



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

NASH (del inglés: Non-alcoholic steatohepatitis) es una enfermedad de identidad emergente e importante y es considerada como una de las enfermedades hepáticas más comunes en los países occidentales. El termino “NASH” fue acuñado por Ludwig y cols en 1980, al encontrar lesiones de esteatohepatitis alcohólica (ASH) en pacientes que no tenían antecedentes de ingesta de alcohol y que no sufrían de alguna otra enfermedad hepática.

Aunque NASH fue descrita hace más de 20 años, los reportes sobre su historia natural han sido publicados hasta recientemente.

1.1 Definición

La enfermedad de Hígado Graso no Alcohólica (NAFLD del inglés: Non-alcoholic fatty liver disease) comprende un amplio espectro de lesiones hepáticas que van desde una simple esteatosis (acumulación de grasa en el hepatocito) a esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La esteatosis tiene un pronóstico benigno a diferencia de NASH, que puede avanzar a fibrosis (30%-40%) y cirrosis (10%-15%).¹⁻⁷

NASH es una entidad clínica patológica que se caracteriza por hallazgos histológicos similares a los observados en la hepatitis alcohólica, pero con la diferencia de que afecta a individuos que no consumen cantidades significativas de alcohol (<20 g/día en mujeres y <30 g/día en hombres).^{8,9} Las alteraciones hepáticas que se presentan son: acumulación





de grasa en el citoplasma de los hepatocitos formando vesículas de triglicéridos y en ocasiones se acompaña de un infiltrado inflamatorio lobular y portal, necrosis y balonamiento hepatocitario con eventuales cuerpos hialinos de Mallory, fibrosis perisinusoidal e incluso cirrosis (Figura 1).¹⁰⁻¹² Se estima que es la causa más probable de cirrosis criptogénica.¹³⁻¹⁵

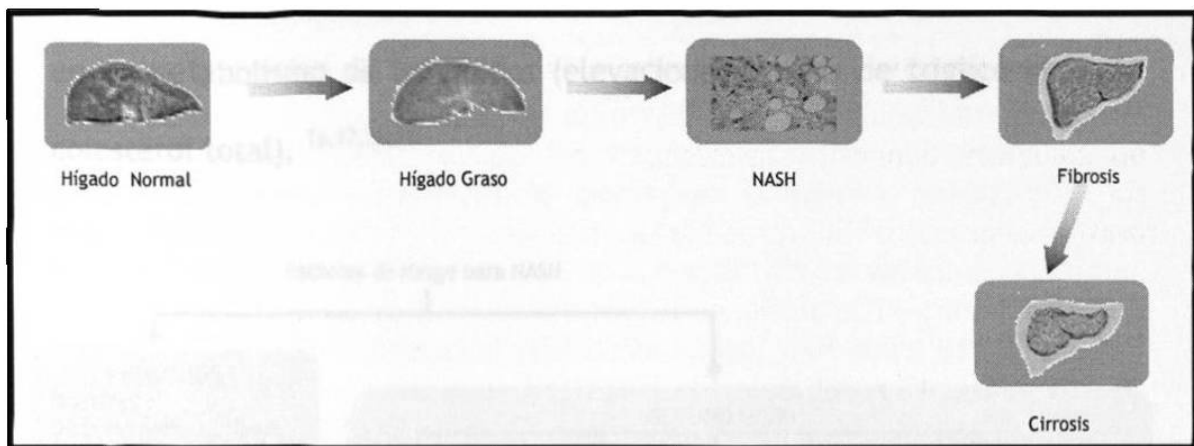


Figura 1. Progresión de NAFLD. El hígado graso aparece cuando el contenido de grasa es superior al 5% del órgano, posteriormente puede presentarse NASH (inflamación y acumulación de grasa) que puede progresar a fibrosis (30%-40%) y cirrosis (10%-15%).

1.2 Características Epidemiológicas

1.2.1 Factores de Riesgo

La etiología y mecanismos que intervienen en la aparición de la enfermedad no son del todo bien conocidos, pero NASH puede considerarse como un síndrome con etiología multifactorial asociándose frecuentemente con obesidad severa, diabetes mellitus tipo 2 (no dependiente de insulina) e hiperlipidemia entre otros factores de riesgo (Figura 2).^{2,3,15}



La obesidad es el factor más frecuentemente asociado con NASH. Entre el 69% y el 100% de los pacientes son obesos.^{6,16-19} Toda persona que alcanza o sobrepasa los 30 kg de peso por m² de superficie corporal (IMC \geq 30 kg/m²) es obesa y obeso mórbido es aquel que tiene un IMC $>$ 40 kg/m².²⁰ La diabetes mellitus tipo 2 (una complicación frecuente de la obesidad) ha sido descrita entre el 10% y el 75% de los pacientes con NASH.^{17,20} Del 20 al 92% de los pacientes con NASH tienen anomalías en el metabolismo de los lípidos (elevaciones séricas de triglicéridos y/o colesterol total).^{16,17,20,21}

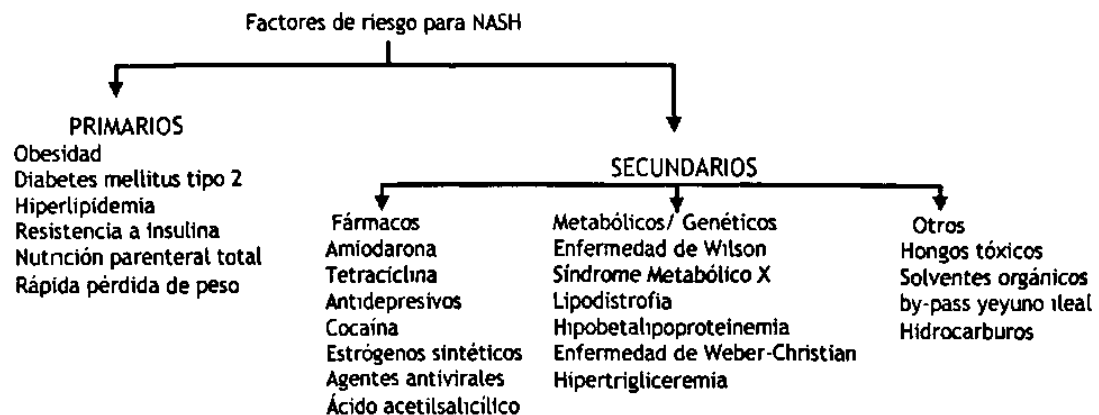


Figura 2. Factores de riesgo para NASH (modificada de Angulo P).²⁰

Se ha encontrado una alta asociación entre NASH y el Síndrome X, que se caracteriza por resistencia a insulina (RI), hipertensión y dislipidemia.^{22,23} También se ha descrito como factor etiológico de NASH el by-pass intestinal, que es una intervención quirúrgica para el tratamiento de la obesidad mórbida que ha caído en desuso por las frecuentes complicaciones que origina. La mayoría de los pacientes sufren esteatosis hepática antes de la intervención, pero después entre el 20% y el 40% de los casos pueden desarrollar NASH y evolucionar a cirrosis (29%-7%).³ NASH





también se ha asociado con anormalidades nutricionales, enfermedades metabólicas, ingestión de fármacos y exposición ocupacional a toxinas.^{19,24}

En un mismo paciente pueden encontrarse varios factores etiológicos de NASH, sin embargo hay reportes de que hasta en un 46% de los casos no se logra identificar ningún factor predisponente conocido para esta enfermedad.²⁵

1.2.2 Prevalencia

NASH es al menos seis veces más frecuente en sujetos obesos que en sujetos delgados, incluyendo la población pediátrica obesa.^{7,20,26} La obesidad es una enfermedad que va en aumento. En los países occidentales del 15% al 20% de la población adulta son obesos y de estos del 74% al 90% presentan algún grado de daño en sus biopsias hepáticas.⁹

Esta enfermedad afecta principalmente a mujeres obesas entre los 40 y 60 años (65%-83%) y no está claro si la predilección por el género femenino se debe a un efecto hormonal o es un reflejo de alta prevalencia de obesidad en mujeres.^{17,19,27} En estudios recientes se ha observado en hombres y en adolescentes obesos.^{4,24} En los Estados Unidos NASH es la causa más frecuente de enfermedad hepática.²⁸

1.3 Patogénesis

Poco se conoce acerca de la patogénesis de NASH, sin embargo la mayoría de los pacientes presentan resistencia a insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 y/u obesidad. Los factores involucrados en su progresión desde esteatosis y esteatohepatitis a fibrosis y cirrosis no son del todo bien





conocidos y estudios recientes sugieren que la patogénesis de NASH es multifactorial.^{16,29}

El modelo que ha sido propuesto para explicar la progresión de esta enfermedad es el del “doble insulto” (Figura 3).³⁰ Este modelo propone que la acumulación de lípidos en los hepatocitos (principalmente en forma de triglicéridos) es un prerrequisito para el desarrollo de NAFLD, constituyendo el “primer insulto”. Esta etapa ha sido relacionada con resistencia a insulina, que es constantemente observada en pacientes con NAFLD y NASH. Posteriormente, los hepatocitos se vuelven vulnerables a un “segundo insulto” que involucra al estrés oxidativo, que resulta de un desbalance entre los procesos pro-oxidantes y antioxidantes en el hígado. Este estrés oxidativo genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que son capaces de inducir peroxidación lipídica, causando la producción de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HN), los cuales a su vez inducen la síntesis de citocinas tales como: Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), Factor de Crecimiento Transformante (TGF- β) e Interleucina 8 (IL-8) y la activación de células estelares que son responsables de la fibrosis hepática, que posteriormente puede avanzar a cirrosis (Figura 3).³⁰⁻³³

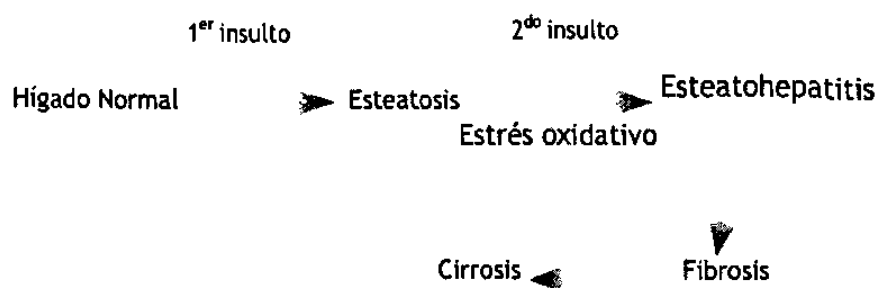


Figura 3. Hipótesis de la patogénesis de NAFLD. Modelo del “doble insulto” que ha sido propuesto para explicar la progresión de NAFLD (modificada de Day CP).³⁰



Estudios recientes sugieren que los factores genéticos juegan un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad. Entre los genes que han sido involucrados se encuentran: genes que determinan la magnitud y el patrón de obesidad (11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo I), genes que participan en la sensibilidad a insulina (PPAR [Receptor activado de peroxisomas]- gamma), genes involucrados en el almacenaje de lípidos en el hígado (apolipoproteína E, proteína microsomal transportadora de triglicéridos [MTP]), genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos (CYPS [citocromo P450], PPAR-alfa, acetil-CoA oxidasa), genes que codifican para citocinas (IL-4 [Interleucina], TGF- β [Factor de Crecimiento Transformante- β], TNF- α [Factor de Necrosis Tumoral- α]), genes que tienen que ver con el estrés oxidativo (HFE, TNF- α) y genes que codifican proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo (MnSOD [súperoxido dismutasa de manganeso], UCP-2 [Proteína no acoplada 2]).³³⁻³⁵

1.3.1 Factor de Necrosis Tumoral α

Los macrófagos y los linfocitos T activados que infiltran el tejido hepático de pacientes con esta enfermedad son fuente importante de producción de esta citocina, que ha sido implicada en la patogénesis de NASH y que además puede promover resistencia a insulina. Polimorfismos en su región promotora han sido asociados con un aumento en la liberación de esta citocina *in vitro* (Figura 4).^{15,36,37}



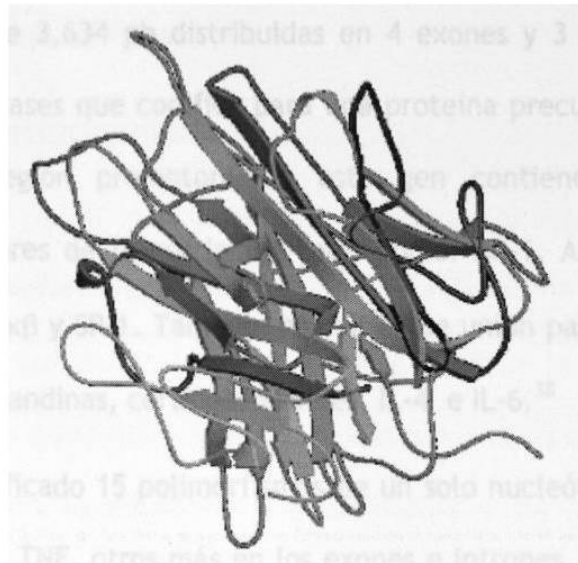


Figura 4. Estructura tridimensional del Factor de Necrosis Tumoral α . Imagen tomada del Protein Data bank.

