



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CARRERA DE NUTRICIÓN, DIETÉTICA Y ESTÉTICA**

TEMA:

**Polimorfismo del gen PNPLA3 en la enfermedad del hígado
graso no alcohólico en estudiantes de la UCSG, año 2016.**

AUTORAS:

**Drouet Macías Keila Sarai
Leon Peralta Andrea Estefanía**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
LICENCIATURA EN NUTRICIÓN, DIETÉTICA Y ESTÉTICA**

TUTOR:

Gustavo Saúl Escobar Valdivieso.

Guayaquil, Ecuador

16 de marzo de 2017



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CARRERA DE NUTRICIÓN, DIETÉTICA Y ESTÉTICA

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo de titulación, fue realizado en su totalidad por **Drouet Macías Keila Saraí y Leon Peralta Andrea Estefanía**, como requerimiento para la obtención del título de **Licenciado en Nutrición, Dietética y Estética**.

TUTOR

Escobar Valdivieso, Gustavo Saúl

DIRECTOR DE LA CARRERA

Martha Victoria Celi Mero

Guayaquil, 16 de marzo del 2017



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CARRERA DE NUTRICIÓN, DIETÉTICA Y ESTÉTICA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Nosotras, **Drouet Macías, Keila Sarai y Leon Peralta, Andrea Estefanía.**

DECLARAMOS QUE:

El Trabajo de Titulación, **Polimorfismo del gen PNPLA3 en la enfermedad del hígado graso no alcohólico en estudiantes de la UCSG, 2016**, previo a la obtención del título de **Licenciado en Nutrición, Dietética y Estética**, ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de nuestra total autoría.

En virtud de esta declaración, nos responsabilizamos del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

Guayaquil, 16 de marzo del 2017

AUTORAS

Drouet Macías, Keila Sarai

Leon Peralta, Andrea Estefanía



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CARRERA DE NUTRICIÓN, DIETÉTICA Y ESTÉTICA

AUTORIZACIÓN

Nosotras, **Drouet Macías, Keila Sarai y Leon Peralta, Andrea Estefanía.**

Autorizamos a la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil a la **publicación** en la biblioteca de la institución del Trabajo de Titulación, **Polimorfismo del gen PNPLA3 en la enfermedad del hígado graso no alcohólico en estudiantes de la UCSG, 2016**, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y total autoría.

Guayaquil, 16 de marzo del 2017

AUTORAS:

Drouet Macías, Keila Sarai

Leon Peralta, Andrea Estefanía



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIA MÉDICAS
CARRERA DE NUTRICIÓN, DIETÉTICA Y ESTÉTICA
TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN**

Gustavo Saúl Escobar Valdivieso
TUTOR

Víctor Hugo Sierra Nieto
MIEMBRO I DEL TRIBUNAL

Leticia Geovanna Páez Galarza
MIEMBRO II DEL TRIBUNAL

Gabriela María Peré Ceballos
OPONENTE

REPORTE DE URKUND

The screenshot displays the URKUND web interface. The main content area shows document details for 'TESIS - PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO PNPLA3 EN ESTUDIANTES CON HIGADO GRASO NO ALCOHOLICO.pptx'. The document was presented on 2017-03-07 13:51 (-05:00) by keiladrouet@hotmail.com and received by gustavo.escobar.ucsg@analysis.orkund.com. The message content states: 'diapositivas prevalencia del polimorfismo PNPLA3. Mostrar el mensaje completo. 2% de esta aprox. 4 páginas de documentos largos se componen de texto presente en 1 fuentes.'

On the right side, there is a 'Lista de fuentes' (List of sources) panel with two tabs: 'Lista de fuentes' and 'Bloques'. The 'Lista de fuentes' tab is active and contains a table with the following entries:

Categoría	Enlace/nombre de archivo
	tesis TOCH5_0.1.docx
Fuentes alternativas	
La fuente no se usa	
	OSWALDO OLIVEROS.docx
	Ensayo argumentativo - Jessica Pinto D. docx
	UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DEL ECUADOR Cirrosis.docx

Below the document details, the main text area contains the following information:

HIGADO GRASO NO ALCOHÓLICO EN ESTUDIANTES DE LA UCSG. Año 2016. AUTORES: Keila Drouet Macías Andrea Leon Peralta

Tema PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO DEL GEN PNPLA3 EN LA ENFERMEDAD DEL HIGADO GRASO NO ALCOHÓLICO EN ESTUDIANTES DE LA UCSG. AÑO 2016.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Higado Graso No Alcohólico Enfermedad que se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos del parénquima hepático. Presentando anomalía persistente de las enzimas hepáticas, además del consumo de alcohol no significativo. El aumento en el IMC fue el factor más estrechamente asociado con el hígado graso.

Polimorfismo del Gen PNPLA3 Proteína PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing 3) es un triacilglicerol lipasa de 481 aminoácidos, cuya expresión génica en hígado es 10 veces más alta que en tejido adiposo.

The interface also shows a navigation bar at the bottom with icons for search, back, forward, and other functions, along with a status bar indicating '0 Advertencias', 'Reiniciar', 'Exportar', and 'Compartir' options. The system tray at the bottom right shows the time as 14:33 on 15/03/2017.

AGRADECIMIENTO

A Dios en primer lugar porque su amor e infinita misericordia me han permitido culminar una etapa más en mi vida, por llenarme de salud, fortaleza, sabiduría y conocimientos necesarios para poder culminar esta tesis, sin sus bendiciones no hubiera alcanzado lo logrado. A mis padres por su apoyo incondicional en cada etapa de mi carrera, ya que sin su apoyo esto no sería posible. En especial a mi madre por apoyarme tanto en mis decisiones y confiar en mí. A mi tutor Biólogo Saúl Escobar por su apoyo y guía en la realización de mi tesis, motivándome en realizar mi arduo trabajo. También agradezco a mi tía Esther Macías por haberme ayudado con sus conocimientos en cada tarea que se me dificultaba y haberme guiado para realizar un excelente trabajo. Agradezco a todos los que formaron parte de este largo recorrido que es la Universidad, a mis docentes, compañeras y amigas que compartieron conmigo esta etapa que estoy por culminar. Para todos ellos muchas gracias y que Dios los bendiga siempre.

Keila Sarai Drouet Macías

Agradezco en primer lugar a Dios, que gracias a Él estoy donde estoy, por darme salud, sabiduría y muchas ganas de seguir adelante, por permitirme alcanzar una meta más en mi vida. Agradezco a mis padres por el apoyo incondicional, por sus maravillosos consejos y siempre poder contar con ellos. En especial a mi madre Norma Peralta, que es la que me anima cada día de mi vida a seguir adelante y no decaer, dándome siempre las esperanzas de triunfar y animándome a conseguir lo que deseo y merezco. Agradezco a mi tutor Blg. Saúl Escobar, por la paciencia y la guía en todo este proceso de tesis. A mis profesores por todos los conocimientos brindados cada semestre. A mis compañeras y amigas de clases con quienes compartí todos estos años de estudio e hicieron más agradable y entretenida esta larga y satisfactoria jornada universitaria.

Andrea Estefanía Leon Peralta

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a Dios quien me supo guiar en el camino correcto, por haberme ayudado a superar cada obstáculo que se me presentaba, Él siempre ha estado a mi lado dándome fortaleza y energía para seguir adelante. También la dedico a mi familia la cual siempre me estuvo apoyando y guiando con sus sabios consejos para que llegue a ser una buena profesional.

Keila Sarai Drouet Macías

Esta tesis se la dedico a Dios, el pilar fundamental de mi vida, quien siempre me ha estado guiando por el mejor camino y dando las ganas y fuerzas para culminar esta etapa de la mejor manera. A mis padres que siempre han estado ahí apoyándome emocional, y económicamente. A mis amigas, compañeras de clase, y docentes por sus consejos y apoyo incondicional.

Andrea Estefanía Leon Peralta

ÍNDICE

PORTADA.....	
CERTIFICACIÓN.....	
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	
AUTORIZACIÓN.....	
REPORTE DE URKUND	
AGRADECIMIENTO	VI
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XIV
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	2
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1 Formulación del problema.....	4
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
3. JUSTIFICACIÓN.....	6
4. MARCO TEÓRICO	7
4.1 MARCO REFERENCIAL.....	7
4.2 MARCO TEORICO	10
4.2.1. Hígado graso.....	10

4.2.1.1. Hígado graso no alcohólico.....	10
4.2.1.1.1. Definición	10
4.2.1.1.2. Etiología	11
4.2.1.1.3. Epidemiología	11
4.2.1.1.4. Patogenia	13
4.2.1.1.5. Presentación Clínica	14
4.2.1.1.6. Laboratorio	15
4.2.1.1.7. Factores de Riesgo	16
4.2.2. Terapia Nutricional	17
4.2.2.1. Hidratos de carbono: Cantidad y Calidad.....	19
4.2.2.2. Total de grasa y ácidos grasos	20
4.2.2.3. Dieta mediterránea.....	20
4.2.2.4. Proteína.....	21
4.2.2.5. Los micronutrientes.....	21
4.2.3. Actividad Física	24
4.2.4. Genoma	25
4.2.4.1. Gen	25
4.2.4.2. Polimorfismo del gen PNPLA3	25
4.2.4.3. Técnica molecular para el diagnóstico	26
4.2.5. Técnica PCR en tiempo real	27
4.2.5.1. PCR en tiempo real: fundamentos	29
4.2.6. Mutación.....	29
4.1.6.1. Mutación en células somática	31
4.1.6.2. Mutación según la magnitud	31
4.1.6.2.1. Mutaciones a pequeña escala o puntuales.....	31

4.1.6.2.2.	Cambios de la secuencia del ADN: Delección.....	36
4.1.6.2.3.	Cambios de la secuencia del ADN: Inserción.....	36
4.1.6.2.4.	Mutación según su mecanismo	36
4.1.6.2.5.	Mutaciones Endógenas	37
4.1.6.2.6.	Incorporación de nucleótidos erróneos en la replicación ...	37
4.1.6.2.7.	Sustituciones por desaminación oxidativa.....	38
4.1.6.2.8.	Pérdida de bases por inestabilidad por N-glicosídico	38
4.1.6.2.9.	Mutación de las bases por mutágenos endógenos.....	39
4.1.6.2.10.	Mutaciones Exógenas	39
4.1.6.2.11.	Lesiones y mutaciones inducidas por agentes químicos ...	39
4.1.6.2.12.	Agentes químicos alquilantes	40
4.1.6.2.13.	Agentes intercalantes	40
4.1.6.2.14.	Agentes entrecruzantes.....	40
4.1.6.2.15.	Lesiones y mutaciones inducidas por agentes físicos	41
4.1.6.2.16.	Radiación UV.....	41
4.1.6.2.17.	Radiaciones ionizantes.....	41
5.	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	42
6.	IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE VARIABLES	43
7.	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	44
7.1	Justificación del método de elección.	44
7.2.	Población y muestras	44
7.2.2.	Criterio de Exclusión	45
7.3.	Técnica y Modelos de análisis de datos.....	45
7.3.1.	Técnica	45
7.3.2.	Instrumento.....	45

8. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	50
9. CONCLUSIONES.....	57
10. RECOMENDACIONES.....	58
11. BIBLIOGRAFÍA.....	59
12. GLOSARIO.....	66
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Alimentación recomendada para la EHGNA	18
Tabla 2: Recomendaciones para la pérdida de peso.....	22
Tabla 3: Clasificación de la Dieta para la pérdida de peso.	23
Tabla 4: Clasificación de las mutaciones	30
Tabla 5: Clases y tipos de mutaciones.	32
Tabla 6: Sustitución	33
Tabla 7 Transiciones.....	34
Tabla 8 Transversiones	35
Tabla 9: Condiciones de la mezcla para el PRE-MIX de PCR.....	48
Tabla 10: Programa LightCycler 1.x / 2.0 Instrumentos	49
Tabla 11: Alteraciones lipídicas y consumo de alcohol.....	51
Tabla 12 : Presencia de los genotipos PNPLA3 y el HGNA	54
Tabla 13: Genotipos del polimorfismo PNPLA3 y el hígado graso no alcohólico con el nivel de consumo de alcohol.	55
Tabla 14: Distribución de la asociación de hígado graso no alcohólico y el genotipo mutado GG en la población de estudio.	56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico # 1 Presencia de HGNA en los estudiantes de la UCSG año 2016 50

Gráfico # 2. Presencia del polimorfismo PNPLA3 en muestras de HGNA... 52

Gráfico # 3. Frecuencia de genotipos en muestras con HGNA según sexo 53

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Extracción de ADN en Sangre Periférica.....	70
ANEXO 2 Protocolo de Cuantificación de ADN	72
ANEXO 3 Protocolo de PCR en Tiempo Real	73
ANEXO 4 Extracción de ADN en Sangre Periférica.....	74
ANEXO 5 Proceso de Cuantificación de Ácidos Nucleicos.....	74
ANEXO 6 Proceso de PCR en Tiempo Real y Amplificación.....	75
ANEXO 7 Reactivos: FastStart DNA Master, H ₂ O, Reagent Mix.	75
ANEXO 8 Preparación de los reactivos.	75
ANEXO 9 Preparación del mix más las muestras previo a la amplificación.	76
ANEXO 10 Proceso de amplificación mediante el LightCycler.	76
ANEXO 11 Visualización del procedimiento del PCR en tiempo real.	77
ANEXO 12 Análisis De La Amplificación.	77
ANEXO 13 Curva de Melting con el alelo CG Heterocigoto.....	78
ANEXO 14 Curva de Melting con el alelo GG Homocigoto.....	78

RESUMEN

Introducción. El hígado graso no alcohólico (EHGNA) se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos del parénquima hepático. Objetivo. Determinar la presencia del polimorfismo del gen PNPLA3 en la EHGNA en estudiantes de la Universidad Católica Santiago de Guayaquil, año 2016 Metodología. El presente trabajo de titulación es tipo descriptivo, no experimental de corte transversal con un enfoque cuantitativo, se basó en el análisis del material genético de las muestras crio-conservadas de estudiantes con hígado graso no alcohólico. Resultados. De acuerdo a la presencia del hígado graso no alcohólico un 54% de la población de estudio no presenta hígado graso a diferencia del 46% de los cuales un 60,64% estuvo presente en el sexo femenino, el genotipo mutado estuvo presente en un 15,95% de las muestras con alteraciones lipídicas y un 22,52% con alteraciones no lipídicas, en relación a las variables de estudio hígado graso no alcohólico y el polimorfismo del gen PNPLA3 el genotipo mutado GG y el genotipo premutado CG, no existe una asociación debido que el valor correspondiente a la significancia para el genotipo GG (mutado) es $p=0,23$ y el genotipo heterocigoto CG (premutado) es $p=0,19$; por lo tanto se demuestra que ambas variables son consideradas independientes en este estudio con el número de muestra analizadas. Conclusión. En consideración tampoco se podría descartar la asociación del polimorfismo del gen PNPLA3 debido a que una mutación en una población determinada donde el número de muestras analizadas es inferior al número estimado.

