



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE ATENCIÓN MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD.  
UMAE “DR ANTONIO FRAGA MOURET”  
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA.  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**

**“EXPRESION DE LA SINTASA DE OXIDO NITRICO (ENDOTELIAL E INDUCIBLE) EN  
PIEL DE PACIENTES CON ESCLERODERMIA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

PRESENTA:

DRA. MARIA DE LOS ANGELES CORTES CEPEDA

**ASESORES:**

DRA MARIA DEL PILAR CRUZ DOMINGUEZ

DRA OLGA LIDIA VERA LASTRA



MEXICO, DF 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.

# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE ATENCIÓN MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD.  
UMAE "DR ANTONIO FRAGA MOURET"  
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA.  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

## **"EXPRESION DE LA SINTASA DE OXIDO NITRICO (ENDOTELIAL E INDUCIBLE) EN PIEL DE PACIENTES CON ESCLERODERMIA "**

### **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

PRESENTA:

DRA. MARIA DE LOS ANGELES CORTES CEPEDA

**ASESOR E INVESTIGADOR PRINCIPAL:**

DRA MARIA DEL PILAR CRUZ DOMINGUEZ

**INVESTIGADORES ASOCIADOS**

DRA. OLGA LIDIA VERA LASTRA

**MEXICO DF, 2011**

**NO . de registro de tesis: 2010-3501-69**

---

**Dr. Jesus Arenas Osuna.**

**Jefe de La Division de investigación y Educacion Medica**

**Unidad Medica de Alta Especialidad**

**Hospital de Especilidades Dr Antonio Fraga Mouret**

**Centro Medico Nacional La Raza**

---

**Dra Olga Lidia Vera Lastra**

**Profesora titular y asesor principal**

**Unidad Medica de Alta Especialidad**

**Hospital de Especilidades Dr Antonio Fraga Mouret**

**Centro Medico Nacional La Raza**

---

**Dra: María de los Ángeles Cortés Cepeda**

**Residente de Medicina Interna**

## INDICE

1. Resumen..... 5
2. Antecedentes científicos..... 7
3. Material y Métodos..... 15
4. Resultados.....18
5. Discusión.....26
6. Conclusiones.....28

## RESUMEN

**TITULO:** Expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial e inducible (eNOS e iNOS) en piel de pacientes con esclerosis sistémica (ES)

**OBJETIVO:** comparar la expresión dérmica de la NOS (eNOS e iNOS) entre quienes tienen y no esclerodermia, entre los subtipos y la severidad del fenómeno de Raynaud

**PACIENTES Y MÉTODOS:** Casos y controles. Se incluyeron 57 biopsias de piel procedentes de 42 pacientes con ES y de 15 controles. En el expediente clínico se revisaron datos demográficos. La sintasa de óxido nítrico inducible y endotelial determinada por PCR tiempo real fue capturada previo al análisis clínico de los pacientes con la escala de severidad de Medsger (incluido Raynaud). Para el análisis estadístico, se emplearon T de Student y correlación de Spearman.

**RESULTADOS:** El tiempo de evolución de ES fue  $7.6 \pm 5.6$  y  $6.8 \pm 4.7$  años para limitada y difusa respectivamente. El 90.5% fueron mujeres. Lo más frecuente fue el fenómeno de Raynaud que requería el uso de vasodilatadores. En ES limitada la expresión dérmica de eNOS fue  $10.17 \pm 5.5$  e iNOS de  $7.6 \pm 13.05$  veces mayor que el control. En ES difusa la expresión de eNOS fue  $1.74 \pm 1.16$  e iNOS de  $2.1 \pm 2.5$  veces mayor que el control y es independiente de la severidad del Raynaud.

**CONCLUSIÓN:** La expresión de eNOS está aumentada en ES, la iNOS está expresada en esclerosis sistémica limitada y no hay correlación con la severidad del fenómeno de Raynaud.

Palabras clave: esclerosis sistémica, sintasa de óxido nítrico endotelial e inducible. Fenómeno de Raynaud

## **ABSTRACT**

Expression of nitric oxide synthetase (NOS) endothelial (e) and inducible (i) in skin of systemic sclerosis (SS) patients.

### **OBJECTIVE**

To determine dermal expression of NOS (e) and (i) between patients with scleroderma vS control group and between Ssc diffuse and Ssc limited. As well as of severity of raynaud's phenomenon.

### **PATIENTS AND METHODS**

Cases and controls study. We included 57 biopsies from 42 SS patients and 15 controls. Examination of demographyc data. Enzyme eNOS and iNOS were determined by polymerase chain reaction in real time previous to patient clinic evaluation with Medsger scale (Raynaud included). For statistical analysis we used T Student and Spearman correlation.

### **RESULTS**

Evolution SS time was 7.6+/-5.6 and 6.8 +/- 4.7 years for limited an diffuse SS respectively, 90.5% were women. Raynaud that required vasodilator therapy was the most frecuently. The expression of endothelial NOS was 10.17 +-15.5 and inducible NOS 7.6 +-13.05 for limited SS respect to controls. For diffuse SS eNOS expression was 1.74 +-1.6 and iNOS 2.1+-2.5 respect to controls and independent to raynaud severity.

### **CONCLUSIONS**

Dermal eNOS and iNOS expression was higher in SSc patients in comparison with the control group and without correlation with Raynaud severity.

Key words: nitric oxide synthase enzymes endotelial and Inducible, systemic sclerosis Raynaud's phenomenon

## INTRODUCCIÓN

La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad del tejido conjuntivo, de causa desconocida, que se distingue por excesiva producción de la matriz extracelular (colágeno), que produce fibrosis en la piel y en algunos órganos internos, la lesión patológica inicial es en la microvasculatura con daño endotelial e isquemia tisular. También se caracteriza por alteraciones inmunológicas. Una de las primeras manifestaciones clínicas es el vasoespasmó en manos y pies descrito como fenómeno de Raynaud ya que presenta alteraciones hemodinámicas que disminuyen la presión capilar sanguínea que se cree, es por aumento de la resistencia precapilar funcional, es evidente que la relajación anormal del vaso sanguíneo y la vasoconstricción episódica contribuyen al fenómeno de Raynaud, se han documentado mayores niveles de agentes vasoconstrictores en células de músculo liso microvascular en la piel de pacientes con ES. Aunque los componentes vasoconstrictores han llamado mucho la atención poco se sabe de la pérdida de la vasorelajación. En este caso, la fibrosis periadventicial de la microvasculatura dará como resultado vasos rígidos además de que se ha documentado desregulación del control neurovascular, punto clave para la patogénesis del fenómeno de Raynaud y la ES. La molécula pleiotrópica óxido nítrico (ON) inicialmente considerado como factor relajante derivado del endotelio (FRDE) se ha documentado participa en una serie de procesos fisiológicos. Este producido por tres diferentes enzimas sintasas de óxido nítrico (NOS), bajo condiciones homeostáticas vasculares el ON es derivado de la forma constitutiva o sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y es el vasodilatador endógeno más potente que se conoce, inhibe la interacción de plaquetas y leucocitos, suprime la proliferación de músculo liso vascular, inhibe la generación de anión superóxido vascular, activa metaloproteinasas de la matriz y mejora la proliferación y supervivencia de células endoteliales. La deficiencia en la síntesis se asocia a enfermedades vasculares caracterizadas por proliferación miointimal, inflamación y trombosis por el contrario, la síntesis de ON puede reducir e incluso revertir la progresión de enfermedades vasculares. En consecuencia se ha asociado al ON en la patogénesis de la ES sin embargo los recientes informes de alteración en el metabolismo del ON en pacientes con ES muestran resultados contradictorios. Los primeros estudios mostraron bajos niveles séricos basales de nitritos en pacientes con ES en comparación con pacientes controles sanos. Se demostró la formación