El gen TNF- α se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 en la banda p21.3, dentro de la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase III (Figura 5).³⁸

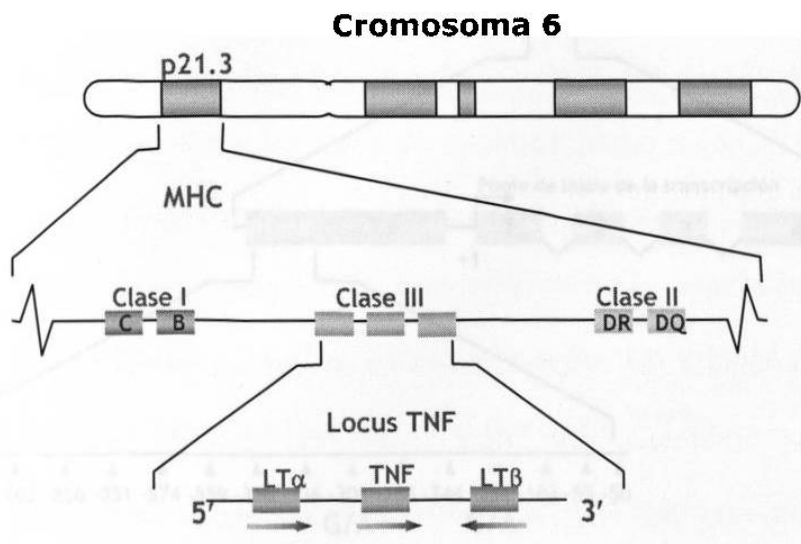


Figura 5. Locus TNF. Localización de los genes Linfotoxina α (LT α), Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y Linfotoxina β (LT β) dentro del MHC clase III. Las flechas indican la dirección de Transcripción de los genes (modificada de Liz-Graña y Gómez-Reino).³⁸



Este gen tiene 3,634 pb distribuidas en 4 exones y 3 intrones, el RNAm es de 1,585 bases que codifica para una proteína precursora de 230 aminoácidos. La región promotora de este gen contiene secuencias consenso para factores de transcripción tales como: AP-1, AP-2, C/EBP β , CRE, Egr-1, Ets, NF- κ β y SP-1. También hay sitios de unión para represores tales como: prostaglandinas, corticoesteroides, IL-4 e IL-6.³⁸

Se han identificado 15 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el promotor del gen TNF, otros más en los exones e intrones. En la región promotora, el polimorfismo más importante corresponde al cambio de una G (guanina) por una A (adenina) en el sitio 308 del promotor, generando dos alelos conocidos como TNF1 (G) y TNF2 (A). También en la posición 238 se presenta el mismo cambio de bases G por A, dando lugar a los alelos TNFG (G) y TNFA (A) (Figura 6).^{39,40}

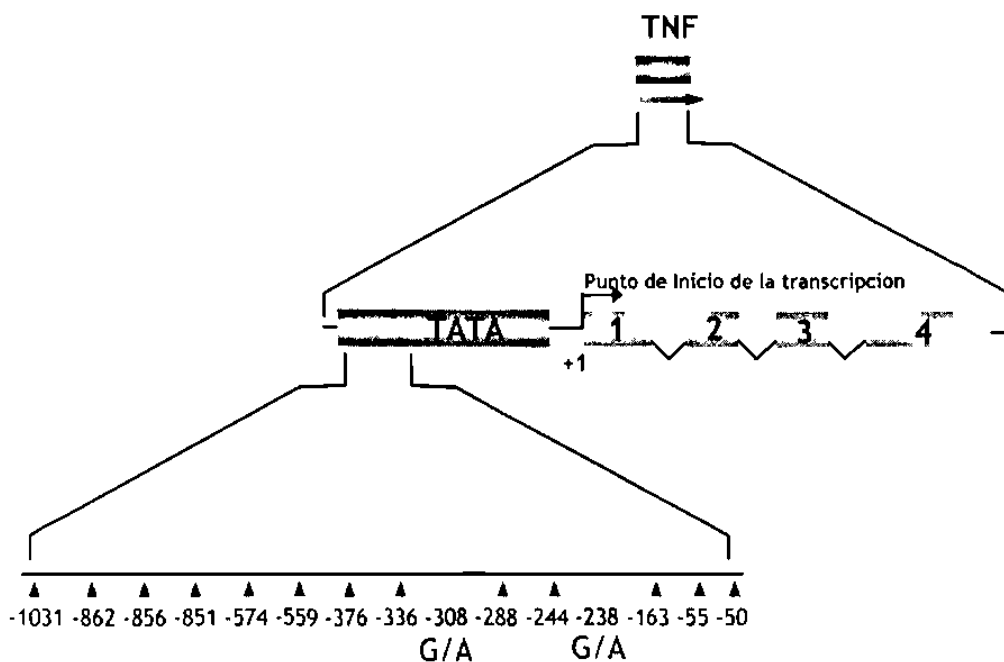


Figura 6. SNPs en el promotor del gen TNF (modificada de Liz-Graña y Gómez-Reino).³⁸



1.4 Manifestaciones Clínicas

1.4.1 Características Clínicas

La población pediátrica obesa con frecuencia presenta síntomas relacionados a esta enfermedad, mientras que la mayoría de los pacientes adultos (48%-100%) cursan de forma subclínica, aunque la astenia y la molestia en el hipocondrio derecho son los síntomas más frecuentes. En el 75% de los pacientes se encuentra hepatomegalia y en el 25% puede encontrarse esplenomegalia.^{20,41}

1.4.2 Exámenes de Laboratorio

En la mayoría de los pacientes con NASH (50%-90%) es frecuente observar un aumento [de 2 a 4 veces del límite superior normal (VLSN)] en los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) o ambas.^{17,20} ALT es una enzima producida en los hepatocitos, cuyo nivel en sangre aumenta cuando los hepatocitos son dañados o mueren. ALT podría ser un dato de mayor sensibilidad diagnóstica, pero todos los tipos de hepatitis (viral, alcohólica, inducida por fármacos, etc) ocasionan un aumento en la actividad sérica de ALT. AST es una enzima menos específica para enfermedades hepáticas, debido a que también se eleva en el infarto al miocardio. La relación AST/ALT es menor a 1 en la mayoría de los pacientes con NASH.^{17,20,24}

Con menor frecuencia existe elevación de la fosfatasa alcalina (ALP) y de la gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT).⁴ En un 6% y 11% de los pacientes se ha detectado alteración del perfil metabólico del hierro (cifras altas de ferritina con saturación de transferrina normal). Los niveles séricos





de bilirrubinas, albúmina y tiempo de protrombina generalmente se encuentran dentro de los límites normales.^{17,19,42}

1.5 Diagnóstico

Una de las dificultades es establecer un diagnóstico correcto y excluir las causas que pueden dar una imagen histopatológica similar a NASH, tales como la ingesta de alcohol, de fármacos como el tamoxifen, amiodarona o alguna otra droga hepatotóxica.

NASH siempre debe ser incluida entre las posibilidades diagnósticas de pacientes que presentan anomalías en las pruebas de funcionamiento hepático, entre las que predomina el incremento de las concentraciones de alanino-amino-transferasas sin otra causa identificable de enfermedad hepática crónica, especialmente en presencia de alguno de los factores reconocidos como de riesgo (obesidad severa, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemia). Hacen más probable el diagnóstico la ausencia de síntomas o que éstos sean inespecíficos.^{11,43}

1.5.1 Técnicas de Imagen

Las técnicas de imagen que se han utilizado como métodos de diagnóstico incluyen al ultrasonido con una sensibilidad para la esteatosis del 89 al 95% y una especificidad del 84 al 93%, y para la fibrosis con una sensibilidad del 57 al 77% y con una especificidad del 85 al 89%.⁴⁴ Con la resonancia magnética (MRI) se observa mejor la esteatosis. La tomografía computada (CT) también es de utilidad para el diagnóstico (Tabla I).^{33,43}

La acumulación de grasa puede demostrarse por ultrasonido, CT o resonancia magnética, sin embargo ninguno de estos métodos proporciona





información sobre la etiología de la esteatosis, el grado de inflamación y fibrosis que está presente.^{19,33}

Tabla I. Técnicas de Imagen para el diagnóstico de NASH.

	Ultrasonido	CT	MRI
Sensibilidad	++	++	+++
Especificidad	+	+++	++++
Costo	+	+++	++++

CT= Tomografía computada. MRI= Resonancia Magnética.

1.5.2 Biopsia Hepática

La mejor prueba diagnóstica para confirmar NASH es la biopsia hepática, que permite determinar la gravedad y el pronóstico de la enfermedad.^{3,8,20,42}

Los pacientes con esteatosis simple tendrán mejor pronóstico que aquellos que presenten lesiones de NASH, fibrosis o cirrosis, y este hecho establecerá la periodicidad y pruebas de seguimiento que requieran y en un futuro probablemente el tratamiento más oportuno.^{25,45}

Para establecer el diagnóstico de NASH es necesario que se cumplan tres condiciones:^{25,45}

↓ *Exclusión de exposición al alcohol.*

Es un criterio básico para el diagnóstico, por lo que su exclusión se debe hacer de forma rigurosa a través de un interrogatorio exhaustivo y cuidadoso al paciente y a los familiares. No se podrá establecer el diagnóstico de NASH si el paciente refiere una ingesta de alcohol segura o



probable de al menos 40 g a la semana. Los marcadores clásicamente reconocidos para el alcoholismo son el aumento del volumen corpuscular medio de los eritrocitos (VCM) o la presencia de niveles séricos elevados de GGT, aunque esta última alteración se puede encontrar hasta en el 28% en los pacientes con NASH asociada a obesidad.¹⁵

↓ *Exclusión de otras causas de enfermedad hepática crónica.*

Deben realizarse los estudios necesarios para descartar otras causas de hepatopatía crónica como las virales (virus de la hepatitis B y C), autoinmunes (hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante primaria), metabólicas (enfermedad de Wilson, hemocromatosis y porfirias) y tóxicas (hierbas medicinales, etc.).

↓ *Biopsia hepática con lesiones típicas.*

Las lesiones histopatológicas y grados de NASH pueden clasificarse de acuerdo con los criterios establecidos por Elizabeth Brunt, que permiten evaluar el grado de esteatosis, la presencia de balonamiento hepatocelular e inflamación lobular y portal, con la finalidad de determinar el grado y la etapa de la enfermedad (Tabla II y Tabla III).⁴⁶



Tabla II. Clasificación de los hallazgos inflamatorios.