PALABRAS CLAVES: POLIMORFISMO; PNPLA3; HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO; GENÉTICA; GENOTIPO; ALTERACIÓN LIPÍDICA.

ABSTRACT

The Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by the accumulation of fat in the liver cell of the parenchyma hepatic. Aim of the present investigation is determines the presence of the polymorphism of the gene PNPLA3 in the NAFLD in students of the Catholic University Santiago of Guayaquil, until 2016-2017. Approach methodology of the investigation is of a quantitative approach of descriptive, not experimental type and of transverse cohort, it was based on the analysis of the genetic material of representative samples of the students who suffer of nonalcoholic fatty liver disease. Results of agreement to the presence of the non-alcoholic fatty liver disease is observed that 54% of the population of study does not present fatty liver while a 46% of which the feminine sex presents 60,64% of suffering from fatty liver in relation to the masculine sex, the mutated genotype was present in 15,95 % of the samples with alterations lipídicas and 22,52 % with alterations not lipídicas, in relation to the variables of study oily not alcoholic liver and the polymorphism of the gene PNPLA3 the mutated genotype GG and the genotype premutado CG, an association does not exist owed that the value corresponding to the significancia for the genotype (mutated) GG is $p=0,23$ and the genotype heterocigoto CG (premutado) is $p=0,19$; therefore there is demonstrated that both variables are considered to be independent in this study by the number of sample analyzed. Conclusion. In consideration it might not also reject the association of the polymorphism of the gene PNPLA3 due to the fact that a mutation in a certain population where the number of analyzed samples is lower than the estimated number.

KEYWORDS: POLYMORPHISM; PNPLA3; NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE; GENOTYPES; GENETIC; FAT ALTERATION.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad hepática grasa no alcohólica NAFLD (*Nonalcoholic fatty liver disease*), hígado graso o esteatosis hepática no alcohólica, es una condición clínico patológica caracterizada por la infiltración de grasa en los hepatocitos del parénquima hepático en un porcentaje que excede del 5% al 10% de peso y anormalidad persistente de las enzimas hepáticas, además del consumo de alcohol no significativo. Esta enfermedad es extensamente estudiada a nivel mundial, por ser un problema de salud pública importante. Causa frecuente de hepatopatía crónica con una prevalencia mundial creciente que puede progresar a cirrosis y hepatocarcinoma (Lambis, 2016, pp. 89 - 93).

Existen varios estudios que indican que el polimorfismo del gen PNPL3 ha sido identificado como un determinante genético de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (HGNA) en términos de esteatosis, inflamación y fibrosis hepática (Dongiovanni & Valenti, 2016, pp. 1026 - 1037). En las poblaciones hispanas, se descubrió variación en PNPLA3 que puede afectar no sólo el grado de grasa contenido en el hígado, sino también elevaciones de transaminasas en suero (Qu, 2012).

Tyler Severson (2016) sostuvo que los polimorfismos genéticos y factores de varios genes contribuyen a hígado graso no alcohólico y sus resultados finales. Siendo el predominio del hígado graso no alcohólico más alto en poblaciones con condiciones metabólicas preexistentes como la obesidad y diabetes mellitus tipo 2, así como en latinoamericanos. El impacto del hígado graso continúa aumentando y no sólo por factores metabólicos sino también por predisposiciones genéticas que son otro determinante crítico, siendo en la actualidad la causa más común de enfermedad hepática crónica (Tyler Severson, 2016, pp. 42 - 56).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se ha observado en el Ecuador un incremento en la incidencia de hígado graso que ha llevado incluso a los laboratorios farmacológicos a establecer campañas sobre el cuidado del hígado. El incremento de la población que presenta hígado graso no alcohólico (HGNA), motiva la presente investigación a realizarse entre los estudiantes de la UCSG, debido a los malos hábitos alimenticios que presentan, con alto consumo de comida chatarra, bien por falta de tiempo o por la escasa oferta de alimentos nutritivos en su ámbito de estudios.

El HGNA, es una enfermedad que se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos del parénquima hepático en un porcentaje que sobrepasa del 5% al 10% de peso y presenta anormalidad persistente de las enzimas hepáticas, además del consumo de alcohol no significativo. La importancia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) se confirma por su elevada prevalencia en el mundo occidental (Lambis, 2016).

Se asume que la prevalencia de la EHGNA ha incrementado en los últimos años en paralelo con el aumento del predominio de la obesidad y DMT2. Sin embargo, existen pocos datos sobre esta tendencia, y la inmensa mayoría proviene de estudios transversales realizados en distintos períodos. Por ejemplo, de los estudios ecográficos como parte de un chequeo de salud realizado en Japón, con 39.151 participantes, la incidencia de hígado hiperecogénico pasó del 12.6% en 1989 al 28.4% en el año 2000, y el aumento en el IMC fue el factor más estrechamente asociado con el hígado graso (López, 2016).

Recientemente se publicó una revisión sistemática sobre la epidemiología y la historia natural de la EHGNA y la EHNA que afirma que esta enfermedad es la causa más frecuente de hipertransaminasemia y que su prevalencia e impacto se han elevado en los últimos años y continuarán

haciéndolo, por lo que podría convertirse en la causa más frecuente de enfermedad hepática avanzada en las próximas décadas (López, 2016).

Algunos estudios muestran que los pacientes con EHGNA ingieren más grasas saturadas, menos grasas insaturadas y menos vitaminas antioxidantes que los sujetos de un grupo control de la misma edad, IMC y sexo, y manifiestan una menor sensibilidad a la insulina en el grupo que ingería mayor cantidad de grasas saturadas.

Se ha evidenciado que la presencia de una mutación en el gen PNPLA3 puede conllevar a que la persona se encuentre predispuesta a acumular grasa en el hígado y, por tanto, a desarrollar esta enfermedad sin necesidad de tener unos perfiles clínicos desfavorables. El proyecto del Genoma Humano ha demostrado que hay un 0,1 % de variabilidad genética ente las personas. Esta variabilidad se debe especialmente a polimorfismos de un único nucleótido que consisten en el cambio de un nucleótido por otro en la secuencia del genoma habiéndose comprobado que muchos de estos polimorfismos genéticos pueden tener implicaciones patogénicas. De este modo, se ha reconocido que un polimorfismo en el gen PNPLA3 está estrechamente relacionado con la severidad de la lesión hepática (Urzúa, Miranda, Carreño, & Venegas, 2016, p. 330).

1.1 Formulación del problema

¿Existe una asociación del polimorfismo del Gen PNPLA3 en el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico en estudiantes de la UCSG?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la presencia del polimorfismo del gen PNPLA3 en la enfermedad del hígado graso no alcohólico en estudiantes de la Universidad Católica Santiago de Guayaquil, año 2016.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la presencia de hígado graso no alcohólico en los estudiantes de educación superior.
2. Determinar la frecuencia del polimorfismo PNPLA3 en las muestras de hígado graso no alcohólico.
3. Asociar la presencia del genotipo mutado GG del polimorfismo PNPLA3 y el hígado graso no alcohólico en los estudiantes de educación superior.

3. JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) en la actualidad es la causa más frecuente de hepatopatía crónica, con una prevalencia del 20 al 30% y va en aumento en relación con el incremento de la obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemia. Aunque en general la EHGNA como esteatosis hepática sigue un curso benigno, sin embargo un subgrupo de estos pacientes puede presentar una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) que se caracteriza por la presencia de inflamación del hígado con o sin fibrosis que puede llegar a evolucionar a cirrosis hepática hasta en un 40% de los casos, por lo que se estima a los pacientes con EHGNA como un grupo de riesgo potencial sobre todo si presentan una alteración en el polimorfismo del gen PNPLA3 incluso podría evolucionar a cirrosis y a un hepatocarcinoma convirtiéndose en un importante problema de salud pública.

Es primordial reconocer a los pacientes que desarrollan grados iniciales de fibrosis por la presencia del polimorfismo del gen PNPLA3, así como factores relacionados a la misma con el objetivo de actuar sobre esos factores estableciendo estrategias de prevención antes de que avancen a estadios más severos de la enfermedad (fibrosis avanzada o cirrosis). Diversos estudios han manifestado la genética como un factor importante en la progresión de la EHGNA, desde el descubrimiento de la asociación entre la mutación PNPLA3, esteatosis y esteatohepatitis, varios polimorfismos de un solo nucleótido se han identificado asociados con EHGNA. Esta investigación pretende determinar la presencia del polimorfismo del gen PNPLA3 en los estudiantes de la Universidad Católica Santiago de Guayaquil que presentan hígado graso no alcohólico, demostrando que no solo se debe al mal estilo de vida que llevan y comprobar así las diversas hipótesis que ya se han planteado en diversos estudios anteriormente.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 MARCO REFERENCIAL

La patogénesis de la EHGNA: interacciona entre la dieta, la microbiota intestinal, y los antecedentes genéticos. La patología hepática crónica más común en el mundo es la EHGNA, y alcanza un espectro de anomalías hepáticas que van de esteatosis hepática simple a esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis y hasta cáncer de hígado. Mientras que, si bien la patogénesis de EHGNA sigue siendo inconclusa, se ha propuesto un modelo multgolpe que aloja factores causales de una variedad de fuentes, incluyendo estímulos intestinales y proinflamatorios adiposos que actúan sobre el hígado simultáneamente (Yu, 2016, pág. 2).

Estudios de previas comunicaciones celulares y los estudios moleculares de modelos de pacientes y animales han determinado varios mecanismos patogénicos comunes de la EHGNA, incluyendo citocinas proinflamatorias, lipotoxicidad, estrés oxidativo y estrés del retículo endoplasmático. En años recientes, la microbiota intestinal ha ganado mucha atención, y la disbiosis es reconocida como un factor crucial en EHGNA. Asimismo, varias variantes genéticas han sido identificadas a través de todo el genoma mediante estudios de asociación, en particular rs738409 (Ile748Met) en PNPLA3 y rs58542926 (Glu167Lys) en TM6SF2, que son alelos de peligro crítico de la enfermedad (Yu, 2016, pág. 5).

No obstante, una dieta rica en grasas y estilos de vida sedentaria son factores de riesgo típicos para la EHGNA, la interacción entre la dieta, microbiota intestinal y los antecedentes genéticos (prevalencia del polimorfismo del gen PNPLA3) se cree que son más significativos en el desarrollo y progresión de la EHGNA (Yu, 2016, pág. 6).

“La proteína PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing 3) es un triacilglicerol lipasa de 481 aminoácidos, cuya expresión génica en hígado es 10 veces más alta que en tejido adiposo” (Urzúa, Miranda, Carreño, & Venegas, 2016, p. 330). Estudios realizados por Dongiovanni & Valenti (2016) muestran que el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs738409 en el gen de PNPLA3, situado en el cromosoma 22, en el cual existe una sustitución de citosina (C) por guanina (G), la que a su vez codifica la variante I148M (cambio del aminoácido isoleucina por metionina) el cual fue descubierto en el 2008. El polimorfismo del gen PNPL3 ha sido reconocido como un determinante genético de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (HGNA) en términos de esteatosis, inflamación y fibrosis hepática (Dongiovanni & Valenti, 2016, pp. 1026-1037).

En Chile existe un estudio del polimorfismo rs738409 del gen PNPLA3 ejecutado en pacientes con hígado graso no alcohólico (HGNA), patología en la cual esta variante genética ha confirmado ampliamente ser un factor asociado. En dicho trabajo realizado en 166 pacientes se halló una alta prevalencia del genotipo homocigoto GG (39%), asociándose a la presencia de esteatosis hepática (OR 1,98; $p=0,001$), pero no a la presencia de fibrosis (Urzúa et al., 2016).

