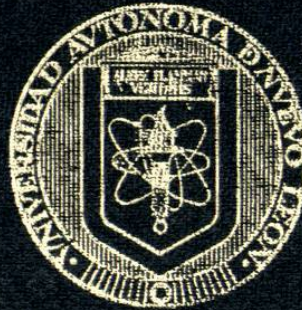


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS G-308A
Y G-238A DEL GEN TNF- α EN PACIENTES CON
ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHOLICA
(NASH) ASOCIADA A OBESIDAD

Por

Q.F.B. KARINA DEL CARMEN TRUJILLO MURILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

Octubre, 2003

c.1

2003

T7

.E7

RC848

TM

Q.F.B. KARINA DEL CARME TRUJILLO MURILLO



1080124314

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

Aprobación de la Tesis:



Dr. HERIBERTO GARCÍA PÉREZ RODRÍGUEZ
Directora de Tesis

FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS G-308A
Y G-238A DEL GEN TNF- α EN PACIENTES CON
ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHOLICA
(NASH) ASOCIADA A OBESIDAD

Dr. HUGO A. SALDARRIENA
Por

Q.F.B. KARINA DEL CARMEN TRUJILLO MURILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

Octubre, 2003



TM

RC 848

• E7

T7

2003



**FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS G-308A Y G-238A DEL GEN
TNF- α EN PACIENTES CON ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA
(NASH) ASOCIADA A OBESIDAD**


Aprobación de la Tesis:



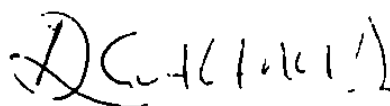
Dra. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Director de Tesis



Dr. FRANCISCO J. BOSQUES PADILLA
Co-Director de Tesis



Dr. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



Dr. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez y la Codirección del Dr. Francisco J. Bosques Padilla del Servicio de Gastroenterología y el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña del Departamento de Bioquímica.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez**, por su confianza, sus consejos, por brindarme la oportunidad de iniciarme en el campo de la investigación. Muchas gracias por todo.

Al **Dr. Francisco J. Bosques Padilla**, por todo el apoyo que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. Hugo A. Barrera Saldaña**, por permitirme ser parte de la ULIEG.

A la **Dra. Irma Calderón**, por su ayuda en el desarrollo de este estudio.

Al los cirujanos **Dr. Ricardo Salinas** y **Dr. Pablo Zorrilla**, por su invaluable ayuda.

A los patólogos **Dr. Alberto Niderhauser** y el **Dr. Juan P. Flores**, por su disponibilidad para participar en el estudio.

De manera especial a todos los que coincidimos en el laboratorio de Biología Celular a **Bela, Polo, Mta. Lolita** y **Químico Sergio**.

A mis compañeros de generación **Nayka, Bela, Igor, Juan Carlos, Angel**, gracias por su amistad.

A todo el personal de la ULIEG.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado durante la maestría.

Al **Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT)**, por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Gracias a todos

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme alcanzar un logro más en vida, esperando que sean muchos más.....

A mi Mamá Lupita, por su cariño incondicional, por apoyarme en todo momento, por esto y más.... Te Quiero Mucho Mami.

A mi Papá Otto, porque siempre has estado al pendiente de nosotros y nos has apoyado en todo.... Te Quiero Mucho Papi.

A mis Hermanos Mara y Otto, porque siempre hemos luchado por alcanzar nuestras metas.... Los quiero mucho a los dos.

A Angel, por tu apoyo en todo momento, por no dejarme desfallecer.... Muchas gracias y TQM.

A mis Abuelitos, Papá Beto (q.e.p.d.), Mamá Amparito (q.e.p.d.), Abuelita Cata (q.e.p.d.), nunca los olvido.

A mis Primos y Tíos, gracias por su apoyo moral.

Nunca

te conceden un deseo

sin concederte también la facultad

de convertirlo en realidad.

Sin embargo,

es posible que te cueste trabajo.

Richard Bach

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición	1
1.2 Características Epidemiológicas	2
1.2.1 Factores de Riesgo	2
1.2.2 Prevalencia	4
1.3 Patogénesis	4
1.3.1 Factor de Necrosis Tumoral α	6
1.4 Manifestaciones Clínicas	9
1.4.1 Características Clínicas	9
1.4.2 Exámenes de Laboratorio	9
1.5 Diagnóstico	10
1.5.1 Técnicas de Imagen	10
1.5.2 Biopsia Hepática	11
1.5.3 Lesiones Histopatológicas	14
1.6 Tratamiento	16
1.6.1 Estrategias Alternativas	17
1.7 Antecedentes de los polimorfismos del gen TNF- α	19
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. HIPÓTESIS	21