disminuida de nitrito en el enfriamiento corporal total en este grupo de pacientes que sugiere generación defectuosa de ON, del mismo modo, mejora la vasodilatación después del tratamiento con L-arginina (sustrato natural del ON) observado en el mismo grupo de pacientes con fenómeno de Raynaud secundario a ES. En otros estudios se ha demostrado concentraciones séricas aumentadas de nitritos en pacientes con ES reportando el incremento en la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible iNOS derivada de fibroblastos en comparación con un grupo control de sanos. Aunque la evidencia indica que hay un defecto en la vía ON vascular en la ES el trastorno no está bien definido, en consecuencia realizamos el siguiente estudio para comprobar definitivamente si la expresión de la forma constitutiva eNOS es diferente en las células endoteliales microvasculares en pacientes con esclerosis sistémica en comparación con un grupo control de pacientes sanos. Se han hecho investigaciones en modelos experimentales en piel de ratón con ES que han mostrado un poco del mecanismo implicado en el proceso de la enfermedad ya que sugieren que hay un metabolismo anormal de ON en estos modelos con fibrosis y disfunción vascular, particularmente en la piel.

La ES se clasifica en difusa, limitada y esclerodermia sin esclerodermia. La esclerodermia se distingue por el endurecimiento de la piel generalizado en la forma difusa y en las extremidades distales cara y cuello en la limitada, el síndrome de CREST es una forma limitada de esta enfermedad, en la esclerodermia sin esclerodermia la piel no está afectada, solo existe daño en órganos internos.

Los criterios diagnósticos son la esclerodermia proximal a las articulaciones metacarpofalángicas más dos de los siguientes criterios menores: esclerodactilia, cicatrices digitales, pérdida de tejido en los pulpejos de los dedos y fibrosis pulmonar bibasal. Para su tratamiento se han administrado medicamentos con resultados desalentadores.

La piel es el órgano blanco implicado en esta enfermedad y su afección se distingue por tres fases: 1) fase edematosa, 2) fase de induración, y 3) fase atrófica. La fase edematosa se debe al depósito en la dermis de glucosaminoglucanos, los pacientes se quejan de hinchazón, con disminución de la elasticidad de la piel, principalmente antebrazos, los, brazos, las manos, los pies, las piernas y los muslos; estos síntomas pueden acompañarse de prurito. Esta fase puede durar meses, luego aparece el endurecimiento de la

piel. Los dedos de las manos se encuentran edematosos (dedos en salchicha), con pérdida de los pliegues y anexos, hay sequedad y fisuras; la pérdida de los pulpejos es por isquemia y es frecuente en esta fase. La fase de induración aparece durante la evolución de la esclerosis sistémica, la piel toma una textura dura, firme, tensa y acartonada, con imposibilidad de pellizcarse. Esta adherida a planos profundos (tendones y articulaciones), lo que ocasiona una marcada limitación de los movimientos y contracturas. Disminuye la apertura bucal, se observa la esclerodactilia, las fascias son inexpresivas y se aprecian pliegues peribucales. Esta fase se distingue por fibrosis y esclerosis; también hay sequedad y prurito. Esta fase puede persistir y progresar de uno a tres años, o más. La inflamación y la fibrosis pueden cesar después de varios años y aparecer la fase atrófica.

La piel es el órgano más afectado en la esclerodermia, en las preparaciones histológicas con hematoxilina y eosina, la alteración histológica de la piel consiste en atrofia de la epidermis que muestra adelgazamiento y aplanamiento, con discreta hiperpigmentación de la capa basal de queratitocitos. Las dermis papilar y reticular muestran condensación acentuada de las bandas de colágena, lo que atrapa a los anexos cutáneos que se observan hipotróficos o disminuidos de tamaño. Adicionalmente se puede encontrar infiltrado inflamatorio linfocitario alrededor de capilares del plexo superficial, sin vasculitis. Estos cambios corresponden a dermatitis perivascular superficial, que comparten distintos procesos inflamatorios reactivos de la piel. Otros hallazgos histopatológicos son variados, las glándulas sudoríparas se encuentran desprovistas de tejido subcutáneo y se encuentran dentro de la dermis, no en la hipodermis. Las fibras de colágeno están organizadas en haces densamente empaquetados y parecen comprimidos por la reducción de los espacios interfibrilares. El número de fibroblastos es normal o está disminuido. El tejido adiposo se encuentra sustituido por tejido conectivo anormalmente homogéneo formado por fibras de colágena onduladas. El tejido elástico está reducido y consiste en fibras finas onduladas y cortas.

La extensión de afección de la piel sirve como parámetro para clasificar la esclerosis sistémica en limitada o difusa. (1) La patogenia de la esclerosis sistémica (ES) es extremadamente compleja y a pesar de numerosos estudios que han examinado varios y diferentes aspectos, los mecanismos precisos involucrados no han sido bien aclarados. La

patogénesis inicia con un estímulo ambiental. El daño celular endotelial puede dispararse por autoanticuerpos específicos para estas células, virus, citocinas inflamatorias o radicales reactivos de oxígeno que se generan durante la isquemia. Sobre un individuo predispuesto genéticamente, se activa el sistema inmunitario con liberación de mediadores inmunológicos que producen daño endotelial, proliferación de fibroblastos y síntesis de colágeno. No está claro cuál de estos procesos es el más importante. La secuencia de eventos postulada en la patogenia de la ES es un proceso iniciado por lesiones vasculares que inducen inflamación crónica, con la participación de macrófagos y linfocitos T, además de la activación de linfocitos B, lo cual resulta en la generación de anticuerpos. (2) (3)

Los productos secretados por parte de las células inflamatorias conllevan a la activación del fibroblasto y a su conversión fenotípica en miofibroblastos, un evento crucial en el desarrollo de la fibrosis. Al dañarse el endotelio inicia la liberación de precursores endoteliales, también aumenta la expresión de moléculas de adhesión (ICAM, VCAM 1 y E-selectina) aumenta la producción de endotelina-1 y disminuye la producción de prostaciclina, producción elevada de moléculas de oxígeno y péptidos protrombóticos. (4) (5) Toda esta expresión conlleva a mayor reclutamiento de células inflamatorias, y a la producción de factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas y endotelina-1 que causan cambios vasculoproliferativos severos. Estos cambios incluyen la mayor proliferación de células músculo liso, marcada acumulación de tejido fibroso en las capas de la pared vascular agrupación de plaquetas y trombosis intravascular. Las lesiones vasculares fibroproliferativas y la trombosis intravascular de la ES inevitablemente resultan en la obliteración progresiva de los vasos sanguíneos y en hipoxia en los tejidos afectados lo cual causa aún más fibrosis en los tejidos. (6-10)

