IC 95% 1.0 - 3.4) $p=0.04$.

Dentro de la literatura mundial existen diversos estudios en los que se ha determinado que la presencia de las variantes genéticas de la eNOS representan un factor pronóstico independiente en enfermedades vasculares de alta prevalencia, como el síndrome coronario agudo como es el estudio realizado por Shimasaki en el que evaluó a 285 pacientes con cardiopatía isquémica y 607 controles estableciendo que el polimorfismo G894T confiere un riesgo para padecer cardiopatía isquémica con un OR del 1.7. Yoshimura evaluó 113 pacientes y 100 sujetos controles y encontró que el ser portador del polimorfismo G894T confiere un riesgo de espasmo coronario. Así mismo se ha documentado que la presencia de dichos polimorfismos tiene un impacto sobre las cifras de presión arterial como lo apoyan las investigaciones realizadas por Miyamoto quien evaluó 421 pacientes hipertensos y 187 normotensos estableciendo un riesgo del doble de padecer hipertensión arterial en los sujetos portadores del polimorfismo G894T. Dichos hallazgos se han documentado en población japonesa; en población similar a la nuestra también existen estudios en los que se ha determinado que la presencia de dichos polimorfismos de la eNOS confiere riesgos incrementado de eventos cardiovasculares adversos como lo es el estudio de Hoffmann quien encontró en una población de venezolanos el ser portador del polimorfismo G894T se asocia con cifras elevadas de presión arterial, colesterol así como con obesidad. El estudio GENICA (Genetic and Environmental Factors in Coronary Atherosclerosis), demostró con datos obtenidos de 1,086 pacientes, el alto impacto que tiene el polimorfismo T-786C de la eNOS respecto a la sobrevida libre de eventos cardiovasculares ($p < 0.0102$), por lo que se considero como un factor independiente de mal pronóstico, además de asociarse a mayor estrés oxidativo en pacientes blancos referidos para angiografía coronaria.

Las variantes genéticas de la eNOS también se ha asociado a incremento en el riesgo de padecer eventos cardiovasculares adversos asociados a proceso inflamatorio autoinmune (vasculitis) tal es el

caso de la enfermedad de Behcet y lupus eritematoso sistémico hallazgos sustentados en los estudios de Kim quien evaluó 65 pacientes con enfermedad de Behcet y 80 controles encontrando al polimorfismo G894T como factor de riesgo. Serrano documento un riesgo del doble (OR 2.2 IC 95% 1.29-3.6 $p=0.005$) inherente al polimorfismo T-786C para el desarrollo de LES.

En el caso de la esclerosis sistémica, patología cuyas manifestaciones vasculares son responsables de un alto índice de morbimortalidad no existen grandes estudios que exploren dichas asociaciones sin embargo Kawaguchi documento en su estudio que el incremento en la actividad transcripcional del la eNOS asociado al polimorfismo T-786C incrementa el riesgo de padecer hipertensión arterial pulmonar en pacientes japoneses con Esclerosis sistémica. En poblaciones similares a la nuestra no existen estudios que exploren dichas asociaciones.

Todo lo anterior hacía suponer que la presencia de los polimorfismos G894T y T-786C de la eNOS juegan un papel central en el desarrollo de manifestaciones vasculares y que el grado de severidad de dichas manifestaciones estaba en relación a la presencia o ausencia de dichos polimorfismos sin embargo en nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de manifestaciones vasculares así como entre el grado de severidad de las mismas en relación a la presencia de dichos polimorfismos lo que nos hace pensar que la simple presencia de las variantes genéticas de la eNOS no es suficiente para tener una traducción clínica y que probablemente la actividad transcripcional de dichas variantes juegue un papel aun más importante que la sola presencia de dicho polimorfismo por lo que nuestro estudio sienta las bases para estudios futuros en los que se valore la actividad transcripcional de la eNOS.