Grado 1, Leve:
Esteatosis: predominantemente macrovesicular, involucra desde menos del 33% hasta el 66% de los lóbulos.
Balonamiento: ocasionalmente observado; zona 3 de los hepatocitos.
Inflamación lobular: inflamación leve aguda y dispersa (polimorfonucleares); e inflamación crónica ocasional (células mononucleares).
Inflamación portal: ninguna o leve.
Grado 2, Moderada:
Esteatosis: cualquier grado y usualmente mixta macro y microvesicular.
Balonamiento: obvio y presente en la zona 3.
Inflamación lobular: los polimorfos pueden estar asociados a hepatocitos balonoides, fibrosis pericelular y puede verse inflamación crónica leve.
Inflamación portal: leve a moderada.
Grado 3, Severa:
Esteatosis: >66 % (panacinar); comúnmente esteatosis mixta.
Balonamiento: marcado, predominantemente en la zona 3.
Inflamación lobular: inflamación aguda y crónica dispersa, los polimorfonucleares pueden aparecer en áreas de balonamiento de la zona 3 y fibrosis perisinusoidal.
Inflamación portal: leve a moderada.

Tabla III. Clasificación de las etapas de fibrosis.

Estadio 1:
Fibrosis en la zona 3 perivenular perisinusoidal / pericelular, focal o extensa.
Estadio 2:
Como el anterior con fibrosis periportal focal o extensa.
Estadio 3:
Fibrosis en puente, focal o extensa.
Estadio 4:
Cirrosis



1.5.3 Lesiones histopatológicas

El hígado de pacientes con esteatosis-esteatohepatitis puede presentar varios tipos de lesiones que pueden variar desde la simple presencia de vacuolas de grasa hasta la evidencia de un cuadro de cirrosis.

Las vacuolas de grasa pueden presentarse en forma macrovesicular o microvesicular. Las primeras son las formas más comunes que se encuentran en las biopsias. Aquí hay una sola vacuola grande (principalmente constituida de triglicéridos), que desplaza al núcleo hacia la periferia de la célula (Figura 7).²⁴ En cambio en la forma microvesicular el citoplasma del hepatocito está completamente lleno de múltiples vesículas de grasas que no desplazan el núcleo, y tiene un mal pronóstico (Figura 8).²⁴

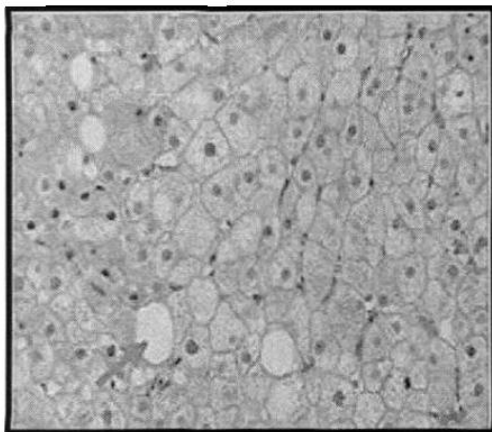


Figura 7. Esteatosis Macrovesicular. La vacuola grande desplaza al núcleo hacia la periferia de la célula.

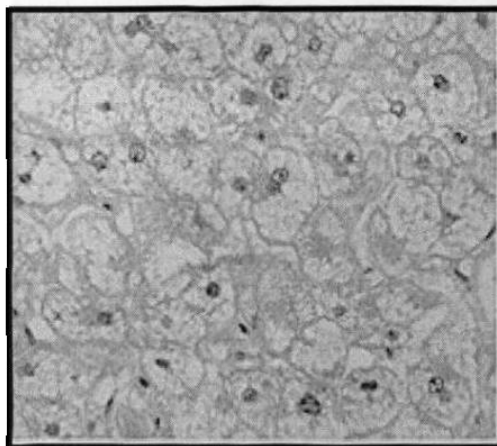


Figura 8. Esteatosis Microvesicular. El citoplasma está lleno de múltiples vesículas de grasa que no desplazan el núcleo.



A medida que progresa la enfermedad pueden encontrarse otras lesiones histológicas tales como: balonamiento hepatocitario, cuerpos de Mallory (Figura 9), infiltrados inflamatorios predominantemente lobulillar y fibrosis perisinusoidal (Figura 10).²⁴ La fibrosis tiene lugar debido a que en el hígado aumenta la producción y el depósito de fibras de colágeno, y es uno de los componentes fundamentales del daño hepático crónico, cuya etapa final es la cirrosis (Figura 11).^{24,47,48}

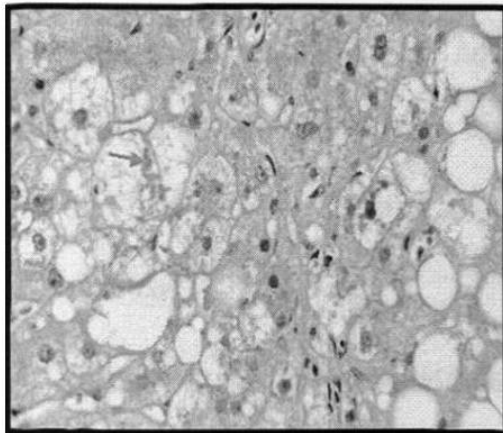


Figura 9. Cuerpos de Mallory con balonamiento hepatocitario.

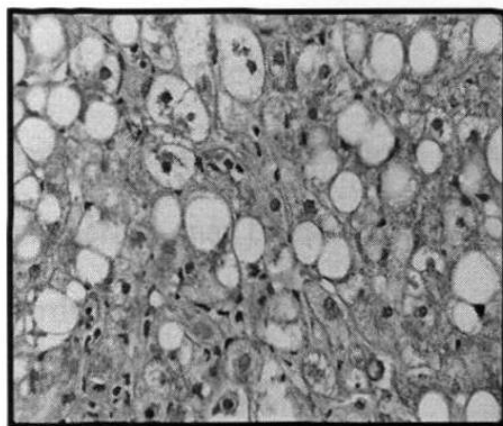


Figura 10. Fibrosis Perisinusoidal (Tinción Tricrómica de Masson). Las fibras de colágeno están teñidas de color azul.

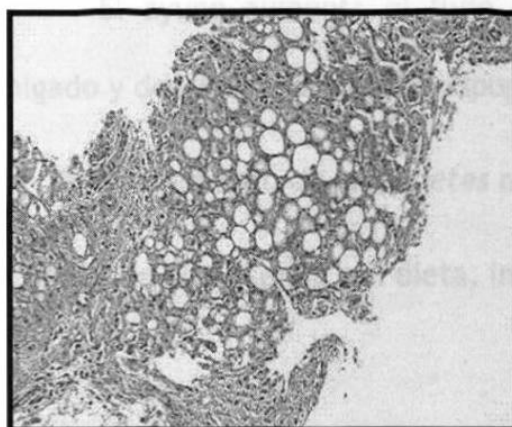


Figura 11. Esteatohepatitis con cirrosis. Un nódulo de tejido hepático es rodeado de tejido cicatrizado.



1.6 Tratamiento

En la actualidad no existen medidas farmacológicas específicas para el tratamiento de NASH, sin embargo pueden modificarse los factores de riesgo que se asocian con más frecuencia a NASH.⁸ La reducción de peso, el control de la hiperglucemia e hiperlipidemia y evitar o suspender el uso de fármacos potencialmente hepatotóxicos son las claves del tratamiento en este momento. Desafortunadamente parece que estas medidas no son útiles en todos los pacientes. Además, queda por establecer qué actitud terapéutica se debe adoptar en los casos cada vez más frecuentes de NASH en los que no se identifica ninguna de las condiciones de riesgo reportadas.^{49,50}

Algunas medidas terapéuticas recomendadas son las siguientes:

✦ *Tratamiento de la obesidad.*

En los pacientes obesos se recomienda la reducción gradual de peso, para evitar que se movilicen grandes cantidades de ácidos grasos, lo que empeoraría más la esteatosis hepática. Se considera un ritmo adecuado el perder de 3 a 4 kg al mes.^{4,6}

✦ *Evitar el ayuno.*

El ayuno aumenta el flujo de ácidos grasos desde la periferia al hígado y deprime la síntesis de lipoproteínas, con lo que empeora NASH.

✦ *Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.*

Control de la glucemia con dieta, insulina o antidiabéticos.





↓ *Tratamiento de NASH asociada a fármacos.*

La única medida terapéutica es suspender la administración del fármaco y pese a ello algunos casos de NASH persisten.

↓ *Tratamiento de NASH asociada a cirugía intestinal derivativa.*

La reconstrucción del tránsito intestinal puede interrumpir el curso de las lesiones hepáticas, pero esto no siempre ocurre. Se ha comprobado que el metronidazol puede prevenir la aparición de esteatosis hepática en algunos pacientes.

1.6.1 Estrategias alternativas

A pesar de controlar adecuadamente los factores de riesgo asociados a NASH no se consigue evitar su progresión en todos los casos, por ello se han buscado nuevas perspectivas terapéuticas entre las que figuran:

↓ *Ácido Ursodesoxicólico (UDCA).*

Se han realizado estudios administrando el UDCA (13-15 mg/kg/d) por un año y se ha encontrado que produce mejoría histológica, disminuyendo el grado de esteatosis. En otros estudios han observado mejoras en los niveles de transaminasas, mientras que en otros no se han encontrado estos cambios.^{7,51-53} El mecanismo de acción de UDCA no es del todo bien conocido, pero se cree que tiene efectos antiapoptóticos e inmunomoduladores.^{7,33}

Se necesitan estudios más controlados para evaluar el beneficio de la terapia con el UDCA (monoterapia) o en combinación con Vitamina E en los pacientes con NASH.⁷





↓ *Vitamina E.*

La terapia con antioxidantes es muy utilizada en la prevención de la progresión de esta enfermedad, y la vitamina E es uno de estos antioxidantes que ha sido evaluado. En un estudio piloto, 16 pacientes con NASH fueron tratados con Vitamina E (400 mg/d), después de seis meses de tratamiento se encontraron mejorías en los niveles de transaminasas, en la esteatosis e inflamación, pero no se observaron mejorías en las etapas de fibrosis. Sin embargo son necesarios estudios que incluyan una población más grande para esclarecer el papel de la Vitamina E en el tratamiento de estos pacientes.⁵⁴

↓ *Combinación de Vitamina E y C.*

Otro antioxidante que ha sido evaluado es la vitamina C en combinación con la vitamina E, que es un tratamiento seguro y barato. Es una opción terapéutica más efectiva que el UDCA, pero se requieren más estudios para esclarecer el papel de este tratamiento en conjunto.⁵⁵

↓ *Tiazolidinedionas (glitazonas).*

Las glitazonas (troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona), son una nueva clase de drogas que disminuyen el hiperinsulinismo reduciendo la resistencia periférica a la insulina. Entre los medicamentos que han sido evaluados estas nuevas alternativas terapéuticas parecen ser más promisorias.

El principal objetivo de estas medidas terapéuticas es la de disminuir los depósitos intrahepáticos de grasa que constituyen la base patogénica de NASH.





El trasplante de hígado es una alternativa para pacientes en etapa terminal, cirrosis y con complicaciones de hipertensión portal. Sin embargo NASH puede recurrir después del trasplante.⁷

1.7 Antecedentes de los polimorfismos del gen TNF- α

En 1992 Wilson y cols.³⁹, identificaron un polimorfismo en la posición 308 (alelo TNF2) en la región promotora del gen TNF- α , digiriendo los productos de amplificados con la enzima de restricción *Nco I*.

Dos años más tarde D'Alfonso y Richiardi, localizaron el polimorfismo 238 (llamado TNFA) en la región promotora del gen TNF- α .⁴⁰

Kroeger y cols.⁵⁶, en 1997 demostraron que en la región promotora de -323 a -285 (comprende a -308) en el alelo TNF2, se unen factores de transcripción diferentes a los que se unen en esa misma región en el alelo TNF1. Lo anterior sugirió que el polimorfismo -308 G/A podría participar en la expresión alterada del gen TNF- α .

En 1997 Wilson y cols.⁵⁷, realizaron ensayos *in vitro* encontrando que la variante polimórfica -308 aumentaba la transcripción del gen TNF- α , comparada con el alelo normal (TNF1).