El actual polimorfismo del gen PNPLA3 está hipotéticamente asociado con la patología del hígado graso no alcohólico, debido al acumulo de triglicéridos en los hepatocitos.

Análisis genético de la enfermedad de hígado graso no alcohólico dentro de una población del caribe hispano. Dentro de una población caribeña-hispana en la ciudad de Nueva York. Se exploró los posibles factores de riesgo genético implicados en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Un total de 316 personas, incluyendo 40 sujetos con EHGNA probado por biopsia, 24 controles étnicamente emparejados no-EHGNA, y un 252 muestreo aleatorio mezclado étnicamente del condado de Bronx, Nueva York fueron examinados (Edelman, 2015, pág. 558).

Se realizó un análisis de Genotipo para determinar las frecuencias alélicas de 74 conocido como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con EHGNA riesgo basado en el anterior genoma de todo el estudio de asociación (GWAS) y candidatos estudios de genes. Asimismo, la región codificante completa de PNPLA3, un gen que muestra la asociación más fuerte a la EHGNA fue sometido a secuenciación *Sanger* (Edelman, 2015, pág. 560).

Los resultados apuntan que las variaciones rara y común del ADN en PNPLA3 y SAMM50 pueden estar correlacionadas con el EHGNA en este pequeño estudio poblacional, mientras que las variaciones comunes de ADN en CHUK y ERLIN1, pueden tener una interacción protectora. SNP comunes en ENPP1 y ABCC2 tienen asociación sugestiva con el hígado graso, pero con mínima importancia. En conclusión, los pacientes hispanos de ascendencia caribeña pueden tener diferentes interacciones con modificadores genéticos de NAFLD; Por consiguiente, una investigación más profunda con un tamaño de muestra más grande, en esta población hispano-caribeña está avalada por Edelman en el año 2015 (Edelman, 2015, pág. 565).

4.2 MARCO TEORICO

4.2.1. Hígado graso

El hígado graso o también conocida como esteatosis hepática es una entidad patológica que se caracteriza por acumulación de glóbulos de grasa dentro de los hepatocitos. Es la forma más frecuente de esteatosis, no siempre se acompaña de lesión hepática debido a la gran capacidad funcional del hígado. Esta patología es diagnosticada por ultrasonido, sin embargo, es necesario usar algunos criterios para su diagnóstico (Bermejo, 2011, pp. 30-42).

4.2.1.1. Hígado graso no alcohólico

4.2.1.1.1. Definición

La enfermedad hepática grasa no alcohólica o también conocida como esteatosis hepática no alcohólica es una condición clínico patológico caracterizado por la infiltración de grasa en los hepatocitos del parénquima hepático en un porcentaje que excede del 5% al 10% de peso y anormalidad persistente de las enzimas hepáticas, además del consumo de alcohol no significativo (Lambis, 2016, pp. 89-93).

4.2.1.1.2. Etiología

En 1980, (Ludwig, Viggiano, & McGill, pp. 434-438) acuñó el término de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) al puntualizar una serie de 20 pacientes sin antecedentes de ingesta de alcohol, con datos bioquímicos e histológicos compatibles con hepatitis alcohólica.

La enfermedad por hígado graso no alcohólico incluye a diversos padecimientos que se caracterizan por la acumulación de lípidos en el hígado, que pueden acompañarse de otras lesiones histológicas, semejante al daño hepático por alcohol, aunque su origen es distinto. Su alta prevalencia y daño progresivo tienen repercusiones clínico-epidemiológicas. Incluye al esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis y hepatocarcinoma dentro de su presentación evolutiva. El cual es relacionado con la obesidad, preferentemente abdominal, diabetes mellitus tipo II y síndrome metabólico (Bermejo, 2011, pp. 30-42). Incluye al esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis y hepatocarcinoma dentro de su presentación evolutiva. El cual es relacionado con la obesidad, preferentemente abdominal, diabetes mellitus tipo II y síndrome metabólico.

4.2.1.1.3. Epidemiología

La EHNA fue descrita inicialmente en 1980 por Ludwig y col. Está íntimamente relacionada con la obesidad, la DM y el SM, siendo entonces la patología hepática más habitual y ascendente con una prevalencia de 27 a 38% en países occidentales, incitada por la epidemia de la obesidad, la diabetes y el estilo de vida sedentario observándose una correlación con el IMC, raza, etnia y sexo, habiendo mayor riesgo en hispanos, hombres y edad avanzada (Castillo, 2015).

La prevalencia de hígado graso no alcohólico continuará aumentando ya que se asocia frecuentemente con una serie de condiciones coexistentes como un entorno de elevadas tasas de obesidad, grasa visceral, diabetes tipo 2, dislipidemia, y otros trastornos asociados con el síndrome metabólico, que están estrechamente relacionadas con hígado graso no alcohólico (Wong, 2016).

Algunos datos epidemiológicos demuestran que la prevalencia de la EHGNA en los Estados Unidos es mayor en la población hispana que en la caucásica y en la afroamericana, con 30-32% en la población en general, con tasas del 39-45% entre los hispanos, 30-33% entre los blancos no hispanos, y 23-24% entre los negros no hispanos. Este hecho, unido a la observación de que mutaciones puntuales (polimorfismos) de determinados genes, como el de la adiponutrina o de la apolipoproteína C3, acrecientan el riesgo de la EHGNA, apuntan que existen factores genéticos que predisponen a padecer esta enfermedad hepática (Monzón, 2011).

Tradicionalmente se ha estimado que la EHGNA es más frecuente en mujeres, pero estudios recientes indican que la esteatohepatitis concretamente es más prevalente en hombres. Tanto la prevalencia como la intensidad de la EHGNA incrementan con la edad. Así, los casos de esteatohepatitis con fibrosis avanzada y cirrosis son raros en adultos jóvenes, mientras que son más frecuentes entre la 6ª y 8ª décadas de la vida (Monzón, 2011).

La EHNA tiene una prevalencia en la población general de 3 a 5% y en obesos mórbidos de 37%. Existe un disminuido número de pacientes con HGNA “delgados” con Resistencia a la Insulina (RI) que no presentan los otros componentes del SM (hasta 7% con IMC normal) (Castillo, 2015).

La importancia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico se confirma por su eminente prevalencia en el mundo occidental. En países latinoamericanos como: México, Chile y Brasil se estima una prevalencia de

17 a 33%, con aumento del doble en pacientes obesos y que afecta a 8 de cada 10 sujetos con síndrome metabólico. Esto es importante porque cada vez existe más evidencia de la relación entre enfermedad por hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular. Varios estudios indican que los pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico tienen mayor riesgo de comorbilidad cardiovascular por esto la detección o hallazgo de enfermedad por hígado graso no alcohólico debe constituir una alerta para el profesional (Urzúa et al.,2016).

4.2.1.1.4. Patogenia

El origen de la enfermedad por hígado graso no alcohólico es la disfunción del metabolismo lipídico, donde los ácidos grasos libres que llegan al hígado no se aprovechan como fuente de energía (beta-oxidación) pero sí se almacenan o exportan en complejos proteicos, como lipoproteínas. Esta disfunción se debe al efecto de factores locales y sistémicos que controlan el equilibrio de las rutas metabólicas de lípidos en el hígado.

Un modelo teórico, ampliamente aceptado para explicar la patogenia y progresión de la enfermedad por hígado graso no alcohólico, es la hipótesis de los “dos golpes” (*two-hit hypothesis*).

En la que un primer golpe es responsable de la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (*esteatosis*) y el segundo golpe se refiere al estrés metabólico-oxidativo y citocinas que se producen como respuesta adaptativa para recuperar la homeostasis lipídica (Salameh, et al., 2016, pp. 175-191).

Otros agentes que participan en la génesis de la enfermedad por hígado graso no alcohólico han sido menos caracterizados. Por ejemplo, factores ambientales como la dieta hipercalórica, rica en hidratos de carbono, grasa saturada y alimentos industrializados, unida al sedentarismo con escaso gasto energético. La microbiota y permeabilidad intestinal también juegan un papel importante al regular el paso de endotoxinas. Igual participan los factores genéticos, reflejados en la sobreexpresión de genes de adipocinas, mediadores proinflamatorios y proapoptóticos; o mediante la asociación con polimorfismos de genes como PNPLA3, MBOAT7 o la apolipoproteína C3 (Salameh, et al., 2016, pp. 175 - 191).

4.2.1.1.5. Presentación Clínica

Márquez (2008) indicó que un elevado número de pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica están siendo asintomáticos en el momento del diagnóstico. La sospecha surge por el hallazgo imprevisto de una hepatomegalia o alteraciones de la biología hepática en el curso de un examen de salud o al consultar por una enfermedad extrahepática. El incremento de las transaminasas o la evidencia ecográfica de hígado graso es informado en ocasiones tras un estudio por enfermedad vesicular. Cuando surgen los síntomas, éstos suelen ser inespecíficos, siendo la astenia posiblemente el más común referido, aunque no se correlaciona bien con la severidad de la lesión histológica. Otro síntoma usual son las molestias en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, de carácter vago, sin que se describa como dolor (Márquez, 2008, pp. 71 - 75).

Un disminuido número de pacientes experimentan síntomas que indican una enfermedad hepática más severa, pudiendo demostrar prurito, anorexia y náuseas (AGA, 2002).

En el año 1980, Ludwig señaló que no hay signos patognomónicos de hígado graso no alcohólico. La obesidad es el hallazgo más común presente

en la exploración clínica, estando presente en 30-100% de los pacientes en varios estudios transversales (Ludwig, Viggiano, & McGill, 1980, pp. 434 - 435).

Por ello se ha planteado que el incremento en el perímetro de la cintura o el aumento en el índice cintura-cadera, en pacientes que manifiestan obesidad central, sean los que más se relacione con la enfermedad hepática grasa no alcohólica, incluso con un peso normal. El signo más frecuente de la enfermedad hepática es la hepatomegalia, dato referido hasta en un 50% de los pacientes en diferentes estudios (Márquez, 2008, pp. 56 - 62).

En la década de los 90, Powell reveló que un pequeño porcentaje de pacientes tenían estigmas de enfermedad hepática crónica. De los estigmas conocidos, inciden como los más comunes, la presencia de arañas vasculares y de eritema palmar. La aparición de ictericia, edemas, asterixis y signos de hipertensión portal se muestran en estadios avanzados de la cirrosis (Powell EE, C. W., 1990, pp. 79 - 82).

4.2.1.1.6. Laboratorio

Comúnmente, la mayoría (50-90%) de los pacientes con HGNA presenta una elevación de las transaminasas (Powell EE, C. W., 1990, pp. 72 - 80). El grado de elevación enzimática no es evidente y suele estar entre 1 y 4 veces el límite alto de la normalidad, sin embargo, algunos pacientes pueden tener unos niveles normales o sólo elevaciones intermitentes de las transaminasas.

No obstante, la mayoría de las veces los niveles de alanina aminotransferasa (GPT) son más elevados que los niveles de la aspartato aminotransferasa (GOT), en ocasiones los niveles de GOT pueden ser más elevados, especialmente en estadio de cirrosis. La relación GOT/GPT es inferior a 1 en el 65-90% de los pacientes (Márquez, 2008, p. 62).

Cuando GOT/GPT es superior a 1, sugiere que hay un desarrollo fibrótico desde el HGNA. Aun así, la relación GOT/GPT rara vez es mayor de 2. Los valores de ALT no se correlacionan con el grado de esteatosis o fibrosis.

La gamma-glutamilttransferasa (GGT) se puede hallar elevada, pero hay pocos datos acerca de la frecuencia y grado de elevación. También la fosfatasa alcalina está a veces elevada, pero su valor suele ser menor a dos veces el límite alto de la normalidad.

En pacientes en estado de cirrosis pueden encontrarse otras alteraciones analíticas incluyendo hipoalbuminemia, prolongación del tiempo de protrombina y más tardíamente hiperbilirrubinemia. En la mitad de los pacientes se detecta un incremento de las nieves séricas de ferritina, y en un 6-11%, un aumento de la saturación de transferrina.^{71, 109, 110} Sin embargo, los niveles hepáticos de hierro son normales (Márquez, 2008, p. 62).

4.2.1.1.7. Factores de Riesgo

Estudios demuestran que el consumo de bebidas azucaradas está directamente relacionado con la ganancia de peso en diferentes grupos de edad, lo que lograría convertirse en un factor para desarrollar HGNA; Así mismo, se ha destacado que la obesidad abdominal, la obesidad, la diabetes tipo 2 y las dislipidemias, también son factores predictores de HGNA (Gómez & G., 2013, pp. 1792-1796).

La alta incidencia de HGNA en individuos con sobrepeso, obesidad y obesidad abdominal es una alerta para una población con alta prevalencia de obesidad. Además de los riesgos cardiovasculares que induce la obesidad, el HGNA está relacionado a un mayor riesgo de resistencia a la insulina, hiperlipidemia, hipertensión, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Byrne, 2013, pp. 483-495).

Estudios han señalado que desde el año 2008 se continúan descubriendo los factores genéticos que intervienen notablemente a la progresión del hígado graso no alcohólico, desde su inicio, la gravedad, y el resultado final. El conocimiento de estos elementos genéticos se podría obtener una mejor comprensión de la patología de la enfermedad hígado graso no alcohólico (Tyler Severson, 2016, pp. 42-56).