La vasodilatación también parece estar afectada en pacientes con ES por deficiencia relativa de moléculas vasodilatadoras (prostaciclina, monóxido de nitrógeno, y péptidos de efecto vasodilatador relacionados con la calcitonina) y un aumento marcado en la producción y liberación de endotelina-1, el cual es un potente vasoconstrictor. En la patogenia también se ha relacionado al sistema nervioso simpático, sin embargo hay episodios de vasoespasmo que se desarrollan sin la participación de nervios simpáticos eferentes, por lo que se supone que predomina la participación de diversas sustancias

vasoactivas. Se han planteado mecanismos patogénicos como la disminución en la actividad de serotonina, aumento de la actividad de la angiotensina II y disminución de prostaglandinas vasodilatadoras. Participación del calcio porque se ha observado aumento del flujo intracelular de calcio, lo que produce hiperactividad vascular y vasoconstricción. Se han descrito también exagerada liberación de endotelinas y disminución de la sustancia P.

Los pacientes con ES presentan anomalías importantes del componente celular del sistema inmunitario. Biopsias obtenidas de la piel afectada en pacientes con ES, muestran un gran número de infiltrados perivasculares con macrófagos y linfocitos T, y unas pocas células B. La expansión de células T dentro de tejidos afectados parece ser oligoclonal, se ha demostrado tendencia Th2, población de células que, producen citocinas que promueven la fibrosis. (11, 12) Cada uno de estos efectos han sido relacionados a estrés oxidativo, que deriva de especies reactivas de oxígeno (radicales libres, óxido nítrico (ON) peróxido de hidrógeno) y de la incapacidad de los sistemas antioxidantes intrínsecos para contrarrestarlas de tal manera que causan daño oxidativo a los tejidos. El ON es radical libre importante por su función vasodilatadora y como mensajero regulando la inhibición de la agregación plaquetaria y la adhesión endotelial de los neutrófilos además de que se ha postulado como el principal antioxidante lipofílico endógeno, por su capacidad de difundir a medios hidrofóbicos y terminar reacciones de propagación de la lipoperoxidación, actuando con el alfa tocoferol para eliminar radicales lipídicos, preservando al resto de antioxidantes del daño oxidativo.

El ON está formado por la sintetasa de óxido nítrico (NOS), enzima que se encuentra en el sistema nervioso central, plaquetas y endotelio y que utiliza L-arginina como sustrato y cofactores como la tetrahidrobiopterina (THB) para formarlo, si la concentración de L-arginina es baja o la THB esta oxidada, la NOS genera cantidades significativas de anión superóxido que es una especie reactiva de oxígeno. Las formas más conocidas de la NOS son la endotelial (eNOS) dependiente de calcio y la inducible (iNOS) independiente de calcio, de acción prolongada, afectada por esteroides e involucrada en procesos patológicos como la ES. El ON en exceso puede producir daño celular, debido a que tiene propiedades depresoras miocárdicas y también puede producir apoptosis. El

comportamiento del ON como pro o antioxidante depende de la concentración de oxígeno, cuando es elevada, aumentan las reacciones oxidativas. La inhibición del ON en pacientes con ES induce activación del gen de la colagena tipo I, así como disfunción vascular. (13-14) El fenómeno de Raynaud y las principales manifestaciones de la ES esta asociado a disfunción endotelial con alteraciones estructurales dadas por hiperplasia de la intima, y por alteraciones funcionales dadas por reducción en la producción de oxido nítrico endotelial así como incremento en la producción de endotelina 1.

En la piel de un modelo experimental de esclerosis sistémica, se ha podido determinar que la concentración relativa de la forma constitutiva (eNOS) está significativamente disminuida, en contraste la forma inducible iNOS se incrementa (12, 15). En el caso de la nNOS, su regulación parece estar disminuida (18). El daño endotelial que se produce en ES, al parecer reduce la actividad de eNOS y aumenta la de iNOS generando así un ambiente proinflamatorio asociado a daño tisular (10,16,17,18,19). La producción de oxido nítrico en la piel puede generarse desde células inflamatorias, fibroblastos, folículos pilosos o células endoteliales y también desde la capa epidérmica (3). La evaluación de la producción de eNOS a partir de la *células cultivadas* del endotelio microvascular de la piel de pacientes con esclerodermia ha mostrado disminución de la expresión de mRNA de eNOS y su proteína, comparado con las mismas células procedentes de la piel de sujetos sanos, lo cual sugiere que hay un defecto intrínseco en el mecanismo de producción de oxido nítrico de la microvasculatura en ES (2). Sin embargo se debe tomar en cuenta que las células en cultivo pudieran no mostrar el mismo fenotipo que in vivo. En otro estudio se uso un *modelo de esclerodermia* producido en ratón TSK-1/+, donde se ha podido demostrar claramente una reducción en la expresión genética (figura 1) y en la proteína de eNOS, respecto a ratones wild type, lo cual estuvo asociado a menor actividad de ON en los ratones con esclerodermia, aun con concentraciones similares de ON, lo cual indica que hay un metabolismo anormal de ON. Estos cambios estuvieron asociados a reducción en la expresión de moléculas antioxidantes. Un hallazgo importante fue que estos cambios no pudieron demostrarse en el tejido pulmonar. Finalmente se propuso en este estudio, buscar nuevas terapias para esclerodermia usando estos ratones, sin embargo desconocemos si los cambios observados son equivalentes en seres humanos (3).

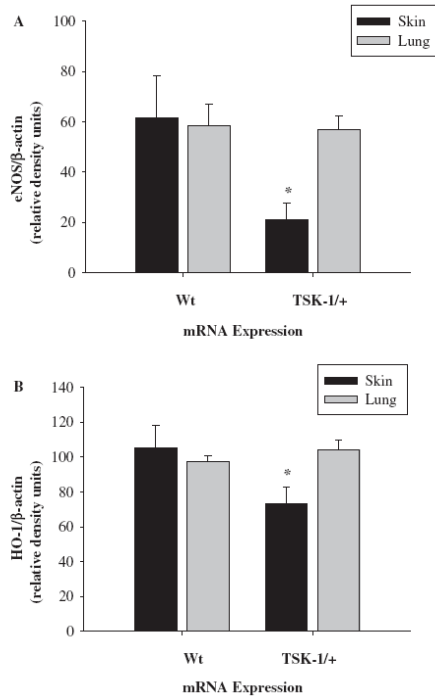


Figura 1. Expresión comparativa de la expresión de mRNA de la sintasa de óxido nítrico endotelial en la piel de ratones con enfermedad tipo esclerodermia. A. Dooley1, S. Y. Low A. Rheumatology 2008; 47:272–280

Apoyados en estos escasos antecedentes y a que se debe abundar más sobre la fisiopatología y mecanismos moleculares en los cuales participa el óxido nítrico de esta patología y así, dar nuevas alternativas terapéuticas precoces dirigidas a retrasar tanto las manifestaciones clínicas graves e irreversibles, así como también a mejorar calidad de vida del paciente con esclerodermia hemos considerado evaluar la expresión de la sintasa de óxido nítrico tanto inducible como endotelial en piel de estos pacientes y la relación que existe con la severidad del fenómeno de raynaud. *Figura 2*



Figura2. Autoamputación y úlceras en manos de paciente con esclerosis sistémica difusa

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Objetivo: comparar la expresión dérmica de la NOS (eNOS e iNOS) entre quienes tienen y no esclerodermia, entre los subtipos y la severidad del fenómeno de raynaud

Diseño: retrospectivo, transversal, observacional, analítico, de casos y controles.