IV. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo General	22
4.2 Objetivos Específicos	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Área Física	23
5.2 Criterios de Inclusión	23
5.3 Criterios de Exclusión	24
5.4 Grupo Control (Sujetos Sanos)	24
5.5 Material Biológico	24
5.6 Origen de los reactivos	25
5.7 Equipo	26
5.8 Programas de análisis computacional	26
5.9 Métodos	28
5.9.1 Extracción de DNA genómico por la técnica de TSNT	28
5.9.1.1 Protocolo	29
5.9.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	29
5.9.2.1 Fundamento	30
5.9.2.2 Diseño de los Oligonucleótidos	30
5.9.2.3 Condiciones de amplificación	32
5.9.3 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	34
5.9.3.1 Fundamento	34
5.9.3.2 Protocolo	34
5.9.4 Análisis Estadístico	36
VI. RESULTADOS	37
6.1 Muestras para el estudio	37

6.2 Características demográficas, clínicas e histopatológicas de los pacientes.	37
6.2.1 Características demográficas y clínicas	37
6.2.2 Análisis histopatológico	39
6.2.2.1 Grados de NASH	39
6.2.2.2 Etapas de Fibrosis	40
6.3 DNA genómico extraído a partir de las muestras de sangre periférica	41
6.4 Frecuencia de los polimorfismos G-308A y G-238A	41
6.4.1 Detección de los polimorfismos G-308A y G-238A por RFLP	42
6.4.1.1 Digestión de los productos de 223 pb con <i>Nco I</i>	42
6.4.1.2 Digestión de los productos de 151 pb con <i>Msp I</i>	43
6.5 Análisis Estadístico	44
6.5.1 Resultados de genotipificación	44
6.5.2 Análisis de Hardy-Weinberg	45
6.5.3 Análisis de tendencia	46
VII. DISCUSIÓN	47
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. PERSPECTIVAS	51
BIBLIOGRAFÍA	52
APÉNDICES	
APÉNDICE A.- Electroforesis en geles de Agarosa	
APÉNDICE B.- Electroforesis en geles de Poliacrilamida	
APÉNDICE C.- Preparación de reactivos	

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
Tabla I. Técnicas de Imagen para el diagnóstico de NASH.	11
Tabla II. Clasificación de los hallazgos inflamatorios.	13
Tabla III. Clasificación de las etapas de fibrosis.	13
Tabla IV. Oligonucleótidos para amplificar el polimorfismo G-308A.	30
Tabla V. Oligonucleótidos para amplificar el polimorfismo G-238A.	31
Tabla VI. Condiciones de PCR para el polimorfismo G-308A.	32
Tabla VII. Condiciones de PCR para el polimorfismo G-238A.	32
Tabla VIII. Programa de amplificación del fragmento de 223 pb para la detección del polimorfismo G-308A.	33
Tabla IX. Programa de amplificación del fragmento de 151 pb para la detección del polimorfismo G-238A.	33
Tabla X. Reacción de digestión para el polimorfismo G-308A.	35
Tabla XI. Reacción de digestión para el polimorfismo G-238A.	35
Tabla XII. Muestras recolectadas de obesos y de sujetos sanos.	37
Tabla XIII. Datos demográficos del grupo control.	38
Tabla XIV. Datos demográficos y clínicos de los pacientes con NASH.	38
Tabla XV. Frecuencia del polimorfismo G-308A.	44
Tabla XVI. Frecuencia del polimorfismo G-238A.	45
Tabla XVII. Equilibrio de Hardy-Weinberg.	46
Tabla XVIII. Análisis de tendencia.	46

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
Figura 1. Progresión de NAFLD.	2
Figura 2. Factores de riesgo para NASH.	3
Figura 3. Hipótesis de la patogénesis de NAFLD.	5
Figura 4. Estructura tridimensional del Factor de Necrosis Tumoral α .	7
Figura 5. Locus TNF.	7
Figura 6. SNPs en el promotor del gen TNF.	8
Figura 7. Esteatosis Macrovesicular.	14
Figura 8. Esteatosis Microvesicular.	14
Figura 9. Cuerpos de Mallory con balonamiento hepatocitario.	15
Figura 10. Fibrosis Perisinusoidal (Tinción Tricrómica de Masson).	15
Figura 11. Esteatohepatitis con cirrosis.	15
Figura 12. Estrategia General.	28
Figura 13. Diseño de oligonucleótidos.	31
Figura 14. Análisis histopatológico.	39
Figura 15. Grados de NASH.	40
Figura 16. Etapas de Fibrosis.	40
Figura 17. Electroforesis del DNA genómico.	41
Figura 18. Amplificación de los fragmentos de 223 y 151 pb.	42
Figura 19. Digestiones de los productos amplificados de 223 pb con la enzima <i>Nco I</i> .	43
Figura 20. Digestiones de los productos amplificados de 151 pb con la enzima <i>Msp I</i> .	44