La variante más estudiada de PNPLA3 es rs738409, la variación de tipo salvaje de la citosina guanina en nt444 (444C> G), que cambia la isoleucina en metionina en el residuo 148. Este SNP está asociado con un incremento de la acumulación de triglicéridos hepatocelular y el desarrollo de hígado graso no alcohólico (Kotronen A, 2009). Por su parte, Tyler Severson, (2016) sostuvo que los polimorfismos genéticos y factores de varios genes contribuyen a hígado graso no alcohólico y sus resultados finales (Tyler Severson, 2016, sec. Conclusión)

4.2.2. Terapia Nutricional

La pérdida de peso conseguida a través de la dieta y la actividad física deben ser la terapia de primera línea para el HGNA. Sin embargo, hay una falta de recomendaciones dietéticas basadas en la evidencia. Las recomendaciones realizadas por la American Diabetes Association (ADA) cuyo objetivo es reducir el riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares también pueden ser aplicables a la población que presente HGNA, ya que existe un número limitado de estudios de intervención aleatorizados para generar recomendaciones dietéticas basadas en la evidencia para la EHGNA (Conlon, 2013, pp. 4093-4114).

Tabla 1: Alimentación recomendada para la EHGNA

NUTRIMENTO	CONSUMO RECOMENDADO
Ácidos grasos saturados	<7% del total de las calorías totales
Grasas trans	Como mínimo posible.
Ácidos grasos insaturados	El aceite de pescado 1 gramo / día (docosahexaenoico eicosapentaenoico). Hasta un 25% en ácidos grasos monoinsaturados.
Colesterol	No especificado.
Hidratos de carbono	≥50% de grano entero; evitar el jarabe de maíz de alta fructosa.
Fibra	El consumo de fibra misma medida que la población general (14 g de fibra / 1000 kcal).
Proteínas	10% -35% de las calorías totales. Animal - magra o proteína de origen vegetal.
Micronutrientes	Vitamina E 800 IU / día.
Sodio	No especificado.
Alcohol	Los pacientes con hígado graso no alcohólico deben evitar grandes cantidades de alcohol (3 bebidas / día para las mujeres, 4 bebidas / día para los hombres).

Adaptado de: (Conlon, Nutritional Management of Insulin Resistance in Nonalcoholic, 2013).
Modificado por: Autoras, 2017.

4.2.2.1. Hidratos de carbono: Cantidad y Calidad

Fuente de carbohidratos, fibra y el índice glucémico son importantes a considerar en la planificación de comidas para los pacientes con (HGNA); Los pacientes con (HGNA) se pueden beneficiar de una dieta moderada a baja en carbohidratos (40%-50% de las calorías totales), disminuir o evitar el consumo de fructosa puede ser importante en la intervención nutricional para la población con (HGNA), particularmente en pacientes resistentes a la insulina con un control glucémico deficiente (Conlon, 2013, pp. 4093-4114).

Estudios realizados recientemente, demostraron que jóvenes con genotipo GG, son susceptibles al aumento de grasa en el hígado, tras incrementar carbohidratos a su dieta, especialmente al alto consumo de azúcares (Davis, Weigensberg, Allayee, & Goran, 2010, pp. 1522–1527).

Cinco estudios han comparado los efectos de la fructosa o jarabe de maíz de alta fructosa en glucosa o sacarosa sobrealimentación en el contenido de grasa en el hígado. De éstos, sólo un estudio de corta duración encontró fructosa, pero no de glucosa, fructosa isocalórica (25% de la ingesta calórica diaria total durante 10 semanas) en comparación con la glucosa consumo se ha demostrado que es perjudicial sensibilidad a la insulina (Järvinen, 2015, pp. 9127-9138).

Por consiguiente, la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomienda alentar a las personas a limitar el consumo de hidratos de carbono simples o refinados, y aumentar el consumo de hidratos de carbono complejos, como los que se encuentran en los granos enteros, legumbres, frutas, y hortalizas para una buena salud y un mejor control de la glucosa en sangre (Conlon, 2013, pp. 4093-4114).

4.2.2.2. Total de grasa y ácidos grasos

La dieta, junto con el aumento de ácidos grasos monoinsaturados y dietética n -3 AGPI (Omega-3 y 6, ácidos grasos poliinsaturados). Esta distribución de macronutrientes es típica en las dietas de estilo mediterráneo. Evitando JMAF (Jarabe de maíz de alta fructosa) puede ser una recomendación importante para los pacientes con (HGNA). Las dietas ricas en n -3 PUFA y MUFA pueden conferir beneficios anti-inflamatorios y cardiovasculares adicionales, en particular cuando reemplazan los AGS (ácidos grasos saturados) (Conlon, 2013, pp. 4093-4114).

En un estudio reciente, éste evidenció que el contenido de grasa en el hígado disminuyó durante la dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados y baja en ácidos grasos saturados (AGA, A. G., 2002, pp. 1705-1725).

4.2.2.3. Dieta mediterránea

La dieta mediterránea es promocionada por su asociación con la mejora de la salud cardiovascular, y es baja en carbohidratos con alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, verduras, frutas, legumbres, aceite de oliva/nueces (MUFA – Ácidos grasos monoinsaturados) y pescado (n -3 AGPI), con cantidades moderadas de vino y cantidades mínimas de los AGS. No existe una definición independiente para el patrón de alimentación de estilo mediterráneo, sino que suele ser un reflejo de las prácticas geográficas y culturales de los habitantes de la región mediterránea; Las dietas bajas en carbohidratos y altas en MUFA se evidencian para mejorar los resultados en pacientes con hígado graso no alcohólico es difícil discernir si los efectos se atribuyen a la ingesta alta en ácidos grasos monoinsaturados, a la reducida ingesta de carbohidratos (con la posible cetogénesis), o ambos (Conlon, 2013, pp. 4093-4114).

4.2.2.4. Proteína

Las Directrices de La Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD) no se refieren específicamente la ingesta de proteínas, y la ADA recomienda una ingesta de proteínas similares a la población en general, sobre la base de la norma recomendada (RDA) e ingestas dietéticas que recomiendan un consumo del 10% hasta un 35% de las calorías totales, en la cual se prefiere el consumo de carnes magras (pollo, carne, pescado, etc.) o de origen vegetal (Conlon, 2013, pp. 4093-4114).

4.2.2.5. Los micronutrientes

Las recomendaciones de la ADA no son compatibles con una vitamina o la ingesta de minerales más allá de lo que se recomienda para la población en general. Del mismo modo, una reciente revisión concluyó que no hay pruebas suficientes a favor o en contra del uso de la suplementación en pacientes con HGNA. Sin embargo, los antioxidantes pueden beneficiar al paciente mediante la protección contra el estrés oxidativo; Las Directrices de la AASLD recomiendan una ingesta de vitamina E de 800 unidades internacionales (UI) por día como terapia de primera línea para adultos no diabéticos con EHNA comprobado por biopsia y los beneficios también han sido reportados en niños (Conlon, 2013, pp. 4093-4114).

Tabla 2: Recomendaciones para la pérdida de peso.

Modificación de la dieta	Por lo menos 3-5% de pérdida de peso lograda por la dieta hipocalórica con o sin ejercicio, generalmente reduce la esteatosis hepática, pérdida de peso y el 10% puede ser necesaria para mejorar necroinflamación.
El aumento de la actividad física	Un programa de ejercicio regular con 200 min / semana de intensidad moderada. El ejercicio solo en adultos con HGNA sólo puede reducir la esteatosis hepática.
Las intervenciones conductuales	Incluido el autocontrol, el establecimiento de objetivos de pérdida de peso, frente a barreras para el cambio, y la estrategia sobre el mantenimiento de los cambios a largo plazo en el estilo de vida. Los participantes recibieron intervenciones conductuales generalmente perdieron 4% del peso basal a los 12-18 meses.
Los agentes farmacológicos	Tienen como objetivo disminuir el apetito, bloquear la absorción de grasa, o reducir el volumen del estómago que sólo puede utilizarse bajo la estricta supervisión de un especialista.
Suplementos dietéticos	A pesar de una amplia gama de suplementos dietéticos disponibles para el público, muy pocos son eficaces en el largo plazo y no se consideran una opción saludable para bajar de peso.

Adaptado de: (Ventilador JG, Rolw of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease 2013, Journal of Gastroenterology, pp. 81 - 87).

Modificado por: Autoras, 2017.

Tabla 3: Clasificación de la Dieta para la pérdida de peso.

Categorías	Descripción
Dietas bajas en grasa	Reducción del porcentaje de grasa en la dieta (25% de grasa), sin restricción deliberada de ingesta de calorías.
Dietas bajas en carbohidratos	Reducción del porcentaje de carbohidratos en la dieta, es decir, ingesta, relativamente alta en proteínas y grasas, a veces conducen a dieta <i>cetogénica</i> .
Dietas bajas en calorías	Proporcionar aproximadamente 1000-1200 calorías al día para las mujeres y de 1500 a 1800 calorías para los hombres.
Dietas muy bajas en calorías	Proporcionar 200-800 calorías por día, para mantener una ingesta de proteínas, pero la limitación de calorías de grasa y carbohidratos. Deben cumplirse bajo supervisión médica para evitar efectos secundarios adversos, tales como la pérdida de masa muscular magra, aumento de los riesgos de gota, de piedra en la vesícula biliar, y los desequilibrios de electrolitos.

Adaptado de: (Ventilador JG, Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease 2013, Journal of Gastroenterology, pp. 81 - 87).

Modificado por: Autoras, 2017.

4.2.3. Actividad Física

Como tratamientos para la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) han sido recomendadas, las modificaciones de estilo de vida específicamente para bajar de peso, el ejercicio físico y terapia de comportamiento cognitivo. Existe evidencia para documentar que la disminución de la actividad física se asocia con una mayor severidad de la EHNA. Por el contrario, el aumento de la actividad física se asocia con reducción de la grasa abdominal, reducción de grasa intrahepática, y una mejor sensibilidad a la insulina, todos factores que están presentes en los individuos con HGNA y el síndrome metabólico (Zelber Sagi & Ratziu V, 2011, pp. 3377-3389).

La modificación del estilo de vida, combinando el cambio de dieta y ejercicio produce una reducción de triglicéridos en el contenido hepático (CHTG) e incluso reversión de la inflamación con la pérdida de peso de más del 10% en las personas con HGNA. Se demuestra que a las 12 semanas de tratamiento con ejercicios dieron lugar a una reducción del 16% de triglicéridos en el contenido hepático, independientemente de la pérdida de peso en personas con HGNA (Zelber Sagi & Ratziu V, 2011, pp. 3377-3389).

Se puede sugerir que el ejercicio 3-4 veces a la semana, por 20-40 minutos por sesión con el logro del 70% del VO_2 máx es ideal para la movilización de la grasa de hígado entre los pacientes con HGNA. Esto se considera un nivel moderado (Golabi, Afdhal, & Gerber, 2016, pp. 6318–6327).

En el tratamiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, el ejercicio se considera que es una de las intervenciones más eficaces. La adaptación hepática más sorprendente para el ejercicio es la disminución del contenido de lípidos hepáticos, incluso cuando la pérdida de peso es en general (Zelber Sagi & Ratziu V, 2011, pp. 3377-3389).

4.2.4. Genoma

El genoma es el conjunto de todos los genes que define en forma completa la naturaleza de un organismo vivo. El genoma es considerado el patrimonio completo de información genética, comprendida en ochenta mil genes organizados en 46 cromosomas que están ubicados en el núcleo de las células (Zapata, 1999, pp. 13 - 17).

El primer estudio de asociación de genoma completo (GWAS) de hígado graso no alcohólico realizada por Romeo et al. (2008) identificó que rs738409 alelo G del dominio que contiene la fosfolipasa-3-como patatina (PNPLA 3) se asoció significativamente con el aumento de los niveles de grasa hepática y la susceptibilidad a la EHNA. Los análisis posteriores demostraron que PNPLA3 rs738409 también se asocia con gravedad de la enfermedad y la progresión (Sookian & Pirola, 2011, pp. 1883–1894).

4.2.4.1. Gen

Un gen es una unidad de información en un locus de Ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto funcional, o Ácido ribonucleico (ARN) o proteínas y es la unidad de herencia molecular (Soberón & Zapata, 1999, pp. 30 - 32).

4.2.4.2. Polimorfismo del gen PNPLA3

“La proteína PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing 3) es un triacilglicerol lipasa de 481 aminoácidos, cuya expresión génica en hígado es 10 veces más alta que en tejido adiposo. (Urzúa, 2016, p.330).

PNPLA3 rs738409 fue la primera variante genética identificada que contribuye a las diferencias en los niveles de grasa en el hígado y la susceptibilidad a la EHNA (Romeo, 2008). Resultados de varios estudios confirman la asociación entre PNPLA3 rs738409 y el aumento de riesgo de hígado graso no alcohólico en una población china Han, que hace hincapié en sus efectos sobre el hígado graso no alcohólico a través de múltiples grupos étnicos (Xiaoling Wang, 2016, pp. 1 - 7).