Lugar de estudio: el estudio se realizó en el departamento de medicina interna del hospital de especialidades del CMN La Raza. De diciembre 2009 a julio 2010 en pacientes con y sin esclerosis sistémica tanto difusa como limitada. En el expediente clínico de todos los pacientes se revisaron datos demográficos como son edad, sexo, años de diagnóstico de la enfermedad, se revisaron también los registros cuantitativos de expresión de la enzima sintasa de óxido nítrico tanto inducible como endotelial obtenida a través de biopsia de piel y utilizando el protocolo de extracción de RNA genómico por medio de digestión enzimática (disolventes orgánicos; fenol, cloroformo o ambos) y usando el método reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). (Anexo A)

Análisis Estadístico: Los resultados serán analizados con estadística comparativa: T student. La Expresión de la sintasa de óxido nítrico: en veces de expresión Respecto a la medición de severidad de RAYNAUD se realizará por correlación de Spearman. Se considerarán significantes los valores de  $p < 0.05$ .



De forma telefónica se dio cita en el HECMN La Raza a los pacientes incluidos en el protocolo de estudio con esclerosis sistémica de acuerdo a los criterios de El Colegio Americano de Reumatología, para una evaluación médica específicamente datos clínicos y características contenidas en la escala de severidad de Medsger como son, palidez, cianosis e hiperemia de los dedos, cicatrices, ulceración, necrosis o gangrena digital evidente y se les interrogó sobre la necesidad del uso de vasodilatadores. Todos estos datos fueron registrados a través de hoja de captura de datos. (Anexo B).

## ANALISIS ESTADISTICO

Estadística descriptiva, T student, r Spearman.

## RESULTADOS

Se investigaron las características demográficas y clínicas, en expediente clínico y evaluación médica de pacientes con esclerosis sistémica. La enfermedad fue designada como limitada o difusa sobre la base de la piel participación (como se documenta en el expediente médico o como se diagnostica en un examen físico).

La población de estudio estuvo constituida por 42 pacientes, diagnosticados con ES ya sea variedad limitada o difusa, y que fueron tratados en este Hospital durante los últimos 6 meses. Los datos de los pacientes fueron tomados del expediente clínico en intervalo de tiempo de 6 meses desde diciembre 2009 a junio 2010.

### Análisis demográfico:

Se estudio un total de 42 pacientes con esclerosis sistémica 21 (50%) forma limitada y 21 (50%) de la forma difusa, 90.47% eran mujeres y 9.5 % eran hombres. *tabla 1*

La edad promedio en ES limitada 49.3 años +/- 12.9 y para ES difusa 44.6 años +/-13.8. Y el promedio de años desde el diagnóstico de la enfermedad en la ES limitada 7.6 años +/- 5.6 y 6.8 años +/- 4.8 en la ES difusa

CARACTERÍSTICAS	FRECUENCIA	%
MUJERES	38	90.47
HOMBRES	4	9.5
LIMITADA	21	50
DIFUSA	21	50

Tabla 1. Descripción de los sujetos de estudio. Se muestran las frecuencias para género y para subtipo

Los resultados del análisis de los datos clínicos y demográficos son los siguientes:

En ES limitada no se observó pérdida de peso, más del 50 % de los pacientes usaban vasodilatadores, sin lesiones, la mayor parte de los pacientes con un rodnan leve entre 1 y 14 puntos, mostraron poca afección en tendones con valores entre 0-1.9cm de distancia entre los dedos y la palma de la mano. No hubo evidencia de debilidad y más del 70% presentó alteración gastrointestinal sobretodo esofágica. En relación a las alteraciones pulmonares, renales y cardíacas con poca o ninguna alteración.

En pacientes con ES difusa tampoco se encontró pérdida de peso, sin embargo, la afección a piel en 65% de los pacientes se encontraba por arriba de 15 puntos en la escala de Rodnan. También se encontró afección a tendones en 60% de los pacientes con una distancia dedos-palma de más de 2cm. 70% de los pacientes presentó algún grado de debilidad, y 55%, alteraciones severas de la motilidad esofágica, malabsorción o desnutrición. Afección pulmonar con fibrosis y capacidad vital forzada de menos de 60% presentaron más del 50% de los pacientes incluidos en este subtipo de ES. Al igual que en ES limitada la función cardíaca y renal resultaron poco afectadas. *Tabla 2*

	TIPO ESCLEROSIS SISTEMICA			
	LIMITADA		DIFUSA	
	n = 21	% columna	n = 21	% columna
GENERAL NORMAL	16 <sub>a</sub>	76.2%	10 <sub>a</sub>	47.6%
< 5-9kg, Hto 33-37%	4 <sub>a</sub>	19.0%	6 <sub>a</sub>	28.6%
<10-15kg, Hto29-33%	1 <sup>1</sup>		2 <sub>a</sub>	9.5%
<15-20kg,Hto25-29%	1 <sup>1</sup>		1 <sub>a</sub>	4.8%
>20 kg,Hto< 25%	1 <sub>a</sub>	4.8%	2 <sub>a</sub>	9.5%
RAYNAUD normal	2 <sub>a</sub>	9.5%	1 <sub>a</sub>	4.8%
vasodilatador	13 <sub>a</sub>	61.9%	10 <sub>a</sub>	47.6%
Cicatrices	3 <sub>a</sub>	14.3%	5 <sub>a</sub>	23.8%