ABREVIATURAS

μ l	Microlitros
$^{\circ}$ C	Grados Centígrados
ALT	Alanina aminotransferasa
ASH	Esteatohepatitis Alcohólica
AST	Aspartato aminotransferasa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleósidos Trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracético
F	Femenino
g	Gramos
h	Horas
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
kg	Kilogramos
M	Masculino
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NAFLD	Enfermedad de Hígado Graso no Alcohólica
NASH	Esteatohepatitis no Alcohólica
PA	Producto Amplificado

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PSA	Persulfato de Amonio
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SD	Desviación Estándar
SDS	Lauril Sulfato de Sodio
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TEMED	N, N, N', N'- Tetrametilendiamina
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
TSNT	Solución de lisis Tritón-SDS
U	Unidades
UV	Luz Ultravioleta
V	Voltios
VLSN	Valor del Límite Superior Normal

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UANL.

Presenta: Q.F.B. Karina del Carmen Trujillo Murillo.

Título del estudio:

FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS G-308A Y G-238A DEL GEN TNF- α EN PACIENTES CON ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (NASH) ASOCIADA A OBESIDAD

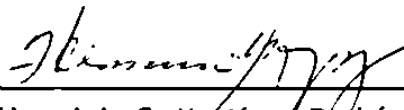
Introducción. NASH es una enfermedad que se asocia frecuentemente con obesidad, diabetes mellitus tipo 2 e hiperlipidemia. El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) es una citosina, que ha sido implicada en la patogénesis de NASH, en la resistencia a insulina, y polimorfismos en su región promotora han sido asociados con un aumento en la producción de esta citocina *in vitro*.

Objetivos. (1) Determinar la frecuencia de los polimorfismos G-238A (alelo TNFA) y G-308A (alelo TNF2) del gen TNF- α en pacientes con NASH y en un grupo control y (2) Determinar si existe asociación entre los polimorfismos del gen TNF- α y la resistencia a insulina con la presencia de NASH.

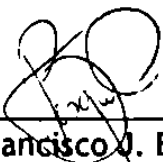
Material y Métodos. El trabajo se realizó de Septiembre del 2002 a Julio del 2003. Pacientes. Se examinaron 92 sujetos obesos ($IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$) que se sometieron a cirugía de by-pass gástrico para reducción de peso. 74 fueron mujeres y 18 hombres, la edad promedio fue 34 ± 10.8 años y el $IMC 43.5 \pm 7.2 \text{ kg/m}^2$. Se les tomó una muestra de sangre periférica y biopsia hepática durante la cirugía. Las biopsias fueron valoradas por dos patólogos en forma independiente de acuerdo a los criterios de Brunt y cols. La ingesta de alcohol, hepatitis viral y enfermedades metabólicas fueron criterios de exclusión. Controles. Se incluyeron 100 muestras de sangre periférica de sujetos sanos. 56 fueron hombres y 44 mujeres, la edad promedio fue 27.8 ± 10.8 años y el $IMC 23 \pm 16.8 \text{ kg/m}^2$, ninguno de ellos refirió abuso de alcohol. Métodos. Los polimorfismos G-238A y G-308A del gen TNF- α fueron evaluados por PCR-RFLPs a partir del DNA genómico extraído de las muestras de sangre. Se utilizaron oligonucleótidos que permitieron introducir el sitio de restricción para las enzimas *Msp I* y *Nco I* en la secuencia de tipo silvestre después de la amplificación para detectar los polimorfismos G-238A y G-308A, respectivamente. La resistencia a insulina fue evaluada por el método de Quíck.

Resultados. NASH fue diagnosticada en 69 (75%) de los 92 pacientes (1 tuvo cirrosis). La frecuencia del polimorfismo G-238A pero no de G-308A, fue mayor en sujetos obesos con NASH que en el grupo control (30% vs 12%; $p=0.00553$). La resistencia a insulina fue detectada en el 81% de los pacientes con NASH, pero no se encontró asociación entre las etapas de NASH con la frecuencia de resistencia a insulina. Tampoco se encontró asociación entre el polimorfismo G-238A con la resistencia a insulina ($RM = 0.98 [0.23-4.44] p= NS$).

Conclusiones. El polimorfismo G-238A parece representar una mayor susceptibilidad genética para desarrollar NASH.



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Director de Tesis



Dr. Francisco J. Bosques Padilla
Co-Director de Tesis



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Co-Director de Tesis