El gen PNPLA3 codifica una proteína de 481 residuos, muestra actividad lipasa en contra de triglicéridos (TG) en los hepatocitos y ésteres de retinilo en las células estrelladas hepáticas (He et al., 2010; Huang et al, 2011; Pirazzi et al 2014). Mutación sin sentido (I148M) en PNPLA3 conduce a una pérdida de la función y por lo tanto promueve la esteatosis hepática mediante la limitación del hidrólisis de triglicéridos (Xiaoling Wang, 2016, pp. 1 - 7).

4.2.4.3. Técnica molecular para el diagnóstico

En el año 1953, Watson y Crick indicaron que el elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena, de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice. Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay, Ibarra & Velasquillo, 2013, pp. 70 - 78).

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, *polymerase chain reaction*) en tiempo real es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (*ADN* y *ARN*). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80, que permite detectar el ADN a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces (Tamay et al., 2013).

4.2.5. Técnica PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada fielmente (Tamay et al., 2013).

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad (Brechtbuehl et al., 2001) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Los ensayos de la PCR en tiempo real son entre 10,000 y 100,000 veces más sensibles que las pruebas de protección por ARNasa, 1 1,000 veces más sensibles que la hibridación por Dot blot y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN (Wong & Medrano, 2005, p. 75).

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. La molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina). La PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay et al., 2013).

Desnaturalización: En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado y a su vez de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso (p 72).

Hibridación: En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente (p 72).

Extensión: En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'.

La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (p 73).

4.2.5.1. PCR en tiempo real: fundamentos

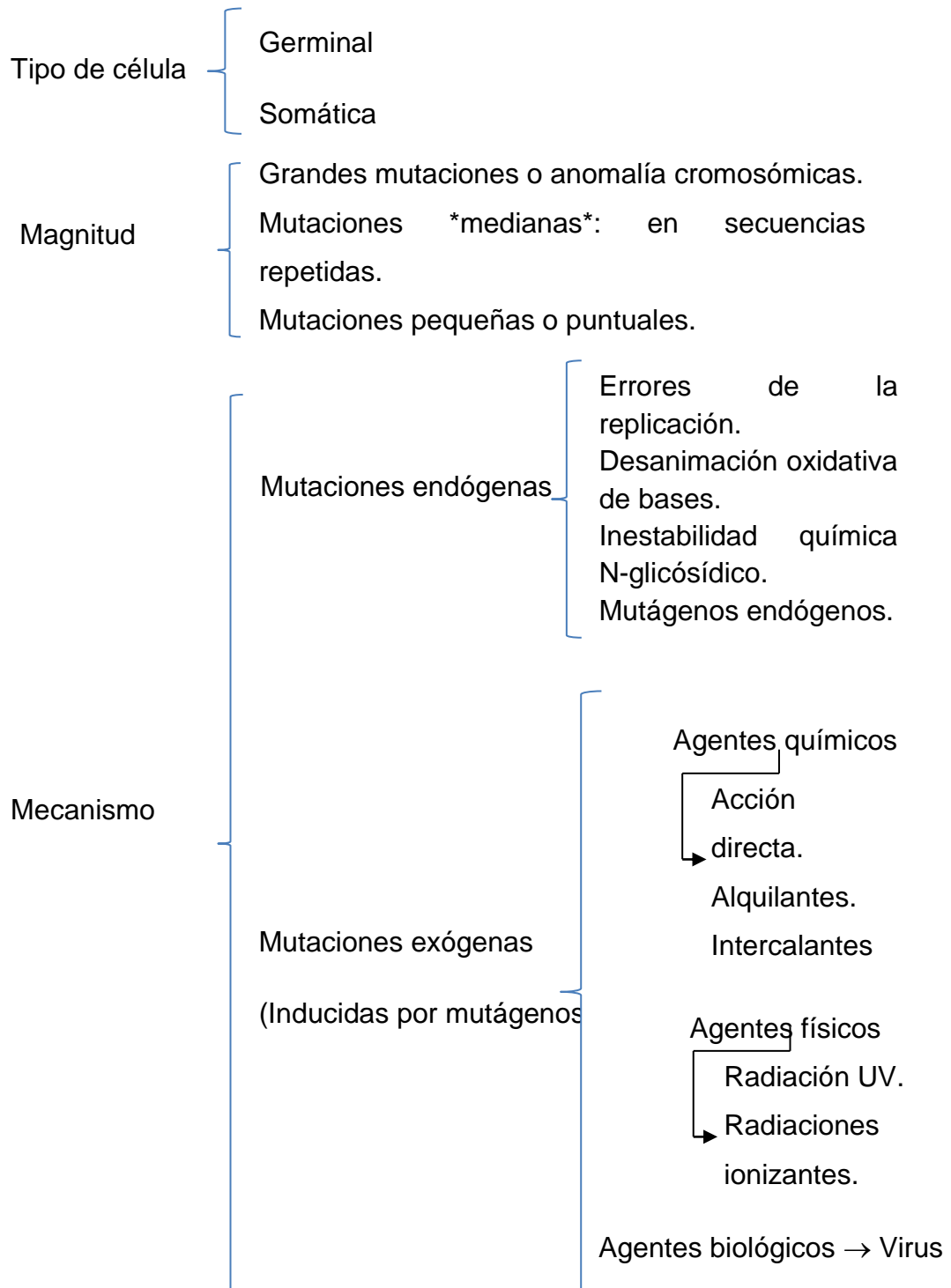
Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores, en 1992, al videograbar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV. Desde ese tiempo el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción (Tamay et al., 2013).

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos (Tamay et al., 2013).

4.2.6. Mutación

Se la define como una alteración en la secuencia del ADN (*Ácido desoxirribonucleico*) de un individuo que se transmite por herencia a sus descendientes. Las mutaciones se producen por errores en la replicación, por la alteración espontánea de nucleótidos o debido a la acción de agentes físicos o químicos (*mutágenos*) (Luque & Herráez, 2011).

Tabla 4: Clasificación de las mutaciones



Adaptado de: (Luque & Herráez, Biología Molecular e ingeniería genética, 2011)

Modificado por: Autoras, 2017.

Se origina en alguna de las divisiones mitóticas o meióticas de la gametogénesis. La mutación se hereda, transmitiéndose a todas las células del organismo hijo y generando, en su caso, la alteración o enfermedad hereditaria. A su vez, las células germinales del hijo también la poseerán, por lo que se volverá a transmitir a la siguiente generación (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.1. Mutación en células somática

Las mutaciones somáticas solo se transmiten a las células hijas, y no a un organismo completo. Pueden afectar a cualquiera de los 46 cromosomas de cualquier célula somática, diploide, en cualquier órgano, tejido o célula aislada, durante el desarrollo precoz o final del organismo, o en su fase adulta. Estas mutaciones determinan las características normales o patológicas del individuo, pero los cambios nunca son heredables (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2. Mutación según la magnitud

4.1.6.2.1. Mutaciones a pequeña escala o puntuales

Las anomalías a gran escala ocurren por duplicaciones, pérdidas o reagrupamientos que alteran una región de millones de pares de bases y se reflejan en la estructura del cromosoma. Son conocidas también como mutaciones cromosómicas o voluminosas. Las mutaciones a pequeña escala, sencillas, puntuales, mínimas o micromodificaciones implican habitualmente a un solo nucleótido. Sin embargo, también se incluyen aquellas lesiones de pequeña o mediana escala que afectan a varios pares de bases (Luque & Herráez, 2011).

Tabla 5: Clases y tipos de mutaciones.

Clase	Tipo	Incidencia
Sustitución		Tipo de mutación comparativamente común en ADN codificante y no codificante.
	Tansiciones y transversiones	Más comunes las transiciones que las transversiones, sobre todo en ADN mitocondrial.
Inserción	De uno o unos pocos nucleótidos	Muy común en ADN no codificante pero infrecuente en ADN codificante.
	Expansiones repetidas de tripletes	Infrecuente, pero puede contribuir a varios trastornos, especialmente neurológicos.
Eliminación o delección	De uno o unos pocos nucleótidos	Muy común en ADN no codificante pero infrecuente en ADN codificante.
	Grandes delecciones	Infrecuente; ocurre a menudo en regiones que contienen repeticiones en tándem o entre repeticiones dispersas.

Adaptado de: (Luque & Herráez, Biología Molecular e ingeniería genética, 2011)

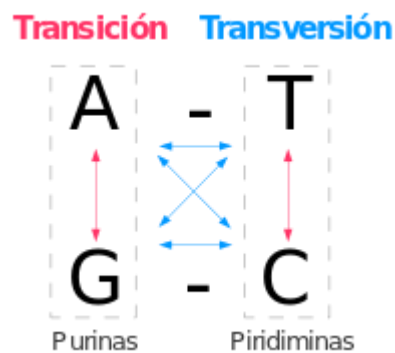
Modificado por: Autoras, 2017.

Cambios de la secuencia del ADN: Sustitución

Esta mutación consiste en un cambio de un nucleótido por otro. Es relativamente común en el ADN, tanto codificante como no codificante. En casos anormales, pueden reemplazarse de forma simultánea varias bases agrupadas.

Según la naturaleza purídica o pirimidica de las dos bases implicadas, se distingue entre transición y transversión (Luque & Herráez, 2011).

Tabla 6: Sustitución



a) Transiciones

Son reemplazos de una pirimidina por otra (C→T) T→C) o de una purina por otra (A→G o G→A).

Existen, pues, 4 posibilidades, una para cada cadena base original:

Tabla 7 Transiciones

Transición	Par inicial	Par final
A→G	A/T	G/C
G→A	G/C	A/T
T→C	T/A	C/G
C→T	C/G	T/A

Adaptado de: (Luque & Herráez, Biología Molecular e ingeniería genética, 2011).

Modificado por: Autoras, 2017.

b) Transversiones

Son reemplazos de una purina por una pirimidina (A o G→T o C), o viceversa (T o C→ A o G). Existen 8 posibilidades, dos por cada base original:

Tabla 8 Transversiones

Transversión	Par inicial	Par final
A→T	A/T	T/A
A→C	A/T	C/G
G→T	G/C	T/A
G→C	G/C	C/G
T→A	T/A	A/T
T→G	T/A	G/C
C→A	C/G	A/T
C→G	C/G	G/C

Adaptado de: (Luque & Herráez, Biología Molecular e ingeniería genética, 2011).
Modificado por: Autoras, 2017.

Si la sustitución de las bases fuera aleatoria, la frecuencia de una transversion en el genoma correspondería ser mayor que la de una transición, pues hay doble posibilidad de que ocurra. Sin embargo, se observa en otros procesos mutagénicos que las transiciones son más comunes que las transversiones, en especial en el ADN no funcional (Luque & Herráez, 2011).

Como ejemplo detallado puede citarse la transición de una base (G→A) en la región 5' no traducida del gen del factor IX de la coagulación. El cambio de secuencia en esa región reguladora evita la unión de un factor de transcripción clave que, en condiciones normales, activa el promotor del gen (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.2. Cambios de la secuencia del ADN: Delección

Reside en la pérdida de uno o más nucleótidos de una secuencia. Es común en el ADN no codificante, pero raramente en el ADN codificante. Suelen ser mutaciones pequeñas, y sólo en infrecuentes ocasiones afectan a zonas lo suficientemente grandes como para ser visibles a escala citogenética (en regiones con repeticiones en tándem o entre repeticiones dispersas). Si se dan en una región codificante, normalmente originan un cambio en el marco de lectura, razón por la cual se entiende que sean tan infrecuentes: el efecto sobre la proteína o dramático (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.3. Cambios de la secuencia del ADN: Inserción

Se demuestra de una situación contraria a la anterior, la aparición de uno o varios nucleótidos adicionales en una secuencia. Es muy habitual en el ADN no codificante, pero rara en el ADN codificante (en el que, al igual que la delección, introduce un cambio de marco de lectura). Un ejemplo es la “repetición de trinucleótidos” o “expansión de tripletes”, un aumento en el número de copias de un triplete de nucleótidos observando en un gen o en sus proximales (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.4. Mutación según su mecanismo

El cambio de secuencia del ADN formado por la mutación puede tener diferentes efectos sobre la secuencia de aminoácidos codifica y, en consecuencia, sobre la proteína que se sintetice y su función. Se diferencian por ello entre mutaciones silenciosas y no silenciosas (Luque & Herráez, 2011).

Mutaciones Silenciosas: También llamadas neutrales o asintomáticas, se caracterizan porque, a pesar de haber un cambio en la secuencia del ADN, no se cambia la secuencia de su producto proteico, debido a la degeneración del código genético. Regularmente, la mutación es silenciosa porque afecta a la tercera base de un codón de tal forma que el nuevo triplete es sinónimo del original, es decir codifica al mismo aminoácido (Luque & Herráez, 2011).

Mutaciones No Silenciosas: El cambio de la secuencia de nucleótidos afecta a la secuencia proteica, pues codifica uno o varios aminoácidos diferentes de la secuencia original. Dependiendo del efecto que tenga la alteración de la secuencia proteica sobre su actividad, se puede diferenciar entre mutaciones con efecto beneficioso y con efecto perjudicial (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.5. Mutaciones Endógenas

Las mutaciones más frecuentes se forman debido a situaciones o agentes propios del ambiente intracelular; bajo condiciones normales. Pueden producirse por errores en la replicación, o bien por reacciones que ocurren de forma espontánea sobre la molécula de ADN, o por la acción de subproductos del metabolismo celular (mutágenos endógenos) (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.6. Incorporación de nucleótidos erróneos en la replicación

La replicación por el ADN polimerasa, moviéndose a lo largo del ADN, coordina la incorporación de nucleótidos a la hebra nueva con la corrección de pruebas, de manera que duplica la doble hélice con una gran fidelidad. Más del 99,9% de los errores de replicación se modifican rápidamente mediante enzimas reparadoras que reconocen el nucleótido incorrecto en la

hebra que se está sintetizando y lo sustituyen por uno correcto, complementario al de la hebra molde.