	ulceras digitales	1 <sub>a</sub>	4.8%	5 <sub>a</sub>	23.8%
	Gangrena digital	2 <sub>a</sub>	9.5%	1	
PIEL	Rodnan 0	2 <sub>a</sub>	9.5%	1	
	1 a 14	11 <sub>a</sub>	52.4%	7 <sub>a</sub>	33.3%
	15 a 29	7 <sub>a</sub>	33.3%	8 <sub>a</sub>	38.1%
	30 a 39	1 <sub>a</sub>	4.8%	3 <sub>a</sub>	14.3%
	40 o mas	1		3 <sub>a</sub>	14.3%
TENDON	0 a 0.9 cm	9 <sub>a</sub>	42.9%	6 <sub>a</sub>	28.6%
	1 a 1.9 cm	10 <sub>a</sub>	47.6%	3 <sub>b</sub>	14.3%
	2 a 3.9 cm	2 <sub>a</sub>	9.5%	6 <sub>a</sub>	28.6%
	4 a 4.9 cm	1		3 <sub>a</sub>	14.3%
	mas 5 cm	1		3 <sub>a</sub>	14.3%
MUSCULO	sinDebilidad	10 <sub>a</sub>	47.6%	6 <sub>a</sub>	28.6%
	DebLeve	8 <sub>a</sub>	38.1%	7 <sub>a</sub>	33.3%
	DebMod	3 <sub>a</sub>	14.3%	6 <sub>a</sub>	28.6%
	DebSevera	1		2 <sub>a</sub>	9.5%
	AydaCaminar	1		1	
GASTROIN T	Normal	1		2 <sub>a</sub>	9.5%
	HipmotEsof	15 <sub>a</sub>	71.4%	7 <sub>b</sub>	33.3%
	SevHipmtEsof	5 <sub>a</sub>	23.8%	5 <sub>a</sub>	23.8%
	Sxmalabsorn	1 <sub>a</sub>	4.8%	4 <sub>a</sub>	19.0%
	hiperalimentacion	1		3 <sub>a</sub>	14.3%
PULMON	Normal	12 <sub>a</sub>	57.1%	3 <sub>b</sub>	14.3%
	CVF70-80%Fibrosis	8 <sub>a</sub>	38.1%	6 <sub>a</sub>	28.6%
	CVF50-59%oHAPleve	1 <sub>a</sub>	4.8%	9 <sub>b</sub>	42.9%
	CVF<50%oHAPmod-sev	1		2 <sub>a</sub>	9.5%
	requiereO2	1		1 <sub>a</sub>	4.8%
CORAZON	Normal	20 <sub>a</sub>	95.2%	12 <sub>b</sub>	57.1%
	DfctoCnducc/FEVI45-49%	1 <sub>a</sub>	4.8%	5 <sub>a</sub>	23.80%
	ArritHVD-HVI/FEVI40-44%	1		1 <sub>a</sub>	4.8%

	FEV<40%	1		1	
	ICCV,arritmia	1		3 <sub>a</sub>	14.3%
RIÑON	Normal		19 <sub>a</sub>	90.5%	17 <sub>a</sub> 81.0%
	Cr1.3-1.6proturia2+		1 <sub>a</sub>	4.8%	3 <sub>a</sub> 14.3%
	Cr1.7-2.9proturia3-4+		1 <sub>a</sub>	4.8%	1 <sub>a</sub> 4.8%
	Cr3	1		1	
	Dialisis	1		1	

Tabla 2: Nota: Los valores de la misma fila y subtabla que no comparten el mismo subíndice son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en la prueba de igualdad bilateral de proporciones de las columnas. Las pruebas asumen varianzas iguales.

1. Esta categoría no se utiliza en las comparaciones porque su proporción de columna es igual a cero o uno.

En esta población, se analizaron valores en expresión relativa de eNOS e iNOS tanto en pacientes con esclerosis sistémica (limitada y difusa) como en pacientes controles. *Tabla 3*

PACIENTES	eNOS	iNOS
ES LIMITADA	10.17+/- 15.5	7.6 +/- 13.05
ES DIFUSA	1.74+/-1.16	2.1 +/- 2.5
CONTROLES	1.08 +/- 0.3	1.36 +/-0.7

Tabla 3. Se muestran los valores de expresión de eNOS e iNOS en veces de expresión relativa en pacientes con esclerosis sistemática limitada, difusa y en pacientes controles

En los pacientes con esclerosis sistémica limitada la expresión de eNOS se modifico, es decir, se expreso diez veces más que en los valores controles, la iNOS se expreso en 7.6 +/- 13.05 veces de expresión. En pacientes con esclerosis sistémica difusa la eNOS tuvo

una expresión de 1.7 +/- 1.1 más que los valores controles y la iNOS tuvo una expresión de 2.1 +/- 2.5 veces de expresión.

La expresión de iNOS fue significativamente expresada en pacientes con variedad limitada, a diferencia de la variedad difusa y grupo control en donde no se observó significancia estadística. *Figura. 4, 5, 6*

Figura 4. Variedad Difusa Correlación entre eNOS e iNOS

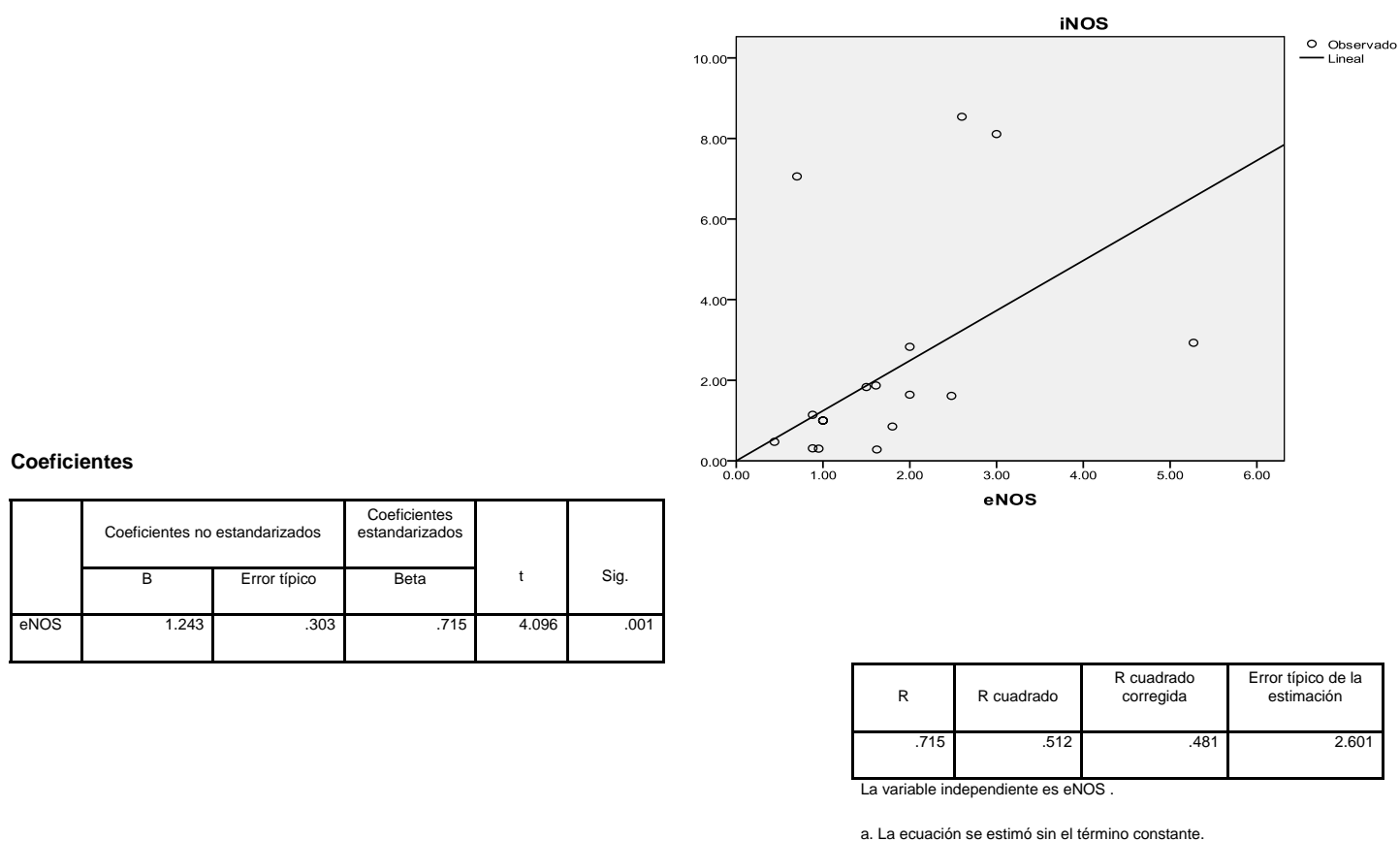
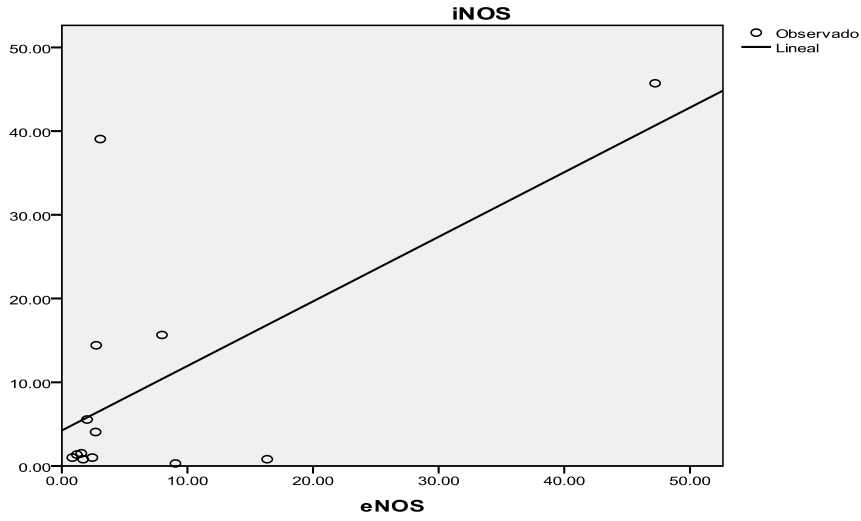