En el 2001 Brand y cols.⁵⁸, genotipificaron 176 caucásicos y encontraron que el polimorfismo G-308A parecía representar mayor susceptibilidad para desarrollar resistencia a insulina en sujetos obesos.

En el 2002 Valenti y cols.³⁷, genotipificaron 99 sujetos con NAFLD y 172 sujetos sanos, encontrando que la prevalencia del polimorfismo G-238A pero no del G-308A era mayor en sujetos con la enfermedad que en



el grupo control (31% vs 15%; $p < 0.0001$). Estos investigadores concluyeron que los polimorfismos de TNF- α podrían representar susceptibilidad genética para desarrollar resistencia a insulina, NAFLD y esteatohepatitis.

En el 2003 Wibranska y cols.⁵⁹, realizaron un estudio en polacos caucásicos y encontraron que la variación de G por A en la posición 308 en la región promotora del gen TNF- α , parecía predisponer a mujeres obesas a desarrollar resistencia a insulina y aumentar los niveles de glucosa, y triglicéridos en hombres obesos.



CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una enfermedad que se encuentra en aumento en todo el mundo. NASH es un problema clínico emergente entre la población obesa, la cual tiene un alto riesgo de desarrollarla y posteriormente avanzar hacia cirrosis hepática.

Además TNF- α está implicado en la patogénesis de NASH y en el desarrollo de resistencia a insulina, y polimorfismos en la región promotora del gen podrían asociarse a una mayor susceptibilidad genética para desarrollar esta enfermedad.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

Ho = Los polimorfismos G-308A y G-238A del gen TNF- α se encuentran con mayor frecuencia en los pacientes obesos con NASH que en los individuos del grupo control.

Ha = Los polimorfismos G-308A y G-238A del gen TNF- α se encuentran con menor frecuencia en los pacientes obesos con NASH que en los individuos del grupo control.





CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de los polimorfismos G-308A y G-238A del gen TNF- α en pacientes con Esteatohepatitis no Alcohólica (NASH) y en el grupo control.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener muestras de sangre periférica y biopsias hepáticas de pacientes obesos y muestras de sangre periférica de sujetos sanos.
2. Determinar las características demográficas, clínicas e histopatológicas de los pacientes.
3. Determinar la frecuencia de los polimorfismos G-308A y G-238A en la región promotora del gen TNF- α por PCR-RFLPs en pacientes obesos con NASH y en sujetos sanos.
4. Determinar si existe asociación entre el polimorfismo y la resistencia a insulina (RI) con la presencia de NASH.
5. Analizar estadísticamente la frecuencia de los polimorfismos G-308A y G-238A en pacientes obesos con NASH y en sujetos sanos.





CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la UANL, y se realizó en forma prospectiva de Septiembre del 2002 a Julio del 2003.

5.1 Área Física

El 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 y en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario.

5.2 Criterios de Inclusión

Se consideraron los siguientes criterios de selección: sujetos con un tiempo de evolución de obesidad ($IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$) mínimo de 5 años que se sometieron a cirugía de by-pass gástrico para reducción de peso, mayores de edad y con una ingesta de alcohol $< 30 \text{ g/día}$ en hombres y $< 20 \text{ g/día}$ en mujeres. A estos pacientes se les realizaron exámenes de laboratorio que incluyó: biometría hemática, perfil bioquímico, química sanguínea, colesterol, triglicéridos. También se les realizó ultrasonido de abdomen y se les determinó la resistencia a insulina por el método de QUICKI ($QUICKI = 1/[\log(I_0) + 1 \log(G_0)]$).⁶⁰





5.3 Criterios de Exclusión

Pacientes que tuvieran un consumo de alcohol >30 g/día en hombres y >20 g/día en mujeres, pacientes previamente tratados con corticoesteroides, altas dosis de estrógenos, amiodarona, tamoxifen, metotrexato o algún otro fármaco hepatotóxico, antecedente de by-pass yeyuno ileal o resección amplia de intestino delgado y que tuvieran evidencia de hepatitis viral, autoinmune o metabólica.

5.4 Grupo Control (Sujetos Sanos)

Se incluyeron sujetos sanos, mayores de edad, con un IMC < 25 kg/m² y sin antecedentes de abuso de alcohol.

5.5 Material Biológico

Las biopsias hepáticas empleadas en el estudio fueron recuperadas de los pacientes obesos que se sometieron a cirugía de by-pass gástrico para reducción de peso. Durante la cirugía se les tomó una biopsia hepática excisional y una muestra de sangre periférica. A los sujetos que fueron incluidos en el grupo control también se les tomó una muestra de sangre periférica.

Todas las biopsias hepáticas fueron fijadas en formaldehído al 10%, embebidas en parafina, cortadas y teñidas con Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson, y se observaron al microscopio de luz para evaluar la presencia de alteraciones histológicas, incluyendo esteatosis, inflamación y fibrosis. Estos especímenes fueron analizados por dos patólogos de manera independiente cegados a los datos clínicos y de laboratorio, de acuerdo a





los criterios establecidos por Brunt y cols.⁴⁶, para estatificar NASH y fibrosis hepática.

5.6 Origen de los reactivos

A continuación se detallan los reactivos y el material que se utilizó en el desarrollo del proyecto y las casas comerciales de donde fueron adquiridos.

Entre los reactivos necesarios para preparar las soluciones requeridas en la extracción de DNA genómico se encuentran SDS, Trizma® Base y NaCl de SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA), EDTA de Amersham/Life Science (Cleveland, OH, EUA).

Las Reacciones de PCR se hicieron con la enzima TaqDNA polimerasa y con el $MgCl_2$ de Promega Corporation (Madison, Wi, EUA). El buffer de PCR así como los dNTPs fueron adquiridos de GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA).

Las enzimas de restricción que se emplearon para digerir los productos amplificados fueron adquiridas de New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, EUA). La agarosa que se utilizó para preparar los geles analíticos se adquirió de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Entre los reactivos necesarios para preparar el buffer de corrida TBE se encuentran ácido bórico y Trizma® base de SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA) y EDTA de Amersham/Life Science (Cleveland, OH, EUA).

Para preparar los geles de poliacrilamida se utilizó bisacrilamida, TEMED y PSA de la casa comercial SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA)





y la acrilamida se adquirió de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

También se utilizaron solventes orgánicos de la casa comercial Merck® (EM SCIENCE, Gibbstown, NJ, EUA) como cloroformo, Etanol. El fenol se adquirió de SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA).

El material de plástico que se utilizó fueron tubos Eppendorf (0.5, 1.5 y 2.0 ml) y puntillas (0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de BIOMOL SA de CV, Monterrey NL, Mex. También se utilizaron tubos falcón de 15 ml y guantes de látex de Cel Associates, Houston, TX, EUA.

5.7 Equipo

Se utilizó una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 C, incubadora SHEL-LAB, microondas GoldStar modelo MA-857 M, termomixer Eppendorf modelo 5436.

También se utilizó una balanza digital Sartorius modelo 1206 MP (Camibh Göttingen, Alemania), balanza analítica OHAUS modelo APL1. Para realizar las electroforesis se emplearon cámaras verticales y horizontales con fuentes de poder de BIO-RAD Life Science Research Products. Las reacciones de PCR se montaron en un termociclador de la casa comercial Applied Biosystems.

5.8 Programas de análisis computacional

El procesamiento de datos se llevó a cabo en una computadora personal SONY VAIO. También se utilizó un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una





fuelle de luz UV y una computadora (Gel Documentation System 1000, BIO-RAD). Los programas de biología molecular empleados fueron *Oligo* 4.0, *Amplify* 1.0 y el DNA Strider™ 1.1 (© 1989, France), así como el programa Analyst de BIO RAD (Hercules, CA, EUA).

El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word XP y Microsoft® Power Point XP de Microsoft Corporation. Para el análisis estadístico se empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel XP, el programa GENEPOP y el programa Epi Info™ 2002. También se utilizó un Scanner HP Scan-Jet 5100 C (Hewlett- Packard, Inc).

Los programas utilizados por vía Internet fueron: *Entrez* (Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), BLAST Network Service (Blaster); GenBank (ICEBEG, Trieste, Italia). El navegador empleado para Internet fue Microsoft Explorer Versión 6.0 (Microsoft Corporation).



5.9 Métodos

A partir de las muestras de sangre recuperadas tanto de los sujetos obesos como de los sujetos sanos, se extrajo el DNAg para amplificar mediante PCR los productos de 151 y 223 pb, y detectar los polimorfismos G-238A y G-308A, respectivamente. También se recabaron datos demográficos (sexo, edad, peso y estatura), clínicos (perfil hepático, química sanguínea, biometría hemática y resistencia a insulina) e histopatológicos de los pacientes (Figura 12).

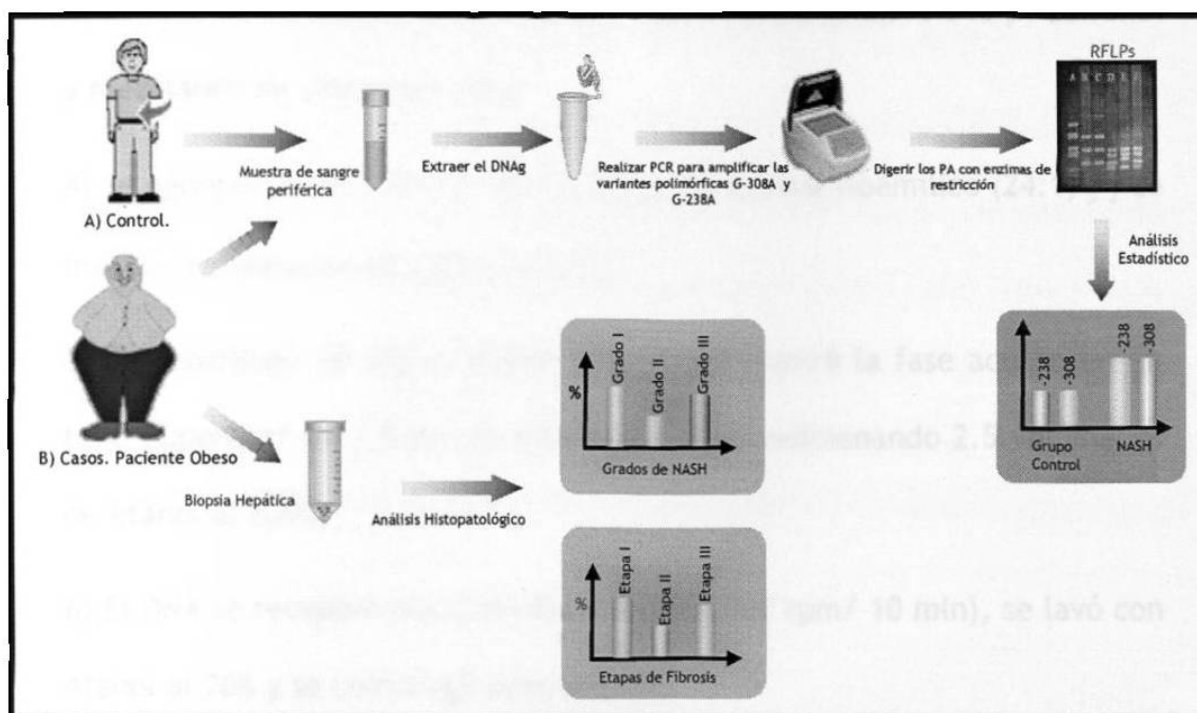


Figura 12. Estrategia General. Se esquematiza la metodología que se siguió para determinar la frecuencia de los polimorfismos del gen TNF- α tanto en el grupo control (A) como en los sujetos obesos (B).