Como consecuencia, sólo se introduce una variación por cada 10⁹ a 10¹¹ nucleótidos agregados en cada ciclo de división celular. A pesar de ello, el gran número de divisiones celulares durante la vida de un individuo hace que el número de mutaciones sea característico (Luque & Herráez, 2011).

Una de las causas de incorporación errónea de nucleótidos aparece en la tautomería de las bases nitrogenadas; las formas tautoméricas menos abundantes (imina y lactina) establecen puentes de hidrógeno diferentes, lo que permite el emparejamiento de un nucleótido incorrecto en la hebra de nueva síntesis. Además de las fallas en la identidad del nucleótido incorporado, durante la replicación también se incorporan mutaciones debido a deslizamientos del ADNpol sobre la hebra molde, que producen deleciones o inserciones por repetición de una pequeña secuencia (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.7. Sustituciones por desaminación oxidativa

Residen en la pérdida de un grupo amino exocíclico, con aparición de un grupo carbonilo. Ello da lugar a que se cambie la formación de puentes de hidrógeno entre las bases (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.8. Pérdida de bases por inestabilidad por N-glicosídico

Se pueden mencionar la despurinaciones espontáneas, en las que pierde una purina por hidrólisis del enlace N-glicosídico, dando lugar a un sitio apurínico. Análogamente, pueden originarse sitios apirídimos, aunque con menos frecuencia. En la posición afectada, el nucleósido queda disminuido únicamente al esqueleto, es decir, un residuo de desoxirribosa unido por ambos enlaces fosfodiéster (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.9. Mutación de las bases por mutágenos endógenos

El propio metabolismo de la célula consigue generar compuestos químicos que reaccionan con las bases, o en general con los nucleósidos, modificándolos. El suceso más frecuente son las especies reactivas de oxígeno, radicales libres producidos por el metabolismo oxidativo de la célula, en especial en la mitocondria. Las principales son el anión superóxido y el radical hidroxilo, que destruyen el ADN rompiendo una hebra u oxidación de bases nitrogenadas (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.10. Mutaciones Exógenas

Además de las transformaciones espontáneas de nucleótidos y de las fallas de replicación, se ocasionan también mutaciones debidas a agentes fisicoquímicos ajenas a la célula, denominados *mutágenos exógenos* (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.11. Lesiones y mutaciones inducidas por agentes químicos

A diferencia del desequilibrio del ADN ya discutida, producida por cambios químicos espontáneos en los nucleótidos (esencialmente por desaminación o despurinación), también se pueden modificar químicamente las bases por la acción directa de diversas sustancias químicas del ambiente. La lista de estos agentes mutágenos es muy extensa, y los mecanismos y efectos que producen muy diversos. Muchos de ellos se identificaron hace más de dos siglos como responsables de cánceres en obreros en contacto con el humo y hollín. Algunos funcionan como mutágenos directos y otros requieren activarse a carcinógenos activos mediante la acción de ciertas enzimas (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.12. Agentes químicos alquilantes

Transfieren grupos, comúnmente metilo o estilo, a un átomo nucleófilo (O o N) de las bases nitrogenadas (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.13. Agentes intercalantes

Estos agentes con estructura plana e hidrófoba, se implantan entre los pares de bases aplicados del ADN y distorsionan su estructura helicoidal.

Benzo(a)pireno, uno de los productos que se encuentran en el humo.

Compuestos naturales: actinomicina D.aflatoxina (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.14. Agentes entrecruzantes

Reaccionan con ADN y forman enlaces cruzados entre bases de la misma hebra o de ambas hebras.

Compuestos de cisplatino.

Otros agentes químicos: S-bromouracilo, Ácido nitroso, Aminas aromáticas.

Varios fármacos ciclofosfamida, dietilestilbestrol.

Compuestos inorgánicos: arsénico, asbestos, berilio, cadmio, cromo (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.15. Lesiones y mutaciones inducidas por agentes físicos

Son diversos los agentes que originan lesiones por exposición, con efectos mutágenos o cancerígenos (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.16. Radiación UV

La radiación ultravioleta, componente de la luz solar, estimula la reacción entre los residuos de timidina adyacentes en la misma hebra, formando a partir de sus dobles enlaces anulares un sistema tricíclico con un anillo de ciclobutano, que se conoce como *dímero de timina*. Esta asociación covalente de dos T evita que puedan emparejarse con sus A complementarias y origina una estructura tridimensional localmente incompatible con el giro de la doble hélice, que fuerza una flexión o “codo” en la molécula del ADN. La irradiación UV también ocasiona otra reacción entre T adyacentes, con formación de dímeros diferentes llamados *fotoproductos*, en los que el enlace aparece entre el C-6 de una T y el C-4 de la adyacente (Luque & Herráez, 2011).

4.1.6.2.17. Radiaciones ionizantes

También llamados Rayos X pueden producir apertura de los anillos, fragmentación de las bases, así como rotura del esqueleto covalente del ADN. También generan (por fotólisis del agua) radical hidroxilo, que causan 8-hidroxiguanina, entre otros. Debido a su alto poder de penetración, estas radiaciones afectan a todo tipo de tejidos, a diferencia de la luz UV, que provoca lesiones directamente a la piel (Luque & Herráez, 2011).

5. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

La presencia del polimorfismo del gen PNPLA3 está asociada con la enfermedad del hígado graso no alcohólico presente en los estudiantes de la UCSG.

6. IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADORES	ESCALA
<p>Variable Dependiente</p> <p>Hígado graso no alcohólico</p>	<p>Es la acumulación de grasa en el hígado que no es causada por consumir un exceso en alcohol.</p>	<p>Diagnostico confirmado por clínica.</p> <p>(Ecografía)</p>	<p>Esteatosis leve presente en menos del 25% de los hepatocitos.</p> <p>Esteatosis moderada. presente del 25-50% de los hepatocitos.</p> <p>Esteatosis severa presente en >50% de los hepatocitos.</p>
<p>Variable Independiente</p> <p>Polimorfismo</p>	<p>Se define como la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado.</p>	<p>Presencia o Ausencia de las variantes alélicas.</p>	<p>GG "Mutado"</p> <p>CG</p> <p>"Heterocigoto"</p> <p>CC "Ancestral"</p>

7. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

7.1 Justificación del método de elección.

El presente estudio es de tipo descriptivo, no experimental y de corte transversal, debido a que el objetivo del presente trabajo de titulación es la determinar la presencia del polimorfismo del gen PNPLA3 en estudiantes que presentaron la enfermedad del hígado graso no alcohólico, el enfoque es cuantitativo debido que se analizó el diagnóstico clínico para la enfermedad y la presencia del polimorfismo en el genoma de la población de estudio.

7.2. Población y muestras

La población y muestra estuvo comprendida por 205 muestras Crio-conservada de estudiantes con hígado graso no alcohólico bajo criterio de inclusión.

7.2.1. Criterio de Inclusión

1. Muestras crio-conservadas en buen estado de estudiantes de la Universidad Católica Santiago de Guayaquil.
2. Muestras que presentaron una concentración optima del material genético (30-100 ng/ul).
3. Muestras con diagnóstico de padecer de hígado graso no alcohólico.

7.2.2. Criterio de Exclusión

1. Historia de consumo de alcohol superior a 200gr/semana.
2. Historia o hallazgos de otra enfermedad hepática.
3. Muestras que no estuvieron dentro de los parámetros de concentración.

7.3. Técnica y Modelos de análisis de datos.

7.3.1. Técnica

La técnica utilizada en el presente trabajo de titulación fue la observación y análisis estadístico buscando la relación entre las 2 variables, para luego registrar los resultados obtenidos en la respectiva base de datos.

7.3.2. Instrumento

Para la recopilación de la información se realizó mediante la observación directa con el apoyo analizador genético (LightCycler 2.0) en las muestras procesadas.

Técnica de procedimiento:

Para la obtención del material genético se utilizó el siguiente protocolo.

Protocolo de ADN:

- 1.- Calentar el bloque térmico a 55°C.
- 2.- Al tubo esteril adicionar <200 ul de sangre.
- 3.- Adicionar 20ul de Proteinasa K a la muestra.

- 4.- Adicionar 20ul RNase A a la muestra, mezcle bien vortexeando brevemente e incube a temperatura ambiente por 2 minutos.
- 5.- Adicionar 200ul del Buffer de Lisis/ Binding, vortexeando bien para obtener una solución homogénea.
- 6.- Incubar a 55°C por 10 minutos para promover la digestión de proteínas.
7. - Adicionar 200 ul de ethanol (96 – 100%) para lisar. Mezcle bien por vortex por 5 segundos para que rinda una solución homogénea.
- 8.- Proceder inmediatamente a la captura del DNA.

ANTES DE EMPEZAR

Adicionar ethanol 96–100% ethanol al PureLink® Genomic Wash Buffer 1 and PureLink® Genomic Wash Buffer 2de acuerdo a las indicaciones marcadas en cada etiqueta. Marcar las etiquetas cuando ya ha sido adicionado el ethanol. Guardar ambos Buffer a temperatura ambiente.

- 9.- Remover del paquete de tubos 1 columna
- 10.- Adicionar el lisado (640ul) en la columna
- 11.- Centrifugar la columna a 10.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 12.- Descartar el tubo de colección y colocar un tubo de colección limpio.
- 13.- Proceder a enjuagar el DNA.

LAVADO DE DNA

- 14.- Adicionar 500ul de Buffer Wash 1, preparado con ethanol a la columna.
15. Centrifugar la columna a temperature ambiente a 10.000 x g por 1 minuto.
16. Discartar el tubo de colección y colocar un tubo limpio.
17. Adicionar 500 µL Wash Buffer 2 preparado con ethanol a la columna.

- 18.-Centrifugar la columna a la velocidad máxima por 3 minutos a temperatura ambiente. Descartar el tubo de colección
19. Proceder a la elución del DNA.

ELUCIÓN DE DNA

20. Coloque la columna en un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5ml.
21. Adicione 25–200 μ L of PureLink® Genomic Elution Buffer a la columna. Observe los parámetros de elución (page 13) para elegir el adecuado volumen de elución que se necesita.
22. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo contiene el DNA genómico purificado.
23. Para recuperar más DNA, realice un Segundo paso de elución usando el mismo volumen de buffer de elución como la primera vez en otro tubo estéril de 1.5ml.
24. Centrifugar la columna a máxima potencia por 1.5 minutos a temperatura ambiente. El tubo contiene el DNA purificado. Descartar la columna.

ALMACENAJE DEL DNA

Guardar el DNA purificado a -20°C para la aplicación deseada.

Para la amplificación del material genético se utilizó el siguiente protocolo.

Equipos:

1. PCR en tiempo real.
2. Regulador de voltaje con no-break.
3. Computadora con el programa de análisis instalado.
4. Materiales:

Tabla 10: Programa LightCycler 1.x / 2.0 Instrumentos

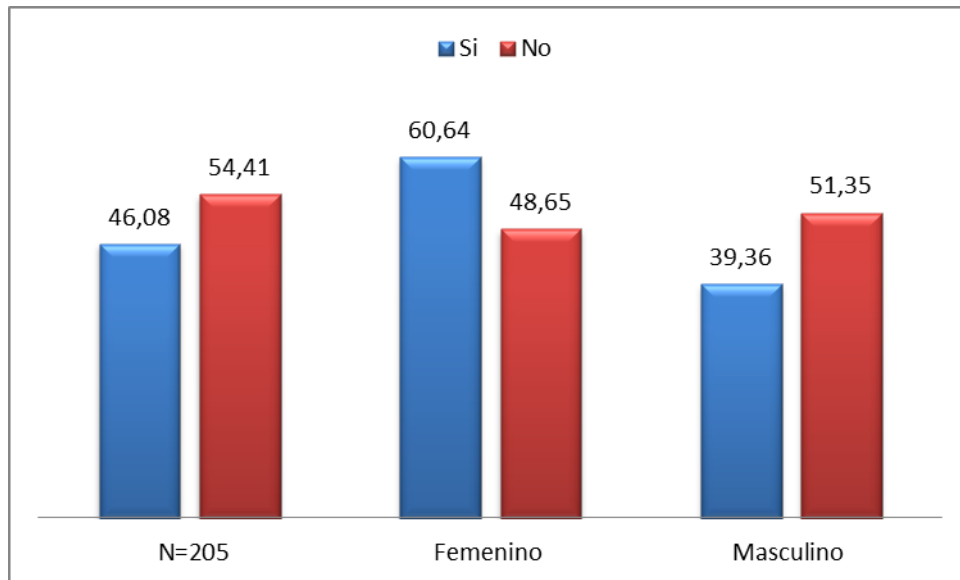
Programa	Desnaturalización	Ciclismo			Derritiendo			Enfriamiento
Parámetro								
Modo de análisis	Ninguna	Cuantificación			Curvas de Fusión			Ninguna
Ciclos	1	45			1			1
Segmento	111	1	2	3	1	2	3	1
Objetivo(°C)	95	95	60	72	95	40	85	40
Retener (hh: mm: ss)	0:10:00	0:00:10	0:00:15	0:00:20	0:00:20	0:00:20	0:00:00	0:00:30
Velocidad de rampa (°C / s)	20.0	20.0	20.0	0.2	20.0	20.0	0.2	20.0
Modo de adquisición	Ninguna	Ninguna	Solo	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Continuo	Ninguna

Adaptado de: *LightCycler FastStart ADN Master HybProbe (Dignóstico Roche)*.