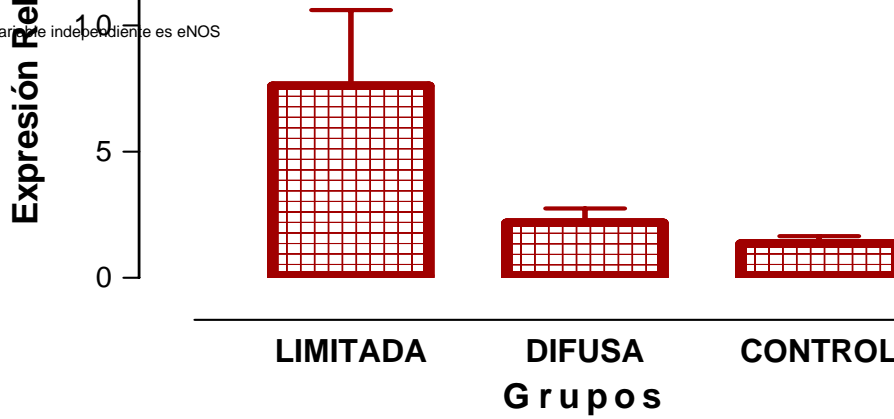
Figura 5. Variedad Limitada correlación de eNOS e iNOS



Resumen del modelo

	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	<b>iNOS</b> Error típico de la estimación
<b>Expresión Relativa</b>	.641	*.411	.358	12.239

La variable independiente es eNOS



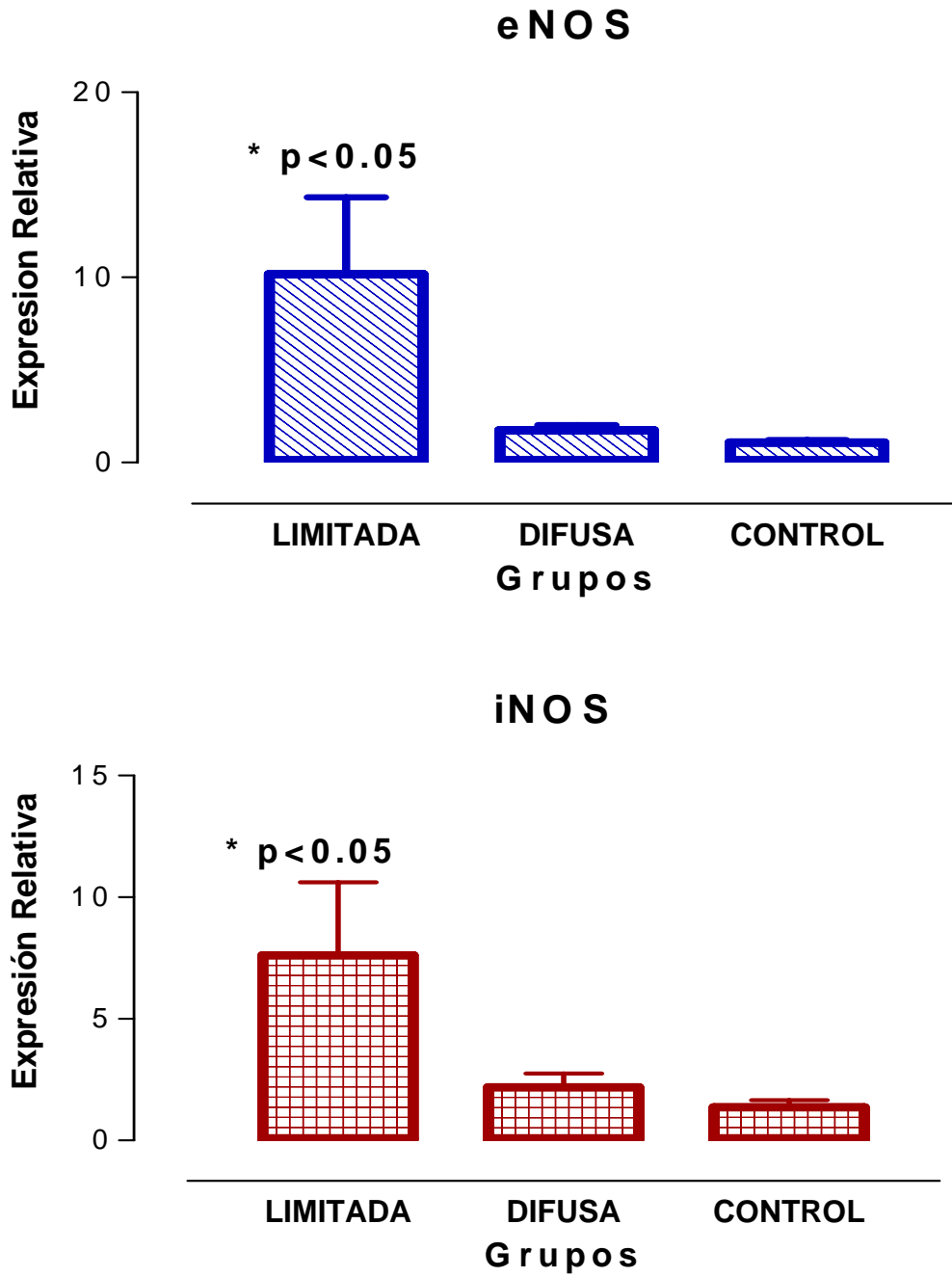


Figura 6. Muestra la comparación de la expresión relativa de la eNOS e iNOS en esclerosis sistémica limitada difusa y controles