CONCLUSIONES

La prevalencia del polimorfismo G 894T en pacientes con Esclerosis sistémica fue del 2.15% para el genotipo homocigoto y del 19.42% para el genotipo heterocigoto. Para el polimorfismo T-786G la prevalencia fue del 2.87% y 25.17% para los genotipos homocigotos y heterocigotos respectivamente. El genotipo homocigoto del polimorfismo T-786G representó un riesgo de 1.26 veces de padecer Esclerosis Sistémica. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al grado de severidad de las manifestaciones vasculares en relación a la presencia o ausencia de ambos polimorfismos en sus genotipos homocigotos y heterocigotos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gorman L. The Many Faces of Scleroderma. *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:1–15
2. Hinchcliff M, Varga J. Systemic sclerosis/scleroderma: A treatable multisystem disease. *American family physician* 2008;78:961-68.
3. Vera O. Esclerosis sistêmica. *Med Int Mex* 2006; 22: 231-245
4. Herrick AL and Worthington J. Genetic epidemiology Systemic Sclerosis. *Arthritis Research* 2002; 4: 198-210.
- 5 Fleming J N, Schwartz S M. The Pathology of Scleroderma Vascular Disease *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:41–55
5. Ausiello D, Benos D J, Abboud F, et al. Following the Molecular Pathways toward an Understanding of the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Ann Intern Med.* 2004; 140: 37-50.
- 6 Herrick A L. Vascular function in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:527-533
- 7 Herrick A. Diagnosis and Management of Scleroderma Peripheral Vascular Disease. *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:89–114.
- 8 Agarwal S, Tan F, Arnett F, et al. Genetics and Genomic Studies in Scleroderma (Systemic Sclerosis). *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:17–40.
- 9 Mulligan-Kehoe M J, Simons M, Vascular Disease in Scleroderma: Angiogenesis and Vascular. Repair *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:73–79.
- 10 Kahaleh B, Vascular Disease in Scleroderma: Mechanisms of Vascular Injury *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:57–71
- 11 Assassi S, Tan F K. Genetics of scleroderma: update on single nucleotide polymorphism analysis and microarrays. *Curr Opin Rheumatol* 2006;17:761-767.
- 12 Fatini C, Mannini L, Sticchi E, Rogai V, et al. Hemorheologic profile in systemic sclerosis Role of NOS3 -786T>C and 894G>t polymorphisms in modulating both the Hemorheologic parameters and the susceptibility to the disease. *Arthritis & Rheumatism.*2006;54:2263-70
- 13 Kawaguchi Y, Tochimoto A, Hara M, Kawamoto M. et al. NOS2 polymorphisms associated with the susceptibility to pulmonary arterial hypertension with systemic sclerosis: contribution to the transcriptional activity. *Arthritis Research & Therapy* 2006;8:1-10
- 14 Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB* 1998; 12:773-790.
- 15 Cals-Grierson MM, Ormerod AD. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide* 2004; 10:179-93.

- 16 Shimizu Y, Sakai M, Umemura Y, Ueda H. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J Dermatol* 1997; 24:80-87.
- 17 Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1998; 268:17478-17488.
- 18 Fatini C, Gensini F, Sticchi E, Battaglini B, Angotti C, Conforti ML. High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) in patients with systemic sclerosis. *Am J Med* 2002;112:539-43.
- 19 Casas JP, Bautista LE, Humpries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004; 109:1359-1365.
- 20 Kim JU, Chang HK, Lee SS, JW, Kim KT, Lee SW, Chung WT. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:1083-1087.
- 21 Serrano NC, Paez C, Correa PA, Anaya JM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004;31:2163-2168.
- 22 Brenol CV, Chies JA, Brenol JC, Monticielo OA, Franciscatto P, Birriel F, Neves AG, Xavier RM. Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. *Clin Rheumatol* 2008;26:186-194.
- 23 Romero Li, Zhang DN, Cooke JP, Ho HK, Avalos E, Herrera R. Differential expression of nitric oxide by dermal microvascular endothelial cells from patients with scleroderma. *Vasc Med* 2000;5:147-158.
- 24 Allanore Y, Borderie D, Hilliquin P, Hervann A, Levacher M, Lemarechal H. Low levels of nitric oxide (NO) in systemic sclerosis: inducible NO synthase production is decreased in cultured peripheral blood monocyte/macrophage cells. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:1089-1096.
- 25 Takagi K, Kawaguchi Y, Hara M, Sugiura T, Harigai M, Kamamtani N. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin Exp Immunol* 2003; 3:538-544.
- 26 Matucci Cerinic M, Kahaleh B. The beauty and the beast: the nitric oxide paradox in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:843-847.
- 27 Takagi K, Kawaguchi Y, Hara M, Sugiura T, et al. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin Exp Immunol* 2003;138: 538-44