5.9.1 Extracción de DNA genómico por la técnica de TSNT

Las muestras de sangre periférica de los pacientes obesos y de los sujetos del grupo control fueron recolectadas en tubos con EDTA, a partir



de estas muestras se hizo la extracción de DNA genómico mediante el siguiente protocolo: ⁶¹

5.9.1.1 Protocolo

- 1) En un tubo Eppendorf de 2 ml se colocaron 500 μ l de sangre periférica con EDTA.
- 2) Se adicionaron 200 μ l de buffer de lisis TSNT (2% Tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) y se mezcló por inversión para lograr lisis total.
- 3) Se hizo una extracción Fenol/Sevag, adicionando primero 500 μ l de fenol y mezclando en vórtex por 30 s.
- 4) Se agregaron 100 μ l de sevag [cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)] y se mezcló nuevamente en vórtex por 30 s.
- 5) Se centrifugó 20 min a 10,000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se precipitó el DNA adicionando 2.5 volúmenes de etanol al 100%.
- 6) El DNA se recuperó por centrifugación (10,000 rpm/ 10 min), se lavó con etanol al 70% y se centrifugó nuevamente.
- 7) El DNA se secó y la pastilla se resuspendió en 50 μ l de H₂O miliQ.

5.9.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica rápida que permite amplificar *in vitro* un fragmento específico de DNA y obtener millones de copias del fragmento de interés. ⁶²





5.9.2.1 Fundamento

Se utilizan ciclos que incluyen las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión. En presencia de la *Taq*DNA polimerasa y dNTPs, los oligonucleótidos hibridan con la secuencia blanco específica. Las regiones amplificadas varían entre 130 - 1,000 pb de longitud.

5.9.2.2 Diseño de los Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando los programas para Biología Molecular *Oligo 4.0* y *Amplify 1.0*, basándonos en la secuencia reportada del gen TNF- α en el GenBank (>gi| 37209 | emb | X02910.1|HSTNFA Human gene for tumor necrosis factor [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]).

Estos oligonucleótidos permitieron introducir sitios de restricción para las enzimas *Msp I* (secuencia que reconoce: CCGG) y *Nco I* (secuencia que reconoce: CCATGG) en la secuencia de tipo silvestre después de la amplificación, para detectar los polimorfismos G-238A y G-308A, respectivamente. Ambas enzimas cortan el producto de PCR, cuando este no contiene el polimorfismo (Figura 13).

Para amplificar el polimorfismo G-308A se emplearon los siguientes oligonucleótidos (Tabla IV):

Tabla IV. Oligonucleótidos para amplificar el polimorfismo G-308A.

Secuencia	Clave	Características
5' CAATAGGTTTTGAGGGCCAT 3'	553	20-mer, T _m 62.6°
5' ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG 3'	552	20-mer, T _m 63.2°

Con estos oligonucleótidos se logró amplificar un fragmento de 223 pb.





Para amplificar el polimorfismo G-238A se emplearon los siguientes oligonucleótidos (Tabla V):

Tabla V. Oligonucleótidos para amplificar el polimorfismo G-238A.

Secuencia	Clave	Características
5' AGACCCCCCTCGGAACC 3'	738	17-mer, T _m 66.4°
5' ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG 3'	552	20-mer, T _m 63.2°

Con estos oligonucleótidos se logró amplificar un fragmento de 151 pb.

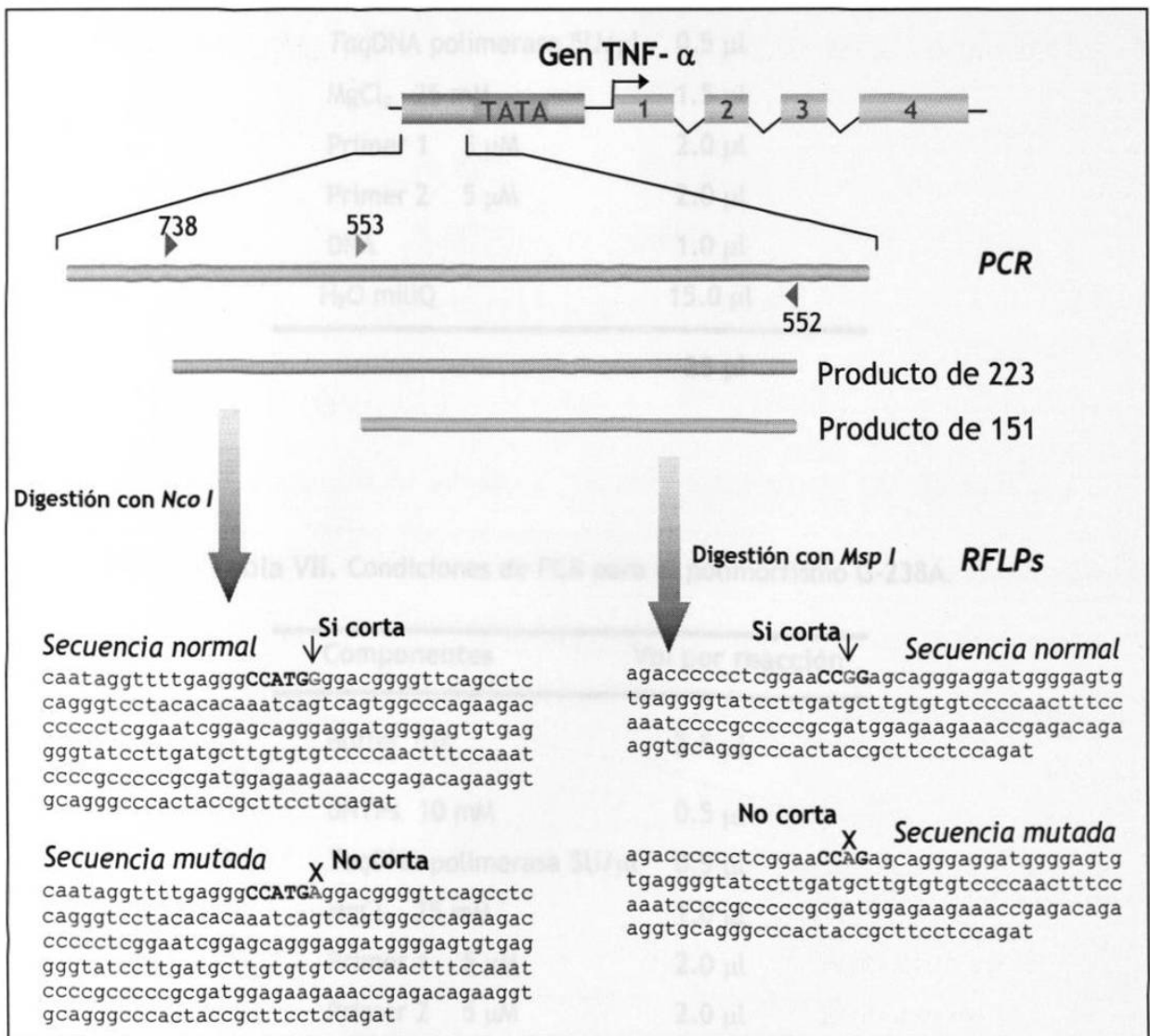


Figura 13. Diseño de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos con la clave 738 y 552 se utilizaron para amplificar el polimorfismo G-308A, y para amplificar el polimorfismo G-238A se utilizaron los oligonucleótidos 553 y 552. La flecha indica el sitio donde ocurre el cambio de una G (secuencia normal) por una A (secuencia mutada).





5.9.2.3 Condiciones de amplificación

1) Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con los siguientes parámetros (Tabla VI y VII):

Tabla VI. Condiciones de PCR para el polimorfismo G-308A.

Componentes	Vol por reacción
Buffer 10X	2.5 μ l
dNTPs 10 mM	0.5 μ l
TaqDNA polimerasa 5U/ μ l	0.5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	1.5 μ l
Primer 1 5 μ M	2.0 μ l
Primer 2 5 μ M	2.0 μ l
DNA	1.0 μ l
H ₂ O miliQ	15.0 μ l
	25 μ l

Tabla VII. Condiciones de PCR para el polimorfismo G-238A.

Componentes	Vol por reacción
Buffer 10X	2.5 μ l
dNTPs 10 mM	0.5 μ l
TaqDNA polimerasa 5U/ μ l	0.5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	1.0 μ l
Primer 1 5 μ M	2.0 μ l
Primer 2 5 μ M	2.0 μ l
DNA	1.5 μ l
H ₂ O miliQ	15.0 μ l
	25 μ l





2) Se utilizaron los siguientes programas para amplificar los productos de interés (Tablas VIII y IX):

Tabla VIII. Programa de amplificación del fragmento de 223 pb para la detección del polimorfismo G-308A.

Temperatura	Tiempo
1. 94°C	3 min
2. 94°C	30 s
3. 62°C	50 s
4. 72°C	30 s
5. 72°C	5 min

Los pasos 2 al 4 se repitieron por 40 ciclos.

Tabla IV. Programa de amplificación del fragmento de 151 pb para la detección del polimorfismo G-238A.

Temperatura	Tiempo
1. 94°C	5 min
2. 94°C	30 s
3. 62.1°C	50 s
4. 72°C	30 s
5. 72°C	5 min

Los pasos 2 al 4 se repitieron por 40 ciclos.



3) Los productos amplificados de 223 y 151 pb fueron verificados en un gel de agarosa al 2% (Apéndice A y C).

5.9.3 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de DNA de diferentes tamaños, tras su digestión con enzimas de restricción.

5.9.3.1 Fundamento

Las variaciones en la longitud de los fragmentos de DNA de una región específica se deben a la acción de las enzimas de restricción, las cuales se unen a las moléculas de DNA y lo digieren en sitios específicos de acuerdo a las secuencias nucleotídicas reconocidas por cada enzima en forma particular. Las enzimas reconocen entre 4 y 6 pb de longitud.

5.9.3.2 Protocolo

Partiendo del análisis de restricción elaborado en el programa DNA Strider, se identificaron las enzimas apropiadas para digerir los productos amplificados de 223 y 151 pb, para detectar los polimorfismos G-308A y G-238A, respectivamente.

- 1) Los productos amplificados fueron digeridos de acuerdo con las condiciones de reacción señaladas por la casa comercial New England Biolabs (Tablas X y XI).





Tabla X. Reacción de digestión para el polimorfismo G-308A.

Reactivos	Volumen μ l
PA de 223 pb	15 μ l
Buffer NEB # 4	1 μ l
<i>Nco</i> I NEB	1 μ l
H ₂ O miliQ	3 μ l
Volumen final	20 μl

PA = Producto amplificado. La reacción se incubó a 37°C por 12 h.

Tabla XI. Reacción de digestión para el polimorfismo G-238A.

Reactivos	Volumen μ l
PA de 151 pb	15 μ l
Buffer NEB # 4	1 μ l
<i>Msp</i> I NEB	1 μ l
H ₂ O miliQ	3 μ l
Volumen final	20 μl

PA = Producto amplificado. La reacción se incubó a 37°C por 12 h.

2) Después del tiempo de incubación, las reacciones de digestión fueron verificadas por electroforesis (190 V por 3 h) en geles de poliacrilamida al 12% (Apéndice B y C).



5.9.4 Análisis Estadístico

La media y la desviación estándar (SD) fueron calculadas para las variables de interés.

Se realizaron comparaciones de proporciones entre grupos para buscar diferencias en la frecuencia del polimorfismo de TNF- α y la frecuencia de resistencia a insulina con la presencia y grado de NASH, mediante las pruebas de χ^2 o exacta de Fisher según resultara mas conveniente, considerando diferencia significativa si la $p < 0.05$ bimarginal.

Así mismo, se estimó el riesgo de esta asociación (razón de momios) y su intervalo de confianza del 95 % con la fórmula de Taylor. Al grupo control se le realizó la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para analizar si la población tenía algún sesgo.



CAPÍTULO VI

RESULTADOS

6.1 Muestras para el estudio.

Se lograron recolectar 92 muestras (sangre periférica y biopsia hepática) de sujetos obesos que se sometieron a cirugía de by-pass gástrico para reducir de peso y 100 muestras de sangre periférica de sujetos sanos (Tabla XII).