Modificado por: Autoras, 2017.

8. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

Gráfico # 1 Presencia de HGNA en los estudiantes de la UCSG año 2016



Elaborado por: Drouet & Leon., 2017.

En el gráfico # 1 de acuerdo a la presencia del hígado graso no alcohólico se observa que un 54,41% de la población de estudio no presenta hígado graso mientras que un 46,08% presenta hígado graso no alcohólico en los estudiantes de educación superior, también se observa que, en relación al sexo, el sexo femenino presenta un 60,64 % de padecer de hígado graso en relación al sexo masculino en relación al sexo masculino con un 39,36%.

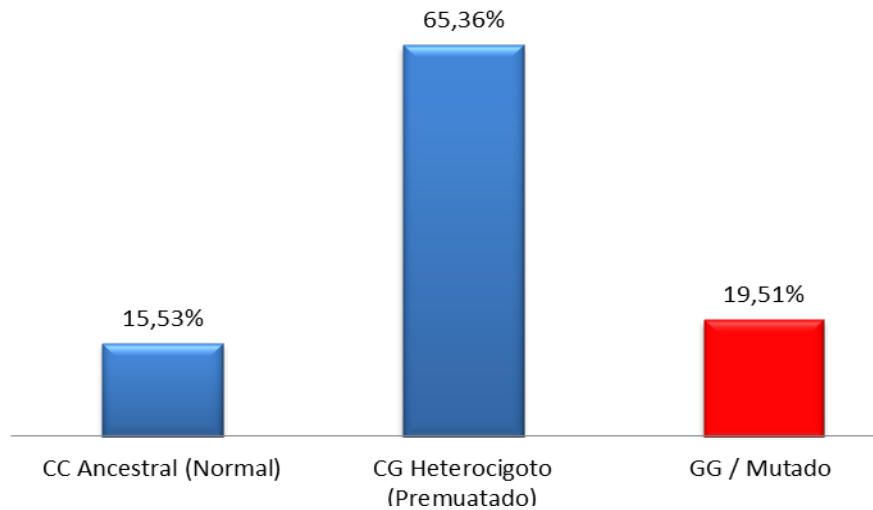
Tabla 11: Alteraciones lipídicas y consumo de alcohol

Alteraciones Lipídicas n= 94	Consumo de alcohol		
	No consumo	Social	Semanal
Femenino n=57 (60,63%)	30 (52,63 %)	17 (29,82 %)	10 (17,54 %)
Masculino n= 37 (39,36%)	15 (40,54 %)	17 (45,95 %)	5 (13,51 %)

Elaborado por: Drouet & Leon., 2017.

En la tabla # 11 en relación a las alteraciones lipídicas y consumo de alcohol en muestras de hígado graso no alcohólico y el sexo, se observa que de las 94 muestras el mayor consumo se encuentra en el sexo femenino, teniendo así; un 52,63% que no consumen alcohol, un 29,82 % de forma social y un 17,54% ingieren alcohol semanalmente, en el sexo masculino de un 39,36 %, no consume alcohol, el 45,95% de forma social y un 13,51% lo realiza semanalmente.

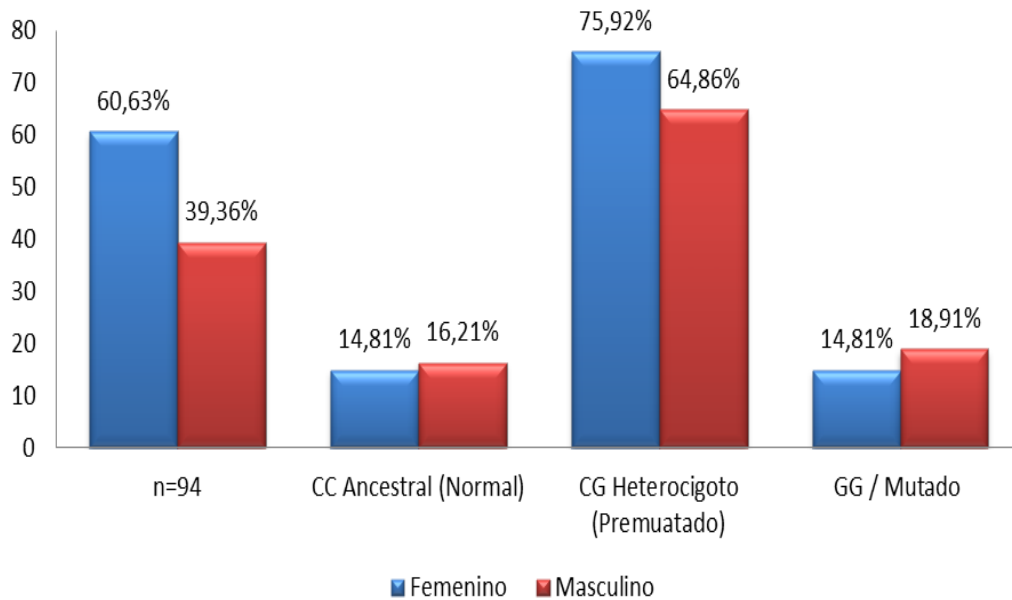
Gráfico # 2. Presencia del polimorfismo PNPLA3 en muestras de HGNA



Elaborado por: Drouet & Leon., 2017

En el gráfico # 2 en relación a la presencia del polimorfismo PNPLA3, se observa que el genotipo CC alelo normal se encuentra en un 15,53%, el genotipo heterocigoto en un 65,36% y el genotipo GG mutado en la población de estudio de hígado graso no alcohólico está presente en un 19,51%.

Gráfico # 3. Frecuencia de genotipos en muestras con HGNA según sexo



Elaborado por: Drouet & Leon., 2017

En el gráfico # 3 en relación a la frecuencia alélica del polimorfismo según el sexo podemos observar que de acuerdo a las alteraciones lipídicas en el sexo femenino se encuentra presente el genotipo mutado GG en un 14,81% y en el sexo masculino se encontró una mayor frecuencia con un 18,91%, mientras que el genotipo heterocigoto CG está presente en el sexo femenino con una mayor frecuencia en un 75,92%.

Tabla 12 : Presencia de los genotipos PNPLA3 y el HGNA

Genotipo	Alteraciones lipídicas	Alteraciones lipídicas
n=205	SI =94	NO =111
GG Mutado	n = 15 (15,95%)	n = 25 (22,52%)
CG Heterocigoto	n = 65 (69,14%)	n= 68 (61,26%)
CC Normal “Normal”	n = 14 (14,89%)	n = 18 (16,21%)
CG + GG	n = 80 (85,10%)	n = 93 (83,78%)

Elaborado por: Drouet & Leon., 2017

En la tabla # 12 en relación a los genotipos del polimorfismo PNPLA 3 y el hígado graso no alcohólico con alteraciones lipídicas podemos observar que la presencia de los genotipos CG+GG que llevan el alelo mutado se encuentra en un 85,10% en la población de estudio de los cuales el genotipo mutado está en un 15,95 % de las muestras con alteraciones lipídicas y un 22,52% con alteraciones no lipídicas.

Tabla 13: Genotipos del polimorfismo PNPLA3 y el hígado graso no alcohólico con el nivel de consumo de alcohol.

Genotipo	CC Ancestral (Normal)	CG Heterocigoto (Premutado)	GG / Mutado
Alteraciones Lipídicas n=94			
Nivel de consumo del alcohol			
No n= 45	7 (15,5%)	33(73,33%)	5 (11,11%)
Social n=34	3 (8,82%)	24 (70,58%)	7 (20,58%)
Ocasional n=15	4 (26,66%)	8 (53,33%)	3 (20,00%)

Elaborado por: Drouet & Leon., 2017

En la tabla # 13 en relación a los genotipos del polimorfismo PNPLA 3 y el hígado graso no alcohólico y el consumo de alcohol podemos observar que el genotipo mutado se encuentra presente en aquellos que ingieren alcohol de manera social en un 20,58%, mientras que un 20% en los que ingieren de manera ocasional y un 11,11% en aquellos que no consumen alcohol.

Tabla 14: Distribución de la asociación de hígado graso no alcohólico y el genotipo mutado GG en la población de estudio.

		Factor 1		
		Hígado graso no alcohólico N=205		
		Presente	Ausente	Total
Factor 2	Presente	15	25	40
Genotipo GG	Ausente	79	86	165
	Total	94	111	205

*Chi cuadrado con el nivel de 0,05

De acuerdo al análisis estadístico mediante el *software* Epi Info (tabla de 2x2) en relación a las variables de estudio, hígado graso no alcohólico y el polimorfismo del gen PNPLA3 el genotipo mutado GG y el genotipo premutado CG, no existe una asociación debido que el valor correspondiente a la significancia para el genotipo GG (mutado) es $p=0,23$ y el genotipo heterocigoto CG (premutado) es $p=0,19$; por lo tanto se demuestra que ambas variables son consideradas independientes en este estudio con el número de muestra analizadas (N=205).

En consideración tampoco se podría descartar la asociación del polimorfismo del gen PNPLA3 debido a que una mutación en una población determinada donde el número de muestras analizadas es inferior al número estimado de N=1000.

9. CONCLUSIONES

1. El efecto nocivo del alto contenido de grasa en el HGNA se agrava debido al consumo de comidas con elevado índice de ácidos grasos saturados (SFA), mientras que la ingesta rica de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) pueden ser beneficiosas para impedir la progresión del daño hepático y mejorar su condición de vida en las personas que padezcan esta patología.
2. Los portadores del gen PNPLA3 rs738409 con el alelo G, son más propensos a desarrollar la esteatosis hepática. De acuerdo a la presencia del hígado graso no alcohólico un 54% de la población de estudio no presenta hígado graso a diferencia del 46% de los cuales un 60,64% estuvo presente en el sexo femenino, el genotipo mutado estuvo presente en un 15,95% de las muestras con alteraciones lipídicas y un 22,52% con alteraciones no lipídicas. Este estudio proporciona evidencia de polimorfismo del gen PNPLA3 (rs738409) SNP alelo G como un posible factor de riesgo de HGNA, en relación a los genotipos del polimorfismo PNPLA 3 y el HGNA con alteraciones lipídicas.
3. El riesgo estimado de padecer hígado graso no alcohólico mediante el factor genético a través del análisis del polimorfismo del Gen PNPL3 se determina que, en una población inferior a la estimada, el factor genético no podría influir en la enfermedad, debido a que el desarrollo del hígado graso no alcohólico no solo depende del factor genético, sino que es multifactorial de acuerdo a los resultados obtenidos en otros estudios.

10. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de los hábitos alimenticios de cada paciente, con esto se podría notar diferencias significativas entre los portadores del polimorfismo del Gen PNPLA3 en relación con la alimentación
2. Acudir a un profesional en nutrición para que elabore una dieta adecuada para el paciente con hígado graso, y controle el peso que vaya perdiendo, puesto que una pérdida súbita de peso está asociada a un mayor daño al hígado.
3. Tener una alimentación basada en un elevado consumo de frutas, verduras, hortalizas, legumbres y cereales, incluyendo los pescados y el aceite de oliva como fuente principal de grasas, con bajo consumo de carnes y grasas saturadas.
4. Realización de ejercicio, la cual es adecuada en todos los casos, dado que ayudamos a nuestro organismo a que elimine la grasa sobrante del cuerpo.
5. Antes de realizar ejercicio se recomienda realizarse un chequeo cardiovascular, para así tener conocimiento sobre la intensidad que se llevara con la práctica del ejercicio.
6. Practicar ejercicio aeróbico (caminar, trotar, nadar, andar en bicicleta o patines, y remar) por lo menos 30 min diarios, con una frecuencia de 3 a 5 veces a la semana.
7. Llevar un programa de tratamiento global, con un equipo médico multidisciplinario de especialistas, que incluya nutricionista, psicólogo, y kinesiólogo, para apoyar individualmente las necesidades de cada paciente.