- 28 Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1506–1510.
- 29 Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:3–8.
- 30 Shoji M, Tsutaya S, Saito R, Takamatu H, Yasujima M. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci*. 2000;66:2557–2562.
- 31 Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998;103:65–69.
- 32 Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagasaki S, Sandrim VC, Correa RX, Rios-Santos F, and Tanus-Santos JE. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide* 2005; 12(3): 177-82.
- 33 Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB, and Cubeddu LX. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens* 2005; 19(3): 233-40.
- 34 Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, Lonn E, Charbonneau F, and Anderson TJ. The T-786→C Mutation in Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Associated With Hypertension. *Hypertension* 2002; 39: 919 – 922.
- 35 Rossi GP, Maiolino G, Zanchetta M, Sticchi D, Pedon L, Cesari M, Montemurro D, De Toni R, Zavattiero S, Pessina AC. The T_786C Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype Predicts Cardiovascular Mortality in High-Risk Patients. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1166 –74
- 36 Biondi ML, Marasini B, Leviti S, Turri O, Bernini M, Seminati R, Porreca W and Guagnellini E. Genotyping Method for Point Mutation Detection in the Endothelial Nitric Oxide Synthase Exon 7 Using Fluorescent Probes. Clinical Validation in Systemic Sclerosis Patients *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(3):281–282

ANEXOS

ANEXO A: HOJA DE CAPTURA DE DATOS (ESCLERODERMIA)

1. FICHA DE IDENTIFICACION

1.1 Código de identificación: _____ (número progresivo de captura de datos)

1.2 Edad en años _____ 1.4 Sexo: M F

1.3 Tiempo de diagnostico de la enfermedad: _____

2. Esclerosis Sistémica: si _____ no _____ (control)

2.1 Difusa: _____

2.2 Limitada _____

3. Vasos sanguíneos: Fenómeno de Raynaud:

3.1 Sin fenómeno de raynaud _____

3.2 Activo _____

3.3 Ulceras _____

3.4 Cicatrices _____

3.5 Gangrena-Amputaciones _____

5. Hipertensión arterial pulmonar: No: _____ Leve: _____ Moderada _____
Severa _____

5.1 PSAP: _____ mmHg

6. Polimorfismo de eNOS:

	polimorfismos	
	G894T	T-786C
Homocigoto		
Heterocigoto		
Wild Type		

Nombre y firma de quien captura: _____

Fecha que se aplico el cuestionario: _____

ANEXO B. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Coordinación de Investigación en Salud
Comisión Nacional de Investigación Científica

U.M.A.E. Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”
Servicio de Medicina Interna



Carta de Consentimiento Informado

Nombre del estudio: “PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS G894T Y T-786C DE LA SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS) EN CELULAS DE SANGRE TOTAL Y CARACTERISTICAS CLINICAS DE PACIENTES MEXICANOS CON ESCLEROSIS SISTEMICA”

Lo (a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en el Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret” Centro Médico Nacional “La Raza” en el Servicio de Medicina Interna, Clínica de esclerodermia.

La esclerosis sistémica (ES) una enfermedad autoinmune de causa aun desconocida, con gran impacto en la vida de los pacientes, debido a fibrosis, daño endotelial y disfunción vascular sistémica. La endotelina y al oxido nítrico (ON) producido por la sintasa de oxido nítrico endotelial (eNOS) tienen un papel central en este daño vascular clínicamente traducido en fibrosis. La variante genética T-786C y G894T de eNOS se asocian a mal pronóstico en vasoespasmos coronario, pero poco se sabe de su relación con la severidad de las manifestaciones vasculares en esclerosis sistémica como el “fenómeno de Raynaud” y la hipertensión pulmonar.