Tabla XII. Muestras recolectadas de obesos y de sujetos sanos.

	n	Mujeres n (%)	Hombres n (%)
Obesos	92	74 (80%)	18 (20%)
Control	100	44 (44%)	56 (56%)

6.2 Características demográficas, clínicas e histopatológicas de los pacientes.

De las 92 muestras recolectadas de los pacientes obesos, 69 (75%) fueron diagnosticadas con NASH.

6.2.1 Características demográficas y clínicas

Las características demográficas y clínicas de los pacientes obesos con NASH y las características demográficas de los sujetos sanos, pueden observarse en las siguientes tablas (Tablas XIII y XIV).



Tabla XIII. Datos demográficos del grupo control.

Grupo Control (n = 100)	
Edad (Años)	27.85 \pm 10.86
Sexo (F/M)	Sexo (44/56)
IMC kg/m ²	23.05 \pm 1.68

Se expresa el valor promedio de los datos \pm SD.

Tabla XIV. Datos demográficos y clínicos de los pacientes con NASH.

Pacientes con NASH I (n = 69)	
Edad (Años)	34.0 \pm 10.9
Sexo (F/M)	Sexo (51/18)
IMC kg/m ²	44.0 \pm 7.2
Diabetes (%)	9 (13%)
Hipertensión (%)	11 (16%)
AST (TGO)	2 (3%)
ALT (TGP)	3 (4%)
AST/ALT	0.892 \pm 0.499
Colesterol (%)	17 (25%)
Triglicéridos (%)	15 (22%)

Se expresa el valor promedio de los datos \pm SD.

Los resultados de los pacientes con NASH incluyen, el porcentaje de pacientes con diabetes mellitus (13%) e hipertensión (16%). En el caso de transaminasas, colesterol y triglicéridos se reporta el número de pacientes que tuvieron niveles elevados de estos marcadores séricos más de una vez del límite superior normal (VLSN).



La resistencia a insulina fue detectada en el 81% de los pacientes con NASH, el valor promedio del índice de Quicki fue 0.30 ± 0.029 . No se encontró asociación entre las etapas de NASH con la frecuencia de resistencia a insulina ($\chi^2 = 0.81$ RM = 0.38 [0.02-3.49] $p = 0.63$).

6.2.2 Análisis Histopatológico

Por medio de la biopsia hepática se logró establecer el diagnóstico de NASH (incluyendo 1 con cirrosis) en 69 pacientes (75%) y 23 no presentaron ninguna lesión histopatológica (25%). A partir de las 92 biopsias hepáticas que fueron analizadas (Figura 14).

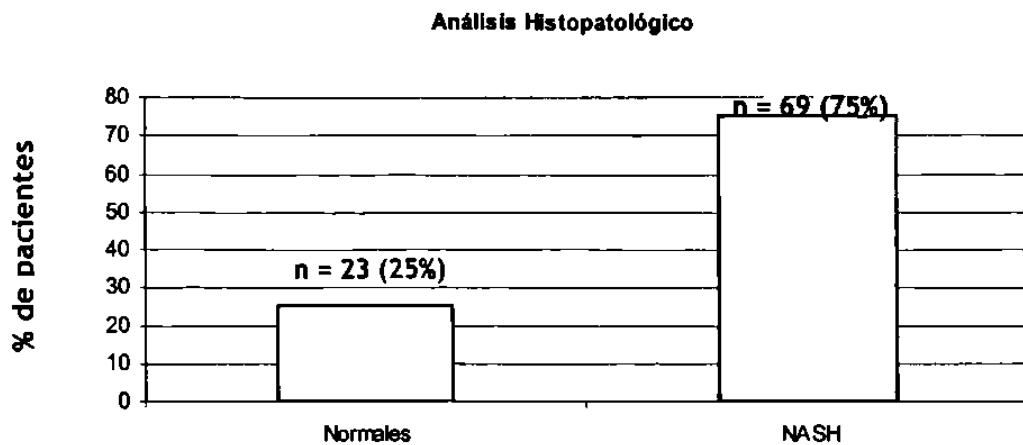


Figura 14. Análisis histopatológico. Se muestran los resultados obtenidos de las 92 biopsias hepáticas analizadas.

6.2.2.1 Grados de NASH

De los pacientes diagnosticados con NASH, 32 de ellos fueron diagnosticados con grado 1 (47%), 26 con grado 2 (38%) y 10 con grado 3 (15%) (Figura 15).



Grados de NASH

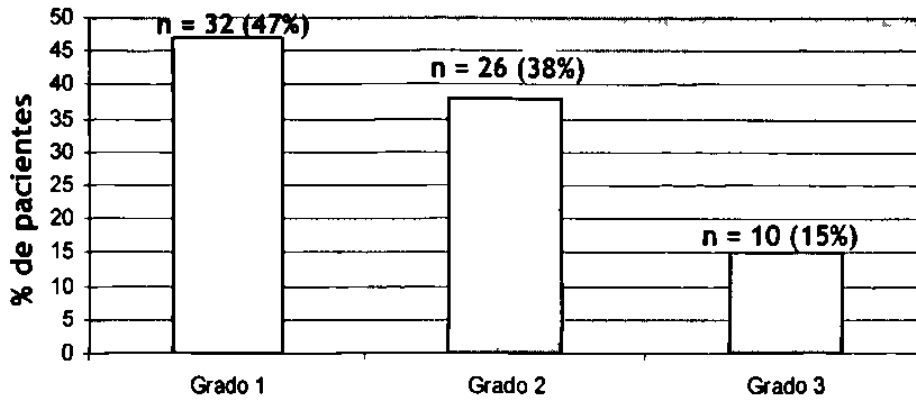


Figura 15. Grados de NASH. De los pacientes diagnosticados con NASH, 32 de ellos fueron diagnosticados con grado 1 (47%), 26 con grado 2 (38%) y 10 con grado 3 (15%).

6.2.2.2 Etapas de Fibrosis

Todos los pacientes diagnosticados con NASH presentaron algún grado de fibrosis, 27 pacientes fueron diagnosticados con etapa 1 (39%), 33 con etapa 2 (48%), 8 con etapa 3 (12%) y 1 con etapa 4 [cirrosis (1%)] (Figura 16).

Etapas de Fibrosis

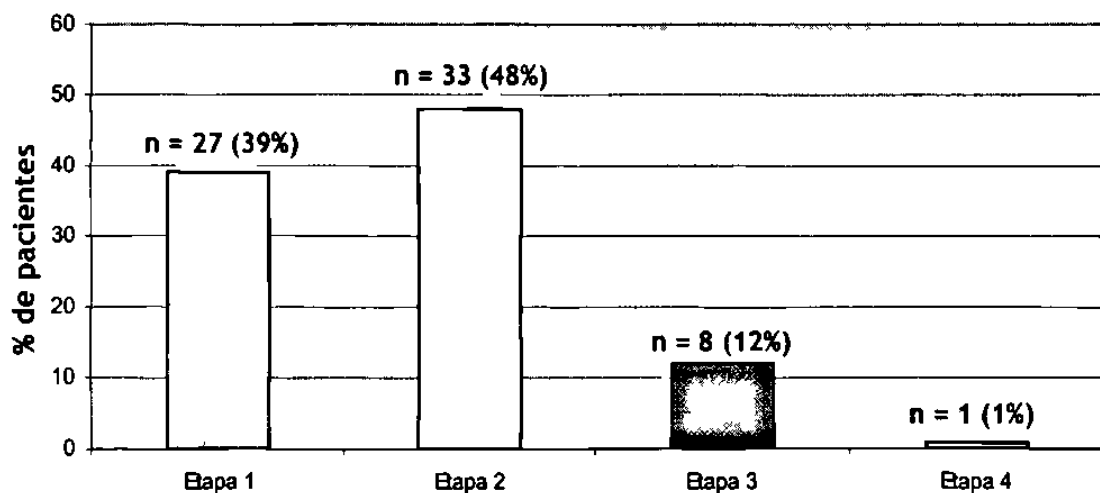


Figura 16. Etapas de Fibrosis. 27 pacientes fueron diagnosticados con etapa 1 (39%), 33 con etapa 2 (48%), 8 con etapa 3 (12%) y 1 con etapa 4 (1%).





6.3 DNA genómico extraído a partir de las muestras de sangre periférica

El DNA genómico extraído a partir de algunas de las muestras de sangre periférica de los pacientes obesos con NASH y del grupo control puede observarse en la figura 17.

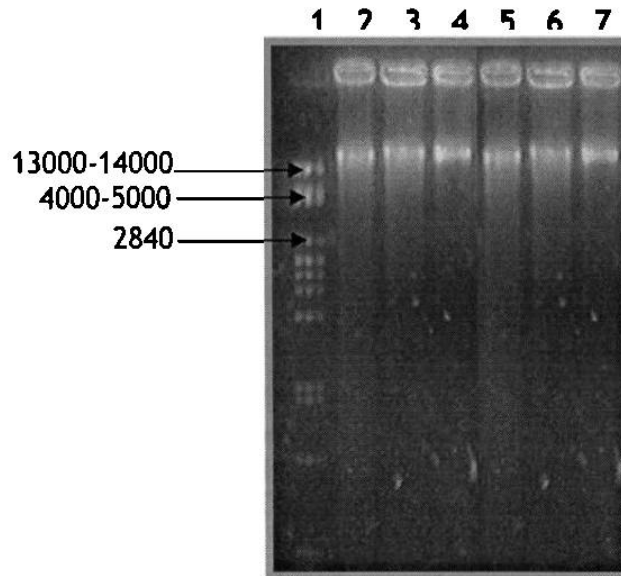


Figura 17. Electroforesis del DNA genómico. Gel de agarosa al 1% que muestra en el carril 1: Marcador $\lambda + Pst I$; Carriles 2-4: DNA extraído de muestras de pacientes; Carriles 5-7: DNA extraído de muestras de los sujetos que integraron el grupo control.

6.4 Frecuencia de los polimorfismos G-308A y G-238A.

A partir del DNA genómico recuperado de las muestras de los pacientes obesos con NASH y del grupo control, mediante PCR se amplificaron los fragmentos de 223 y 151 pb para detectar los polimorfismos G-308A y G-238A, respectivamente (Figura 18).

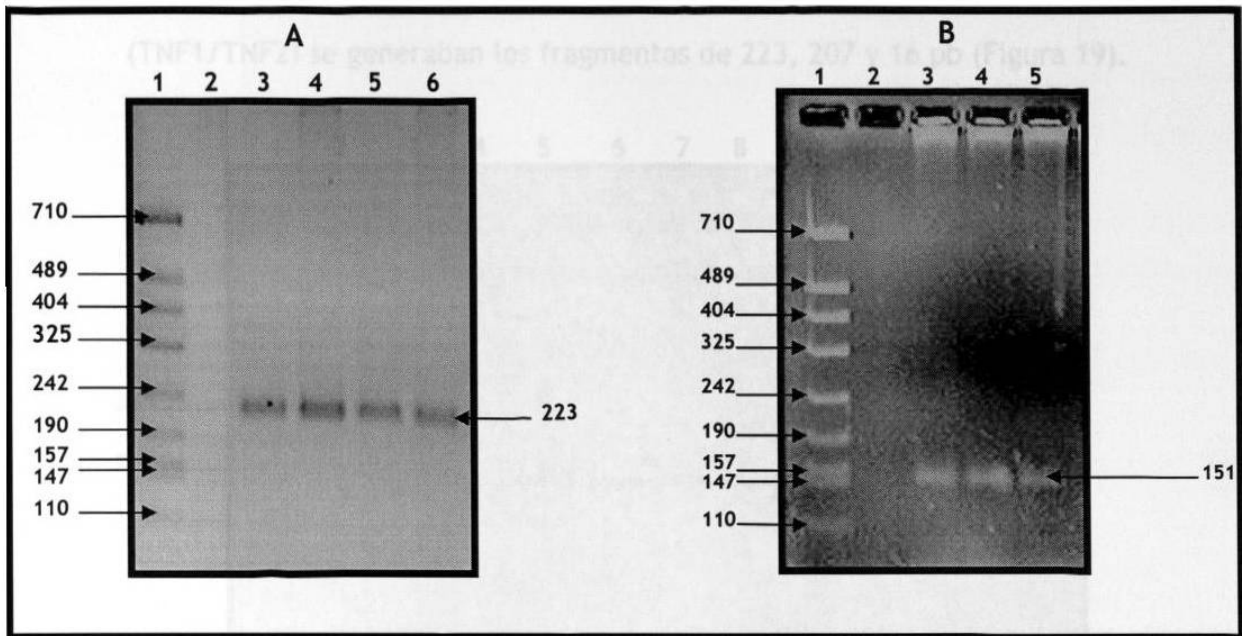


Figura 18. Amplificación de los fragmentos de 223 y 151 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **A.** Carril 1: Marcador pBS + *Msp I*; Carril 2: Control negativo de PCR; Carriles 3-6: Producto amplificado de 223 pb. **B.** Carril 1: Marcador pBS + *Msp I*; Carril 2: Control negativo de PCR; Carriles 3-6: Producto amplificado de 151 pb.