En relación al fenómeno de Raynaud el punto más frecuentemente presentado de acuerdo a la escala de severidad de Medsger fue pacientes con fenómeno de Raynaud sin lesiones con requerimiento de vasodilatadores. *Tabla 4 y figura 7* La expresión de la eNOS e iNOS no tuvo correlación directa con el grado de severidad del raynaud, presentando poca significancia estadística con los siguientes valores: ES limitada expresión de la iNOS en correlación severidad del Raynaud sin correlación con p de 0.9, IC -0.466 a -0.465 y R de spearman de -0.01. ES difusa expresión de la iNOS en correlación con severidad de Raynaud sin asociación con p de 0.45 IC 0.47-0.43 y R de spearman -0.02

SEVERIDAD DEL FENÓMENO DE RAYNAUD	# PACIENTES	%
NORMAL	2	9.5
F. RAYNAUD QUE REQUIERE VASODILATADORES	13	61.9
CICATRICES	3	14.2

Tabla 4. Muestra la frecuencia de presentación en la escala de severidad de Medsger. Figura 7 muestra periodo de isquemia y reperfusión del fenómeno de raynaud



## DISCUSION

La disfunción endotelial es el primer estímulo para desencadenar la cascada de acontecimientos que ocasiona daño orgánico con fibrosis en la esclerosis sistémica. La causa desencadenante es desconocida aún, se ha documentado que se encuentran alteradas todas las sustancias vasoregulatoras y que provocan anormalidades vasculares tanto estructurales como funcionales, se conoce principalmente el del metabolismo anormal del óxido nítrico generado, por la isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico, que genera concentraciones molares y nitrosativas de óxido nítrico que por consiguiente, altera funciones tales como inhibición de la adhesión de leucocitos y alteraciones en la permeabilidad endotelial entre otras. Estas alteraciones se presentan predominantemente en piel ya que es el principal órgano blanco en la esclerosis sistémica, y siendo la piel un órgano extensamente vascularizado los primeros cambios detectados son lesiones vasculares, por tanto, el fenómeno de Raynaud tiene un papel central en pacientes con esta enfermedad, de las cuales se presenta en más del 90%. Sin embargo se cuenta con poca información en la literatura médica al respecto, los únicos reportes que existen para demostrar alteraciones en óxido nítrico son a través de modelos experimentales o estudios *in vitro*. (3, 10).

Nuestro estudio demuestra que existe expresión de la enzima sintasa de óxido nítrico inducible iNOS ( $p < 0.05$ ), en piel de pacientes con esclerosis sistémica, enzima que normalmente no está expresada en un ser humano sano. En este estudio retrospectivo se incluyeron 42 pacientes con esclerosis sistémica variedad difusa y limitada, para determinar la expresión de la iNOS y analizar si se presentaba modificación de eNOS y su impacto respecto a la severidad del fenómeno de Raynaud. Nuestros resultados mostraron que en nuestra población hay expresión de la iNOS, la cual no es constitutiva, y por lo tanto lo normal es que no se exprese a menos que exista inflamación. Nuestros son resultados son similares a los reportados en modelos experimentales de esclerodermia. (3) Un dato importante es que en los estudios de modelos experimentales no se ha documentado el fenómeno de raynaud por lo que no ha sido posible estudiar esa asociación, lo cual es parte del motivo de la realización de este estudio.

Al realizar la comparación entre ambos subtipos de esclerosis sistémica a través de la T de student, el promedio de la expresión de iNOS en la variedad limitada fue 7 veces más que en el control y la eNOS 10 veces más que en el control, además estas expresiones, no dependen de la severidad del Raynaud, lo cual sugiere que hay un estado inflamatorio crónico continuo y tiene relación con la evolución vascular de la enfermedad, pues a través del mismo una gran proporción de las pacientes desarrollaran involucro a otros vasos como son los pulmonares con aparición de hipertensión pulmonar o crisis renal de mal pronostico. La expresión en el subtipo difusa no tuvo significancia estadística, al realizar la correlación con la severidad del fenómeno de Raynaud tampoco se encontró asociación directa lo que sugiere que en este fenotipo de la enfermedad debe haber otros mediadores de mayor importancia pues en esta predomina la fibrosis y la vasculopatía suele ser secundaria a los cambios fibróticos, sobretodo en el caso de hipertensión pulmonar donde generalmente precede la fibrosis pulmonar severa y no como causa primaria. En este aspecto será importante evaluar la presión de la arteria pulmonar y la expresión de la NOS. En el análisis de datos clínicos y demográficos también correlacionan los datos en relación a la expresión de las sintasas y la variedad difusa, ya que se encontraron muchas más alteraciones en esta variedad, en la escala de Rodnan, mayor alteración en tendones, en el sistema gastrointestinal y en el pulmonar, en donde la causa predominante de estas anormalidades es la fibrosis más que la vasculopatía.

Respecto a la ausencia de correlación con fenómeno de Raynaud probablemente, es que se requieran de pruebas diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad como los capilaroscopia, doppler con laser, y gammagrafía con  $^{22m}\text{Tc}$ -sestamibi<sup>38</sup>. Posiblemente la manera ideal de dilucidar si existe asociación entre severidad de Raynaud y la disfunción endotelial-estrés oxidativo es un estudio de seguimiento en donde se cuenten con determinaciones tanto basales y a determinado plazo no solo de los grados de severidad de Raynaud, sino también de función endotelial y estrés oxidativo. Sin embargo debemos tomar en cuenta que la mayoría de los pacientes incluidos en el estudio requerían de vasodilatadores para controlar los episodios de vasoespasmo, también que, se realizo la valoración clínica durante primavera y verano, estaciones en donde el clima es templado, también se descarto mediante interrogatorio estrés emocional factores que mejoran de forma significativa las manifestaciones clínicas del fenómeno de Raynaud.

## CONCLUSIÓN:

Este es el primer estudio en el que se ha realizado el análisis de iNOS y eNOS a través de biopsia de piel de pacientes con esclerosis sistémica, ya que hasta la actualidad solo existe en la literatura médica datos de modelos experimentales y datos de estudios *in vitro*.

El análisis de este estudio concluye:

La expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial es constitutiva en el ser humano, lo cual quiere decir, que esta presente aún en ausencia de patología, sin embargo se encuentra aumentada en piel de pacientes con esclerosis sistémica, predominantemente en la forma limitada, que es además donde predominan las manifestaciones de tipo vascular.

La expresión de sintasa de óxido nítrico inducible solo se presenta en casos de inflamación, por lo que su presencia en la piel de los pacientes de nuestro estudio sugiere actividad dérmica inflamatoria por un lado, y por otro, sugiere anormalidades en la función del endotelio que es donde encuentra esta enzima.