Este estudio tiene como propósito determinar la prevalencia homocigota de las variantes genéticas G894T Y T-786C de la eNOS en células de sangre total en pacientes mexicanos con esclerosis sistémica y compararla con una muestra de pacientes mexicanos sin la enfermedad, para determinar el riesgo de padecer esclerosis sistémica y su posible asociación con mayor severidad de las manifestaciones clínicas de tipo vascular.

Usted ha sido invitado(a) a participar en este estudio porque padece esclerosis sistémica y es atendido en esta unidad, por lo que pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto. Al igual que usted, 179 personas más serán invitadas a participar (total 180)

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

Procedimientos. Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

- 1) Procedimientos que son de rutina en la atención de pacientes en este servicio:
- 2) Una evaluación clínica completa incluirá exploración de la piel y vasos sanguíneos de sus manos y pies, nos tardaremos aproximadamente 5 minutos. Se actualizará en forma programada en el transcurso del siguiente mes un estudio de ecocardiograma y los estudios de rutina que nos informan la afección actual que le esta causando la enfermedad.
- 3) Se le pedirá que responda un cuestionario en el que le preguntaremos sobre: nombre, género, edad y algunas características de su enfermedad. La entrevista será en forma individual y confidencial. Tardaremos 5 minutos
- 4) Le pediremos que asista a una visita en la que no es necesario ningún tipo de ayuno, en ella se le tomará una muestra de media cucharadita de su sangre para analizar la secuencia genética de su enzima productora de la sustancia que se encarga del buen funcionamiento de sus vasos sanguíneos.

Nuestros genes son un código especial que todos heredamos de nuestros padres y es este código el que define el color de nuestra piel, ojos, pelo y de muchas otras características de cada quien. Aunque la información genética que poseemos no es el único factor importante para padecer esclerodermia y para presentar diferentes características clínicas de la misma enfermedad, ésta puede contribuir a la ocurrencia, el riesgo, el pronóstico, la respuesta al tratamiento. Por este motivo, nos gustaría saber más sobre estos genes cuya relación con esclerosis sistémica está en estudio. Estas mediciones nos pueden ayudar a entender las razones por las que algunas personas presentan hipertensión pulmonar, úlceras en los dedos de las manos o no responden al tratamiento, etc. Este conocimiento ayudará a mejorar o conocer esquemas de tratamiento; programas de prevención; pruebas diagnósticas; etc. Su muestra será cuidadosamente resguardada en el Laboratorio de biología molecular de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional a -80°C y su identidad estará protegida usando un código en lugar de su nombre.

Si usted es paciente de reciente envío a nuestra clínica, tomaremos una biopsia de piel para diagnóstico histopatológico de su enfermedad y solicitamos su autorización para preservar en congelación un pequeño fragmento de la misma, para analizar los genes y sus respectivas proteínas, de la misma forma que lo haremos ahora en su sangre para este protocolo. Quisiéramos solicitarle también su aprobación para realizar tanto los análisis necesarios para este estudio como conservar

parte de la muestra durante 10 años con el fin de que en un futuro podamos emplear este material para probar nuevas hipótesis que pudieran surgir. Al final de esta forma de consentimiento deberá indicar si está de acuerdo en que se le tomen estas muestras para estudios genéticos y si autoriza su empleo para estudios posteriores.

Posibles riesgos y molestias.

Los procedimientos de evaluación clínica (medición de peso, talla, cintura, tensión arterial, etc.), no ocasionan dolor, incomodidad o riesgo alguno.

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una discreta molestia, es posible que se le pueda formar un moretón

La biopsia de piel se realizará como parte de los estudios de rutina para pacientes con este diagnóstico en piso de medicina interna de este hospital por el medico tratante con experiencia en estos procedimientos.