6.4.1 Detección de los polimorfismos G-308A y G-238A por RFLPs

Los productos amplificados de 223 y 151 pb fueron digeridos con las enzimas de restricción *Nco I* y *Msp I* para detectar los polimorfismos G-308A y G-238A, respectivamente.

6.4.1.1 Digestión de los productos de 223 pb con *Nco I*

Si el sujeto era homocigoto normal (TNF1/TNF1), existía el sitio de restricción para la enzima *Nco I* en el producto amplificado de 223 pb, por lo tanto se generaba un fragmento de 207 y 16 pb (este último no se alcanzó a observar en el gel de poliacrilamida al 12%). Si el sujeto era homocigoto mutado (TNF2/TNF2) el sitio de restricción para esta enzima se



perdía quedando el producto de 223 pb, pero si era heterocigoto (TNF1/TNF2) se generaban los fragmentos de 223, 207 y 16 pb (Figura 19).

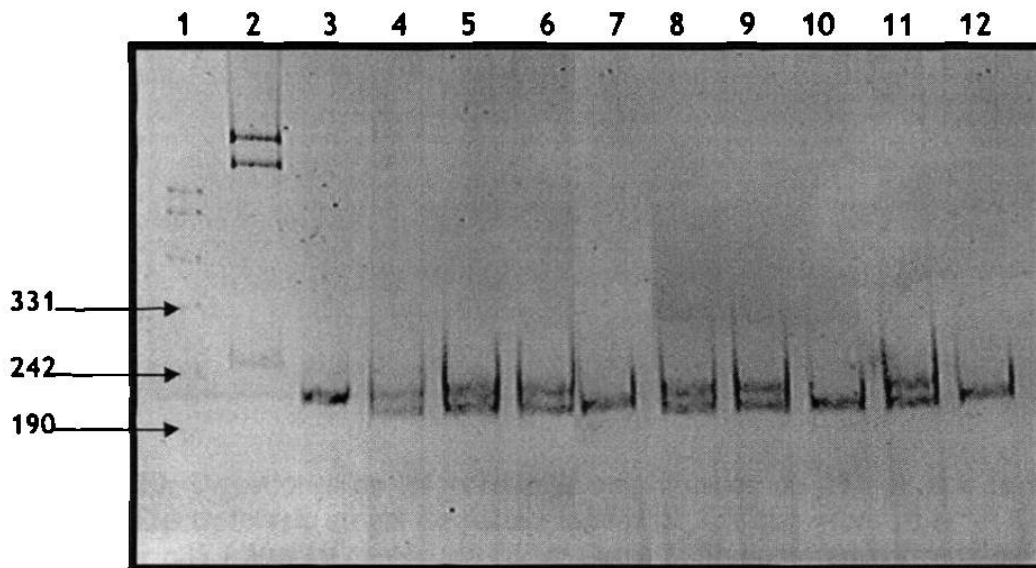


Figura 19. Digestiones de los productos amplificados de 223 pb con la enzima *Nco I*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% que muestra en el Carril 1: Marcador pUC 19 + *Msp I*; Carril 2: Control de corte pHGN2.4- β gal digerido con *Nco I*; Carril 3: Producto amplificado de 223 pb sin digerir; Carriles 4-12; Producto amplificado de 223 pb digerido con *Nco I*. Las muestras de los carriles 4,5,6,8,9 y 11 son heterocigotos y la de los carriles 7,10 y 12 son normales.

6.4.1.2 Digestión de los productos de 151 pb con *Msp I*

Si al verificar por electroforesis las digestiones de los productos amplificados de 151 pb se observaba un solo fragmento de 151 pb, el sujeto se consideraba homocigoto mutado (TNFA/TNFA), pero si se observaban fragmentos de 134 y 15 pb el sujeto era homocigoto normal (TNFG/TNFG). Si el sujeto era heterocigoto (TNFG/TNFA) se observaban fragmentos de 151, 134 y 15 pb (este último no se alcanzó a visualizar en el gel de poliacrilamida al 12%) (Figura 20).

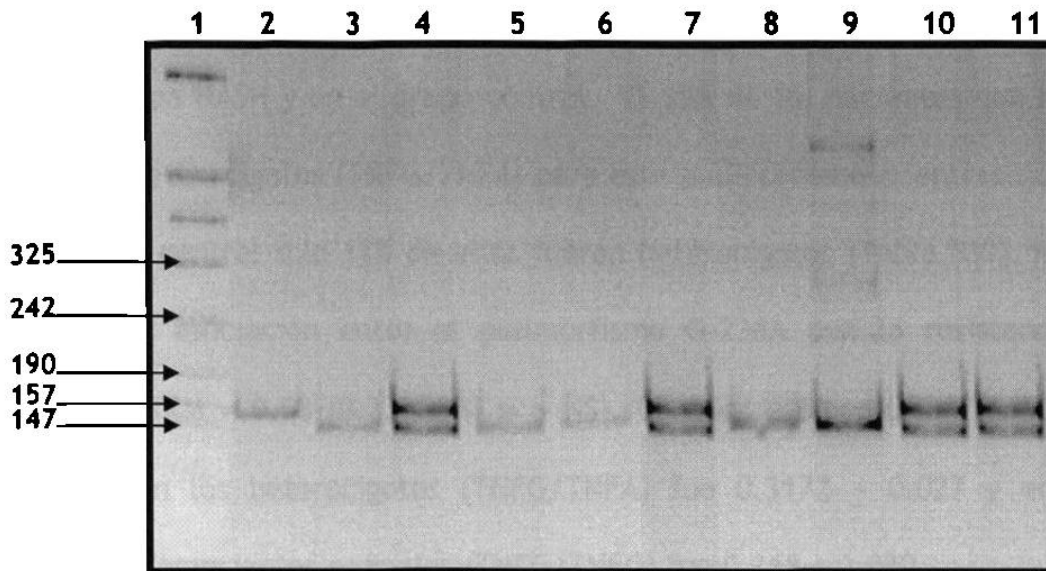


Figura 20. Digestiones de los productos amplificados de 151 pb con la enzima *Msp I*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% que muestra en el Carril 1: Marcador pBS + *Msp I* y control de corte; Carril 2: Producto amplificado de 151 pb sin digerir; Carriles 3-11: Producto amplificado de 151 pb digerido con *Msp I*. Las muestras de los carriles 4, 7, 10 y 11 son heterocigotos y la de los carriles 3, 5, 6, 8 y 9 son normales.

6.5 Análisis Estadístico

6.5.1 Resultados de genotipificación

La frecuencia del polimorfismo G-308A fue similar en los sujetos obesos con NASH (20%) y en el grupo control (20%). En este estudio no se encontró ningún sujeto homocigoto mutado (TNF2/TNF2) para este polimorfismo (Tabla XV).

Tabla XV. Frecuencia del polimorfismo G-308A

	n	TNF1/TNF1	TNF1/TNF2	TNF2/TNF2
		n (%)	n (%)	n (%)
NASH	69	55 (80%)	14 (20%)	0 (0%)
Control	100	80 (80%)	20 (20%)	0 (0%)

RM= 1.02 (0.44-2.33) p = NS





La frecuencia del polimorfismo G-238A fue diferente en los sujetos obesos con NASH y en el grupo control. El 30% de los pacientes con NASH fueron heterocigotos (TNFG/TNFA) para este polimorfismo mientras que en el grupo control solo 12% de ellos fueron heterocigotos (Tabla XVI). No se encontró asociación entre el polimorfismo G-238A con la resistencia a insulina (RM = 0.98 [0.23-4.44] p = NS). El valor promedio del índice de Quicki en los heterocigotos (TNFG/TNFA) fue 0.3172 ± 0.027 y en los sujetos homocigotos normales (TNFG/TNFG) fue 0.318 ± 0.030 .

Tabla XVI. Frecuencia del polimorfismo G-238A

	n	TNFG/TNFG n (%)	TNFG/TNFA n (%)	TNFA/TNFA n (%)
NASH	69	48 (70%)	21 (30%)	0 (0%)
Control	100	88 (88%)	12 (12%)	0 (0%)

RM= 3.21 (1.36-7.64) p = 0.00553

6.5.2 Análisis de Hardy-Weinberg

Al realizar el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg al grupo control, se encontró que la población era homogénea debido a que el valor de p no fue significativo siendo de 0.5973 (Tabla XVII).



Tabla XVII. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Locus	p- val	S.E	W & C	R & H	Matr
Loc 1	0.5973	0.0012	-0.100	-0.100	-
Loc 2	1	0.0000	-0.059	-0.059	-

p-val = valor de p. S.E = desviación estándar

6.5.3 Análisis de tendencia

Se analizó la frecuencia del polimorfismo G-238A en el grupo control, en los sujetos obesos con NASH y en los sujetos obesos sin NASH, y no se encontró ninguna tendencia con el grupo de obesos sin NASH. Por lo tanto, el grupo de obesos sin NASH se comportó igual que los controles (Tabla XIX).

Tabla XIX. Análisis de Tendencia

Chi cuadrada (χ^2)	2.176
p	0.14014



CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

Es necesario encontrar un marcador para identificar cuales de los pacientes obesos están predispuestos a desarrollar NASH, para poder realizar un diagnóstico temprano y proveerles un tratamiento oportuno.

Debido a que la obesidad es una enfermedad mundial que se encuentra en aumento y que estos pacientes tienen un alto riesgo de desarrollar NASH y avanzar posteriormente a cirrosis hepática, nos propusimos determinar la frecuencia de los polimorfismos G-308A y G-238A del gen TNF- α en esta población, para conocer si la presencia de estos polimorfismos representaban una mayor susceptibilidad genética para desarrollar NASH, debido a que esta citocina está implicada en la patogénesis de NASH y en el desarrollo de resistencia a insulina

En nuestra población de estudio NASH fue diagnosticada en 69 (incluyendo 1 con cirrosis) pacientes de un total de 92, confirmando que esta población tiene un alto riesgo de desarrollar esta enfermedad. El grado 1 de NASH fue diagnosticado en 32 de los 68 pacientes (47%), mientras que el grado 2 fue diagnosticado en 26 de ellos (38%) y el grado 3 en 10 pacientes (15%). También encontramos que todos los sujetos con NASH presentaban algún grado de fibrosis y en uno de ellos se observó cirrosis (1%). Estos resultados son similares a los reportados previamente por Sepúlveda y cols. en el 2002.⁶³





Existen varios factores de riesgo bien identificados para desarrollar NASH como por ejemplo; la obesidad severa, la diabetes mellitas tipo 2, las hiperlipidemias y pertenecer al sexo femenino. En la población que aquí se estudió, la mayoría de los pacientes con NASH fueron mujeres (74%) mientras que el 26% fueron hombres. El porcentaje de pacientes con diabetes mellitus fue del 13% y con hiperlipidemia fue del 25%, ambos similares a lo reportado en la literatura (10-15% y 20-92% respectivamente).^{19,20} La mayoría de los pacientes obesos con NASH presentaron resistencia a la insulina, más ésta no se encontró relacionada con el polimorfismo G-238A ni con el grado de daño histológico. La ausencia de esta asociación sugiere que otros factores están implicados en la progresión de la NASH, corroborando la etiología multifactorial de esta enfermedad.