No encontramos correlación entre la severidad del fenómeno de Raynaud y la expresión de la sintasa de óxido nítrico en ninguna de las dos isoformas estudiadas (endotelial e inducible). Lo cual apoya la afirmación de que estos pacientes cursan con alteraciones vasculares que dependen del tiempo y no directamente de cambios funcionales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vera Lastra OL. Esclerosis Sistémica. *Med Int Mex* 2006; 22: 231-45
2. Romero, Dan-Ning Zhang, Cooke. Differential expression of nitric oxide by dermal microvascular endothelial cells from patients with scleroderma *Vascular Medicine* 2000; 5: 147–158
3. A. Dooley<sup>1</sup>, S. Y. Low<sup>1</sup>, A. Holmes<sup>1</sup> Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis *Rheumatology* 2008;47:272–280
4. Cerinic MM, Valentini G, Sorano GG, et al. Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 32:285-95
5. Servettaz A, Guilpain P, Goulvestre C, et al. radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:1202-9
6. Kahaleh MB. Vascular involvement in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2004; suppl 33 S19-23
7. Herrick AL. vascular function in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:527-33
8. Fleming JN, Schwartz SM. The pathology of scleroderma vascular disease. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34:41-55
9. Wigley FM Vascular disease in scleroderma. *Clin rev Allergy Immunol* 2009; 36(2-3) 150-75

10. Kahaleh B. vascular disease in scleroderma: mechanisms of vascular injury. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34:57-71
11. Dooley A, Gao B, Bradley N, Abraham DJ, Black CM. Abnormal nitric oxide metabolism in systemic sclerosis: increased levels of nitrated proteins and asymmetric dimethylarginine. *Rheumatology* 2006; 45:676-684.
12. Takagi K, Kawaguchi Y, Hara M. Serum nitric oxide levels in systemic sclerosis patients: correlation between ON levels and clinical features. *Clin Exp Immunol* 2003; 134:538-44
13. Clancy MR, Amin RA, Abramson BS. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis&Rheumatism*, 2000; 41:7 1141-1151
14. Cotton SA, Herrick AI, Jayson MI. Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J Pathol* 1999; 189:273-278
15. Schmidt HH y Walter U. NO at work. *Cell*, 1994; 78:919-25.
16. Matucci.Cerinic M, Giacomelli R, Pignone A. Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma). *Ann rheum Dis*, 2001; 60:487-494
17. Matucci.Cerinic M, Kahaleh B. The beauty and the beast: the nitric oxide paradox in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2002; 41:843-847
18. Kahaleh BM, Fan P. Down regulation of nitric oxide synthase gene in microvascular endothelial cells from lesional scleroderma: assessment by quantitative RT-PCR and possible role for cytotoxic T cells. *Arthritis Rheum* 1998 ; 41(Suppl):1469
19. Ibbá-Manneschi L, Niislao S, Milia AF. Variations of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Systemic sclerosis Skin. *Arthritis&Rheumatism* 2006; 54:202-213

20. Romero Li, Zhang DN, Cooke JP. Differential expression of nitric oxide by termal microvascular endothelial cells from patients with scleroderma. *Vasc Med* 2000; 5:147-158

## **ANEXO A METODOLOGIA DE BIOLOGIA MOLECULAR**

### **Extracción de RNA Genómico a partir de piel**

Se utilizo el protocolo de extracción de RNA genómico por medio de digestión enzimática (disolventes orgánicos; fenol, cloroformo o ambos). A cada paciente se le extrajo un fragmento de piel el cual se conservo a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tubos falcon con EDTA. Después que cada muestra se descongelo, y se le agrego solución buffer de citrato, se mezclo y centrifugo, para romper las células sanguíneas (membranas). Se desecho la porción superior del sobrenadante y se le agrego la solución buffer, se mezclo y se centrifugo de nuevo. Después se desecha el sobrenadante y el pellet se resuspende en una solución de detergente SDS y proteinasa K para desnaturalizar enzimas restantes, y la mezcla es incubada a  $55^{\circ}\text{C}$  durante una hora con el fin de homogeneizar la mezcla. Posteriormente se extrae el RNA utilizando una solución de fenol cloroformo isoamil alcohol y después de centrifugar se transfiere la fase acuosa (proteínas desnaturalizadas) a un tubo eppendorf nuevo. Así el RNA se lava y precipita con etanol, se resuspende en solución buffer, y se precipita una segunda vez con etanol. Por último se seca el pellet de RNA y se le agrega solución buffer para resuspenderlo y mantenerlo en incubación a  $55^{\circ}\text{C}$  durante una noche. Después de este tiempo se cuantificará el RNA y se comprobará su integridad en gel de agarosa para finalmente conservarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización posterior.

### **Cuantificación de RNA**

Para la cuantificación del RNA se utilizará un espectrofotómetro (JENWAY 6305). Las longitudes de onda serán de entre 260nm y 280nm, con las cuales se determinará la absorbancia de cada muestra. Para ello se diluyen 5 $\mu\text{l}$  de RNA en 955 $\mu\text{l}$  de agua bidestilada. Una vez cuantificado el RNA se realizarán diluciones para dejar todas las muestras a una concentración de 100ng.

### **Preparación del Gel de Agarosa**

Las condiciones requeridas en el laboratorio son las siguientes: En 30 ml de agua bidestilada, se añaden 450 mg de agarosa y 600  $\mu\text{l}$  de TAE 50x, calentar hasta disolver completamente la agarosa, enfriar para después añadir 1.5  $\mu\text{l}$  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 coloca en una cámara de electroforesis conteniendo una solución buffer TAE 1x y se carga en cada pozo de este la muestra de RNA y el colorante correspondiente, se enciende la cámara y se deja correr la muestra 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 RNA.

### **Técnica de PCR en Tiempo Real**

Se diseñará las sondas específicas para el análisis e identificación de las variantes alélicas a estudiar mediante PCR-tiempo real.

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 RNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de RNA 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 RNA 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 RNA polimerasa se desplaza sobre la cadena de RNA 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 RNA presente, y la representa gráficamente.

Esta técnica permite genera millones de copias de un segmento corto de RNA que requiere pequeñas secuencias de RNA 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 RNA como simple cadena.

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

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

Para realizar la técnica se necesitan:

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el sustrato para polimerizar nuevo RNA. Dos cebadores (primers), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del RNA. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción.

Iones divalentes. Se suele usar magnesio ( $Mg^{2+}$ ), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso ( $Mn^{2+}$ ), para mutagénesis de RNA mediante PCR, ya que altas concentraciones de  $Mn^{2+}$  incrementan la tasa de error durante la síntesis de RNA. Actúan como cofactores de la polimerasa.

Una solución tampón que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la RNA polimerasa.

RNA polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de  $70^{\circ}C$  (la más común es la Taq polimerasa).

RNA molde, que contiene la región de RNA que se va a amplificar.

Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo.

**ANEXO B HOJA DE CAPTURA DE DATOS (ESCLERODERMIA)**

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

2) Dirección: \_\_\_\_\_

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

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

7) Limitada\_\_ Difusa\_\_

8) eNOS: \_\_\_\_\_

9) iNOS: \_\_\_\_\_

**ESCALA DE SEVERIDAD DEL RAYNAUD**

1. NORMAL	
2. F. RAYNAUD QUE REQUIERE VASODILATADORES	
3. CICATRICES	
4. ÚLCERAS	
5. GANGRENA O AUTOAMPUTACIÓN	