Si usted llegara a sufrir alguna complicación por su participación en este estudio, recibirá el tratamiento y seguimiento necesario en el IMSS. Cualquier complicación será atendida por personal especializado en el Hospital de especialidades CMN La Raza.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.

No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni este estudio implica gasto alguno para usted. Un posible beneficio de su participación en este estudio es que los resultados de las pruebas clínicas y de laboratorio que realizaremos le proporcionarán información sobre su estado de salud. Además le informaremos y explicaremos su resultado y usted será tomada en cuenta para participar en estudios futuros encaminadas a mejorar la función vascular. Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la cadena causal y de las manifestaciones clínicas de la esclerosis sistémica.

Participación o retiro

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS, se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Es decir, que si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación con el IMSS y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS.

Privacidad y confidencialidad.

La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o (como su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado al igual que sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de sus pruebas clínicas, para garantizar su privacidad.

El equipo de investigadores y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione, al menos que usted así lo desee o para proteger sus derechos o su bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Para proteger su identidad le asignaremos un numero que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio

Si tiene preguntas sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 14:30 hrs, de lunes a viernes con la Dra. María del Pilar Cruz Domínguez, que es el investigador responsable del estudio, a los teléfonos: 57245900 extensión 23214, en el Servicio de Medicina Interna del HECMN La Raza.

Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs.; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Estudio de genes: por favor marque con una X una de las opciones cajas que se presentan abajo (únicamente debe indicar la opción que corresponda)

- No autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas
- Sí autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas de este estudio únicamente
- Sí autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas de este estudio y su empleo para estudios futuros

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre y dirección del Testigo 1

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha

Nombre y dirección del Testigo 2

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha

ANEXO C. METODOLOGIA DE BIOLOGIA MOLECULAR

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

Se utilizó el protocolo de extracción de DNA genómico por medio de digestión enzimática (disolventes orgánicos; fenol, cloroformo o ambos). A cada paciente se le extrajo tres mililitros de sangre periférica la cual se conservó a -70°C en tubos falcon con EDTA. Después que cada muestra se descongeló, se tomó un mililitro y se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml, y se le agregó solución Buffer de citrato (Buffer SSC 1X), se mezcló y centrifugó a 12000 rpm durante 1 min a 4°C , para romper las células sanguíneas (membranas). Se desechó la porción superior del sobrenadante y al resto se le agregó nuevamente solución Buffer, se mezcló y centrifugó de nuevo con las mismas condiciones anteriores. Después que se desechó el sobrenadante nuevamente, se resuspendió el pellet en una solución de detergente SDS y proteinasa K para desnaturalizar enzimas restantes, y la mezcla se incubó a 55°C durante una hora con el fin de homogeneizar la mezcla. Posteriormente se extrajo el DNA agregando una solución de fenol cloroformo isoamil alcohol, agitando mediante vortex y después se centrifugó a 12000 rpm por 2 min a 4°C . Después se transfirió la fase acuosa (proteínas desnaturalizadas) a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo. Así, el DNA se lavó y precipitó con etanol al 100 % frío, se resuspendió en solución Buffer TE, y se precipitó una segunda vez con etanol. Por último el pellet de DNA se secó y agregó alrededor de 80 μl de Buffer TE (dependiendo del tamaño del pellet) para resuspenderlo y mantenerlo en incubación a 55°C durante una noche. Después de este tiempo el DNA se cuantificó y se comprobó su integridad en gel de agarosa para finalmente conservarlo a -80°C hasta su utilización posterior.

CUANTIFICACIÓN DE DNA

Para la cuantificación del DNA se utilizó un espectrofotómetro (JENWAY 6305). Las longitudes de onda fueron de entre 260nm y 280nm, con las cuales se determinó la absorbancia de cada muestra. Para ello se diluyó 5 μl de DNA en 955 μl de agua bidestilada. Una vez cuantificado el DNA se realizaron diluciones para dejar todas las muestras a una concentración de 100ng/ μl .

PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

Las condiciones requeridas fueron las siguientes: En 30 ml de agua bidestilada, se añaden 450 mg de agarosa y 600 ml de TAE 50x, calentar hasta disolver completamente la agarosa, enfriar para después añadir 1.5 μl de bromuro de etidio y agitar para obtener una mezcla homogénea e incorporar al molde colocando los peines correspondientes para formar el gel con los pozos.

ELECTROFORESIS

El gel de agarosa se colocó en una cámara de electroforesis conteniendo una solución Buffer TAE 1x y se cargó en cada pozo de este con una mezcla de 1 µl de cada muestra de DNA y 0.3 µl de el colorante correspondiente. Se encendió la cámara de electroforesis a 60 V y se dejaron correr las muestras durante 20 minutos a 80 volts.

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) según la movilidad de éstas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga. Los ácidos nucleicos ya disponen de una carga eléctrica negativa, que los dirigirá al polo positivo, mientras que las proteínas se cargan con sustancias como el SDS, que incorpora cargas negativas de una manera dependiente del peso molecular.

Al poner la mezcla de moléculas y aplicar corriente eléctrica, éstas se mueven y pasan a través del gel, por la que las pequeñas se desplazan mejor y más rápidamente, en tanto que las más grandes quedarán cerca del lugar de aplicación de la muestra. Por último se retira el gel de la cámara de electroforesis para observar la muestra en una cámara de luz ultravioleta y comprobar así la integridad del DNA.

GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

Esta técnica se realizó tanto en los DNAs procedentes de los casos (pacientes con ES) como en aproximadamente igual número de controles, para determinar las variaciones alélicas de cada uno de los polimorfismos. Para ello se diseñaron las sondas para la identificación de dichas variantes y su posterior análisis utilizando un termociclador LightCycler 1.5 (*Roche Diagnostics*).

GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO eNOS T-786C

Para la determinación de las variantes alélicas de este polimorfismo de eNOS se utilizaron los siguientes oligonucleótidos [5'CACCCCCACCCTGTCATTC3'] antisentido (eNO Sp A) y [5'AGTCTCTGAGGTCTCGAAATCACG3'] sentido (eNOS Sp S) a una concentración de 20 µM en solución stock. Y se utilizaron las sondas [5'CCCTGCCTCAGCCCTAGTCTCTCT3'] (T-786C Anc) y [5'TCTTCCCTGGCCGGCTG3'] (T-786C Sen) en una concentración de 20 µM en solución stock.

También se utilizó el LightCycler FastStart DNA Master Hyprobe (Roche Diagnostics Cat.-No. 03 003 248 001). En la siguiente tabla se muestra el volumen de cada uno de los componentes por reacción:

Agua MiliQ	7.0 μ l
Master	1.3 μ l
Oligo A	0.25 μ l
Oligo S	0.25 μ l
Sonda Anc	0.1 μ l
Sonda Sen	0.1 μ l
DNA	1.0 μ l
Volumen total	10.0 μ l

Las reacciones se realizaron con las siguientes condiciones:

-Desnaturalización 1x a 95 °C, 10 min.

-Amplificación 35x a 95 °C, 10 seg; 60 °C, 10 seg; 72 °C, 12 seg.

-Melting 1x a 95 °C, 30 seg; 65 °C, 05 seg; 40 °C, 10 seg; 85 °C, 01 seg.

-Enfriamiento 1x a 40 °C, 40 seg.

GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO eNOS G894T

La genotipificación de este polimorfismo se hizo con el kit LightMix de eNOS G894T de humano (Roche Diagnostics Cat.-No. 40-0380-16) y el LightCycler FastStart DNA Master Hyprobe. Los volúmenes que se utilizaron por reacción fueron los siguientes:

Agua MiliQ	5.7 μ l
Reaction Mix	2.0 μ l
Master	1.3 μ l
DNA	1.0 μ l
Volumen Total	10.0 μ l

En la reacción de PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

Las sondas frecuentemente empleadas en esta técnica, son oligonucleótidos que presentan fluorocromos en ambos extremos y tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento de DNA que se quiere amplificar. Uno de los fluorocromos actúa como donador de fluorescencia en el extremo 5' y el otro como aceptor de esta fluorescencia en el extremo 3'. La DNA polimerasa se desplaza sobre la cadena de DNA sintetizando la cadena complementaria a partir de un fragmento de DNA que sirve de molde (cebador). Al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado, la hidroliza. El fluorocromo del extremo 5' de la sonda (el donador) es liberado. El fluorocromo aceptor no puede entonces absorber la fluorescencia del donador por estar alejado de él espacialmente. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de DNA presente, y la representa gráficamente.