La obesidad ha sido reportada como uno de los factores de riesgo más frecuente (60-95%) y en nuestra población todos la padecieron, ya que fue uno de los criterios de inclusión para pertenecer al grupo de estudio.^{17,19}

En base a los resultados de genotipificación, el número de sujetos con NASH heterocigotos (TNF1/TNF2) para el polimorfismo G-308A fue similar (20%) al número de heterocigotos encontrado en el grupo control (20%). No se encontró diferencia significativa [RM = 1.02 (0.44-2.33) $p = NS$]. Mientras que la frecuencia del polimorfismo G-238A fue mayor en sujetos con NASH (30%) que en el grupo control (12%), en este caso si se encontró diferencia significativa [RM = 3.21 (1.36-7.64) $p = 0.00553$].





En este estudio no se encontró ningún sujeto portador de la mutación en ambos alelos, para ninguno de los polimorfismos investigados.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Valenti y cols. en el 2002. Ellos encontraron que la frecuencia del polimorfismo G-238A pero no el G-308A, fue mayor en sujetos con NASH que en el grupo control (31% vs 15%; $p < 0.0001$). En este trabajo tampoco encontraron ningún homocigoto mutado para el polimorfismo G-238A en los pacientes con NASH, pero si en un 2% en el grupo control. Mientras que para homocigotos mutados del polimorfismo G-308A encontraron un 1% en ambos grupos de estudio.

Por todo lo anterior podemos concluir que el polimorfismo G-238A pero no el G-308A parece estar asociado a un mayor riesgo de desarrollar NASH, lo que confirma parcialmente la hipótesis planteada, debido a que el polimorfismo G-238A pero no el G-308A se encontró con mayor frecuencia en los pacientes obesos con NASH que en el grupo control. Con este estudio se corroboró que los factores genéticos juegan un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad, asimismo estudios recientes sugieren que además de los genes que codifican para citocinas (como es el caso de TNF- α), otros genes como los que determinan la magnitud y patrón de obesidad, genes involucrados en el almacenaje de lípidos en el hígado, genes relacionados con el estrés oxidativo, están asociados con la patogénesis de esta enfermedad, confirmado una vez más la etiología multifactorial de la “Enfermedad de Hígado Graso no Alcohólica”.



CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

1. NASH fue diagnosticada en gran parte de la población obesa (74%), predominando el grado 1 (47%), seguido por el grado 2 (38%) y grado 3 (15%).
2. Todos los sujetos obesos con NASH presentaron alguna etapa de fibrosis (100%) y en uno de ellos se observó cirrosis (1%).
3. El porcentaje de pacientes con diabetes mellitus fue del 13% y con hiperlipidemia (hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia) fue del 25% siendo, ambos similares a lo reportado en la literatura 10-75% y 20-92% respectivamente.
4. 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].
5. La frecuencia del polimorfismo G-308A fue similar en pacientes con NASH (20%) y en el grupo control (20%). No se encontró diferencia significativa [RM = 1.02 (0.44-2.33) p = NS].
6. La frecuencia del polimorfismo G-238A fue mayor en pacientes con NASH (30%) que en el grupo control (12%). Si se encontró diferencia significativa [RM = 3.21 (1.36-7.64) p = 0.00553].





7. El polimorfismo G-238A podría representar una mayor susceptibilidad genética para desarrollar NASH.

CAPÍTULO IX

PERSPECTIVAS

A las biopsias hepáticas recolectadas de los pacientes obesos se les extrajo el RNA para en un estudio posterior, cuantificar los niveles de expresión del gen TNF- α . Hay antecedentes de estudios realizados *in vitro* que sugieren que la presencia de estos polimorfismos en la región promotora del gen TNF- α afectan su transcripción.



BIBLIOGRAFÍA

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Non-alcoholic steatohepatitis. Experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinical Proceedings*. 1980;55: 434-438.
2. Shet SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Annals of Internal Medicine*. 1997; 127: 137-145.
3. Yu AS, Keeffe EB. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastrointestinal Disorders*. 2002;2: 11-19.
4. AGA Technical Review on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*. 2002;123:1705-1725.
5. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *American Journal of Physiology- Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282: G-193- G-199.
6. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic Steatohepatitis: Association with Obesity and Insulin Resistance, and Influence of Weight Loss. *Diabetes and Metabolism*. 2000;26: 98-106.
7. Oneta CM, Dufour JF. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *SWISS MED WKLY*. 2002;132: 493-505.
8. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Agenda for Clinical Research. *Hepatology*. 2002;35: 746-752.
9. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic





- Steatohepatitis, Insulin Resistance, and Metabolic Syndrome: Further Evidence for an Etiologic Association. *Hepatology*. 2002; 367-372.
10. Fong DG, Nehra V, Lindor KD, Buchman AL. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*. 2000;32: 3-10.
 11. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of no-nalcoholic steatosis syndromes. *Seminary of Liver Disease*. 2001;21:17-26.
 12. Sepúlveda-Flores RN, Vera-Cabrera L, Flores-Gutiérrez JP, Maldonado-Garza H, Salinas-Garza R, Zorrilla-Blanco P, Bosques-Padilla FJ. Obesity-related non-alcoholic steatohepatitis and TGF- β 1 serum levels in relation to morbid obesity. *Annals of Hepatology*. 2002; 36-39.
 13. Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990;11: 74-80.
 14. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology*. 1995;22: 1714-1719.
 15. García-Monzón C, Martín-Pérez E, Lo Iacono O, Fernández-Bernejo M, Majano PL, Apolinario A, Larrañaga E, Moreno-Otero R. Characterization of pathogenic and prognostic of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *Journal of Hepatoly*. 2000; 33: 716-724.





16. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21: 27-41.
17. Reid A. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2001;121:710-723.
18. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. *Gastroenterology.* 2001;121: 91-100.
19. Russo MW, Jacobson IM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hospital Physician.* 2002. 36-41.
20. Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Medicine.* 2002; 346:1121-1231.
21. Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Disease.* 1999;19:221-229.
22. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* 1999;116: 1413-1419.
23. Roberts K, Dunn K, Jean SK, Lardinois CK. Terapia Médica-Nutricional del Síndrome X. *Nutrition Reviews.* 2000; 30-37.
24. Mofrad PS, Sanyal AJ. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology Expert Column. Medscape General Medicine.* 2003.
25. Pérez-Carreras M, Castellano G, Gutiérrez A. Esteatohepatitis no alcohólica: una entidad no tan infrecuente. *Rev Esp Enferm Dig.* 1998; 90: 240-241.
26. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Walker JH, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J.





- NASH and Insulin Resistance: Insulin Hypersecretion and Association With the Insulin Resistance Syndrome. *Hepatology*. 2002;35: 373-379.
27. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Human of Pathology*. 1989;20: 594-598.
28. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: the most common cause of abnormal liver enzymes in the U.S. population. *Gastroenterology*. 2001;120: A65.
29. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37: 1202-1218.
30. Day CP, James O. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998; 114: 842-845.
31. Yang SQ, Zhu H, Lin HZ. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys*. 2000.378; 259-268.
32. Yang SQ, Lin HZ, Huang X, Diehl AM. Fatty liver vulnerability to lipopolysaccharide despite NF- κ B induction and caspase3 inhibition. *American Journal of Physiology-Gastrointest Liver Physiol*. 2001; in press.
33. Wedemeyer H, Manns MP. Fatty Liver Disease. It's More Than Alcohol and Obesity. 38th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). *Medscape Gastroenterology*. 2003.
34. Younoszai A, Ong JP, Luca Del Giacco, et al. Genomics of the Spectrum of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2002; 36: 381.





35. Saksena S, Leathart JB, Daly AK, Day CP. Manganese Dependent Superoxido Dismutase (SOD2) Targeting Sequence Polymorphism is associated with advanced Fibrosis in patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Hepatology*. 2003; 38:22.
36. Yang S, Lin H, Lane M, Clemens M, Diehl A. Obesity increase sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94: 2557-2562.
37. Valenti L, Ludovica A, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Florelli G, Fargion S. Tumor Necrosis Factor α Promoter Polymorphism and Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2002;122: 274-280.
38. Liz-Graña M, Gómez-Reino JJ. Tumour Necrosis Factor. Genetics, Cell action mechanism and involvement in inflammation. *Alergology and Immunology Clinical*. 2001;16: 140-149.
39. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by Nco I restriction of PCR product. *Human and Molecular Genetics*. 1992:353.
40. D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF A promoter region. *Inmunogenetics*. 1994;39: 150-154.
41. Di Bisceglie AM. Emerging Concepts in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medscape General Medicine*. 2003.





42. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30: 1356-1362.
43. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med*. 2000;342: 1266-1271.
44. Muñoz-Espinoza LE, Claudio-Espiricueta GJ, Maya-Treviño KA, Rodríguez-López MG. Factores de Riesgo para la esteatohepatitis no alcohólica. *Medicina Universitaria*. 2002;4: 143-147.
45. Gutiérrez A, Pérez-Carreras M, Colina F. Histological features of a serie of 94 patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Virchow Archiv*. 1999;453: 282.
46. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Gastroenterology*. 1999;94: 2467-2474.
47. Glasinovic JG. Fisiología de la Fibrosis Hepática. *Apuntes de Fisiología de Sistemas*. 2001.
48. Friedman SL. Liver fibrosis- from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. 2003;38: S38-S53.
49. Angulo P. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*. 2002;1: 12-19.
50. Angulo P. Current best treatment for non-alcoholic fatty liver disease. Expert opinion. *Pharmacother*. 2002;1: 12-19.





51. Guma C, Bviola L, Thome M, Galdame O, Albarez E. Ursodeoxycholic acid in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: results of prospective clinical controlled trial. *Hepatology*. 1997; 26: 3887A.
52. Ceriani R, Bunati S, Morini L. Effect of ursodeoxycholic acid plus diet in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1998;28: 3887A.
53. Vajro P, Francese A, Valerio G, Iannucci MP, Aragione N. Lack of efficacy of ursodeoxycholic acid for the treatment of liver abnormalities in obese children. *Journal of Pediatrics*. 2000;136: 739-743.
54. Yakaryilmaz F, Guliter S, Ozenirler S, Akyol G. Vitamin E treatment for patients with non-alcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study. *Journal of Hepatology*. 2003; 38: A4216.
55. Ersoz G, Gunsar F, Karasu Z, Akarca US, Batur Y. Management of Fatty Liver Disease with Vitamin E and C compared to UDCA treatment. 2003; 38: 216.
56. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Molecular and Immunology*. 1997;34: 391-199.
57. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevit HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94: 3195-3199.
58. Brand E, Schorr U, Kunz I, Kertmen E, Ringel J, Distler A, Sharma AM. Tumor necrosis factor-alpha -308 G/A polymorphism in obese Caucasians. *Int Obes Relat Metab Disord*. 2001;25: 581-585.





59. Wybranska I, Malczewska-Malec M, Niedbal S, Naskalski JW, Dembinska-Kiec A. The TNF alpha gene Nco I polymorphism at position -308 of the promoter influences insulin resistance and increase serum triglycerides after postprandial lipaemia in familiar obesity. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41: 501-510.
60. Katz A, Nambi SS, Mather K, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000;85(7): 2402-2410.
61. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in molecular biology.* Fourth edition. 1999. Editorial Board.
62. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual.* 2001. Third Edition. Tomo III. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
63. Sepúlveda-Nathaniel R, Bosques-Padilla FJ, Salinas R, et al. Histological findings in the liver biopsy of morbidly obese patients with normal liver enzymes. *Journal of Hepatology.* 2002; 36: 21.