Esta técnica permite genera millones de copias de un segmento corto de DNA que requiere pequeñas secuencias de DNA sintético y que actúan como iniciadores o *primers*, que son complementarios de las regiones flanqueantes de la zona de interés. La PCR se produce mediante varios ciclos (generalmente de 25 a 35), cada uno de los cuales consta usualmente de tres pasos, efectuados mediante cambios de temperatura:

I- Desnaturalización: ruptura de los puentes de hidrógeno, quedando el DNA como simple cadena.

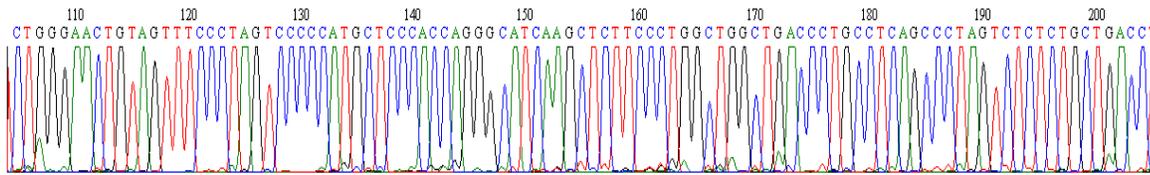
II- Alineamiento: de los primers u oligonucleótidos que se alinean a las zonas complementarias.

III- Extensión: se sintetiza DNA, con los nucleótidos y una DNA polimerasa que se hallan en la mezcla de reacción, generándose al final del proceso millones de copias de la región de interés.

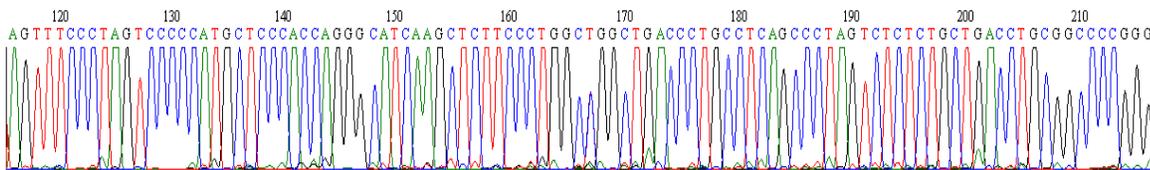
Secuencias para identificar genotipos del polimorfismo T-786C



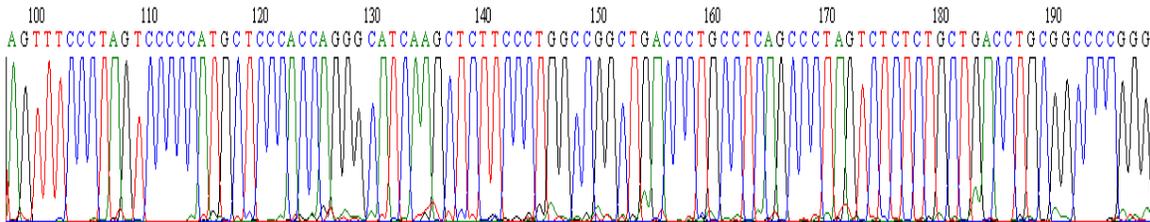
Wild Type



Heterocigoto



Homocigoto



Se tomaron dos muestras de DNA de cada uno de los tres genotipos del polimorfismo T-786C encontrados, se purificaron y secuenciaron para corroborar así las variaciones alélicas.