11. BIBLIOGRAFÍA

- AGA, A. G. (2002). Technical review on on alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 123, 1705-1725. Retrieved from [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(02\)00304-9/pdf](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(02)00304-9/pdf)
- Bermejo, C. E. (2011, Mayo-junio). Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 54(3), 30-42. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2011/un113e.pdf>
- Beth A. Conlon 1, J. M.-R. (2013). Nutritional Management of Insulin Resistance in Nonalcoholic. *Nutrients*, 4093-4114. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820061/>
- Byrne, T. (2013). Non alcoholic Fatty Liver Disease: a Novel Cardiometabolic Risk Factor for Type 2 Diabetes and Its Complications. *J Clin Endocrinol Metab*, 483-495. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23293330>
- Castillo. (2015). Hígado graso no alcohólico. *Med. Interna*, 177-185. Retrieved from <http://www.svmi.web.ve/ojs/index.php/medint/article/view/12/7>
- Clark, B. F. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 122, 1649-1657. Retrieved from [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(02\)61906-7/pdf](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(02)61906-7/pdf)
- Conlon. (2013). Nutritional Management of Insulin Resistance in Nonalcoholic. *Nutrients*, 4093-4114.
- Davis, L. W.-M., Weigensberg, M. J., Allayee, H., & Goran, M. I. (2010). Increased hepatic fat in overweight Hispanic youth influenced by interaction between genetic variation in PNPLA3 and high dietary carbohydrate and sugar consumption. *Am J Clin Nutr.*, 1522–1527. doi:10.3945/ajcn.2010.30185

- Dongiovanni, P., & Valenti, L. (2016). Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 65(8), 1026-1037. Retrieved from [http://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(15\)00251-6/abstract](http://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(15)00251-6/abstract)
- Edelman. (2015). El análisis genético de la enfermedad de hígado graso no alcohólico dentro de una población del Caribe hispanos. *Mol Genet Genómica Med*, 558-569. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4694126/>
- Golabi, A., Afdhal, B., & Gerber, Y. (2016). Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review. *World J Gastroenterol.*, 6318–6327. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4945989/pdf/WJG-22-6318.pdf>
- Golabi, Locklear, Austin, Afdhal, Byrns, Gerber, and Younossi. (2016). Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review. *World J Gastroenterol.*, 6318–6327. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4945989/>
- Gómez, J. C., & G., A. (2013). Estudios aleatorizados sobre el efecto del consumo de bebidas azucaradas sobre la adiposidad en adolescentes y adultos. *Nutr Hosp*, 1792-1796.
- Hannele Yki-Järvinen. (2015). La modulación nutricional de la enfermedad no alcohólica del hígado graso y resistencia a la insulina. *Nutrients*, 9127 hasta 9138. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4663582/>
- Harrison. (2002). Fat and the liver: a molecular overview. *Semin Gastrointest*, 13, 3-16. Retrieved from <http://europemc.org/abstract/med/11944631>

- Harrison, D.B. (2003). Advances in the understanding and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Drugs*, 63:2379-94. doi:10.2165/00003495-200363220-00001
- Harrison, H. P. (2002). Clinical factors associated with fibrosis in 102 patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 36:412.
- Hospital Beata Maria Ana. (Abril de 2015). Digestivo Medico Quirurgica-DMQ. Retrieved from de <http://digestivodmq.es/test-genetico-de-riesgo-de-progresion-del-dano-hepatico-pnpla3/>
- Houghton, T. B. (2017). Exercise Reduces Liver Lipids and Visceral Adiposity in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis in a Randomized Controlled Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 96–102. Retrieved from [http://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(16\)30512-2/pdf](http://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(16)30512-2/pdf)
- Järvinen. (2015). La modulación nutricional de la enfermedad no alcohólica del hígado graso y resistencia a la insulina. *Nutrients*, 9127-9138. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26556368>
- Jiménez-Cruz, L. M.-M.-G. (2014). La adiposidad como factor de riesgo del hígado graso no alcohólico, revisión sistemática. *Nutrición Hospitalaria*, 29, 771-775. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112014004400008
- Kotronen A, J. L. (2009). Una variante común en PNPLA3, que codifica adiponutrin, está asociada con el contenido de grasa en el hígado en seres humanos. *Diabetologia*, 1056-1060. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00125-009-1285-z>
- Lambis. (2016). Factores de riesgo asociados a hígado graso no alcohólico en una población del Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 31(2), 89-93. Retrieved from

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99572016000200001&script=sci_arttext&tlng=es

López. (2016). Factores de riesgo de la enfermedad hepática grasa no alcohólica. *Salud(i)Ciencia*, 839-847. Retrieved from <https://www.siicsalud.com/dato/sic/218/129017.pdf>

Ludwig, J., Viggiano, V., & McGill, D. B. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proc*, 55, 434-438. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/7382552>

Luque, J., & Herráez, Á. (2011). *Biología Molecular e ingeniería genética*. Bracelona, España:Elsevier España: J. L. Herráez.

Márquez, M. F. (2008). *INFLUENCIA DE LA CIRUGÍA EN EL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO EVALUACIÓN HISTOLÓGICA*. Granada. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Manuel_Marquez/publication/46590626_Influencia_de_la_cirugia_bariatrica_en_el_higado_graso_no_alcoholico_Evaluacion_histologica/links/0046351a345c88825b000000/Influencia-de-la-cirugia-bariatrica-en-el-higado-graso-no-a

Méndez Sánchez Nahum, Norberto, Chávez Tapia & Misael Uribe. (2004). Hígado grano no alcohólico. Nuevos conceptos. *Scielo*, 72-82. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100011

Méndez Sánchez, U. M.(2002). (2002). *Obesidad. Epidemiología, Fisiopatología y Manifestaciones Clínicas*. México: El manual moderno. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms042c.pdf>

- Monzón. (2011). Enfermedad Hepática Grasa. *CIBERehd*, 815-824. Retrieved from http://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/56_Enfermedad_hepatica_grasa_no_alcoholica.pdf
- Neuman, N. a. (2015). Nonmedicinal interventions in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 241–252. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1155/2015/273595>
- Powell EE, C. W. (1990). The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*, 72-80. doi:10.1002/hep.1840110114
- Qu HQ, L. Q. (2012). Factores basados en la población de riesgo para la alanina aminotransferasa elevada en una población del sur de Texas México y Estados Unidos. *Arch Med Res*, 482-488. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3590902/>
- Ruhl & Everhart. (2003). Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*, 71-9. Retrieved from [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(03\)50020-8/pdf](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(03)50020-8/pdf)
- Salameh, Hanayneh, Masadeh, Naseemuddin, Matin, Erwin, & Singal. (2016, Septiembre 28). PNPLA3 as a Genetic Determinant of Risk for and Severity of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Spectrum. *Medicine National Institute of Health*, 4(3), 175 - 191. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27777887>
- Soberón, X., & Zapata, F. (1999). *Gen y Genoma* (Vol. 1). Ciudad de México, México: UNAM.
- Sookian, S., & Pirola, C. (2011, mayo). Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of

nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 1883–1894. doi: 10.1002/hep.24283

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

Tamay, Ibarra & Velasquillo. (2013, Mayo - Agosto). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud*, 2(2), 71-73. Retrieved from Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa y de la PCR en tiempo real.

Thiel, A. a. (2013). Current Concepts and Management Approaches in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ScientificWorldJournal*., 1-10. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1155/2013/481893>

Thiel, B. a. (2013). Current Concepts and Management Approaches in. *The Scientific World Journal*, 1-10. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1155/2013/481893>

Tyler Severson, S. B. (2016). Los factores genéticos que afectan la enfermedad de hígado graso no alcohólico: Una revisión sistemática clínica. *World Journal of Gastroenterology*., 42-56. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4970479/>

Urzúa, B., Miranda, Carreño, & Venegas. (2016, Mayo). Asociación del polimorfismo en el gen PNPLA3. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, 26(4), 330. Retrieved from <https://www.redclinica.cl/Portals/0/Users/014/14/14/681.pdf>

Ventilador JG, C. H. (2013, Diciembre). Rolw of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology*, 28(S4), 81-87. doi: 10.1111/jgh.12244

- Wong. (2016). El carcinoma hepatocelular en pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica. *World Journal of Gastroenterology*, 8294-8303. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5055860/>
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75. Retrieved from http://download.bion.com.cn/view/upload/201112/09235308_2042.pdf
- Xiaoling Wang, Z. L. (2016). Los efectos aditivos de los alelos de riesgo de PNPLA3 y TM6SF2 en la enfermedad hepática no alcohólica (EHNA) en una población China. *Front Genetic*, 1-7. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4969299/>
- Yu. (2016). La patogénesis de la enfermedad del hígado graso no alcohólico: Interacción entre la dieta, la microbiota intestinal, y los antecedentes genéticos. *Gastroenterol Res Pract* ., 1-13. doi:10.1155/2016/2862173
- Zapata, S. &. (1999). Gen y Genoma.
- Zelber Sagi, S., & Ratziu V, O. R. (2011, Agosto 7). Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World Journal of Gastroenterology*, 17(29), 3377-3389. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160564/>

12. GLOSARIO

- Adiponutrina: es una lipasa expresada fundamentalmente en tejido adiposo.
- ADN: Es el Ácido Desoxirribonucleico es una macromolécula que codifica los genes de las células, bacterias y algunos virus.
- Alanina aminotransferasa (GPT): es una enzima aminotransferasa con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos.
- Apolipoproteína C3: es una proteína que en los humanos es sintetizada por el gen APOC3 y es un componente de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).
- Aspartato aminotransferasa (GOT): antes conocida como transaminasa glutámico-oxalacética y también llamada aspartato transaminasa (AST), es una enzima aminotransferasa que se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, especialmente en corazón, hígado y tejido muscular.
- Cetogenesis: Proceso metabólico por el cual se producen en el hígado los cuerpos cetónicos como resultado del catabolismo de los ácidos grasos.
- Cirrosis descompensada: es una forma avanzada de la cirrosis del hígado. Hablamos de descompensación cuando los mecanismos para compensar los efectos adversos de esta enfermedad no son suficientemente eficaces. La cirrosis descompensada representa una forma avanzada de cirrosis con significativos signos de insuficiencia hepática.
- Cromosomas: son estructuras que se encuentran en el centro (núcleo) de las células que transportan fragmentos largos de ADN. El ADN es el material que contiene los genes y es el pilar fundamental del cuerpo humano.

- Dieta: Es la cantidad de alimento que se le proporciona a un organismo en un periodo de 24 horas, sin importar si cubre o no sus necesidades de mantenimiento.
- Dislipidemias: Es la alteración de los niveles de lípidos en la sangre. Los lípidos son un conjunto de moléculas que circulan en la sangre, dentro de las que se encuentran el colesterol total, el colesterol LDL, el colesterol HDL y los triglicéridos.
- Esteatohepatitis: Inflamación grasa del hígado.
- Esteatosis simple: La forma más benigna se denomina Esteatosis simple, en la que sólo se encuentran depósitos de grasa sin otras alteraciones en la biopsia del hígado.
- Ferritina: Es una proteína que se encuentra dentro de las células y que almacena hierro de manera que el cuerpo lo pueda usar posteriormente.
- Fibrosis hepática: es la acumulación de cicatrices fibrosas y duras en el hígado.
- Fosfatasa alcalina: es una proteína que se encuentra en todos los tejidos corporales.
- Fructosa: Azúcar que se encuentra en la miel y en muchas frutas, mezclado con la glucosa.
- Gamma-glutamyltransferasa: es una encima hepática ubicada dentro de las células del hígado.
- Gen: es una unidad de información en un locus de Ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto funcional, o Ácido ribonucleico (ARN) o proteínas y es la unidad de herencia molecular.
- Genómica: es el conjunto de ciencias y técnicas dedicadas al estudio integral del funcionamiento, el contenido, la evolución y el origen de los genomas. Es una de las áreas más vanguardistas de la biología.
- Genotipo: Conjunto de los genes que existen en el núcleo celular de cada individuo.

- Grasa-trans: Son un tipo de ácido graso insaturado que se encuentra principalmente en alimentos industrializados que han sido sometidos a hidrogenación o al horneado como los pasteles, entre otros.
- Hepatocarcinoma: Tipo de cáncer de hígado que forma la mayor parte de los tumores hepáticos malignos primarios.
- Hepatocitos: es la célula propia del hígado y que forma su parénquima.
- Hepatopatía crónica: (Cirrosis hepática) es un proceso de fibrosis secundario a fenómenos de destrucción y regeneración de las células del parénquima asociado a un incremento difuso del tejido conectivo y a la desestructuración de la arquitectura hepática.
- Hiperbilirrubinemia: es el aumento del nivel de bilirrubina en la sangre (valores normales de 0,3 a 1 mg/dL).
- Hipoalbuminemia: es una condición clínica en la cual existe una disminución en los niveles séricos de albúmina por debajo de 3,5 g/dL.
- Insulina: La insulina es una hormona natural que produce el páncreas
- Macronutrientes: Son grandes moléculas las cuales su principal función es brindar energía
- Microbiota: es el término que se utiliza para designar los microorganismos que viven en un entorno específico, llamado a sí mismo microbioma.
- Micronutrientes: Son aquellas sustancias químicas que, ingeridas en pequeñas cantidades, permiten regular los procesos metabólicos y bioquímicos de nuestro organismo.
- Mutación: Es cualquier alteración o variación en el código genético; es decir, una alteración de los genes de los cromosomas.
- Nucleótido: Compuesto químico orgánico fundamental de los ácidos nucleicos, constituido por una base nitrogenada, un azúcar y una molécula de ácido fosfórico.

- Parénquima: Tejido esencial de determinados órganos, como los pulmones, el hígado o los riñones.
- PCR: (Reacción en Cadena de la Polimerasa), es una técnica de laboratorio que permite amplificar pequeños fragmentos de ADN para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.
- PNPL3: Fosfolipasa patatán que contiene la proteína 3.
- Polimorfismo: es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.
- Protrombina: es una proteína del plasma sanguíneo, forma parte del proceso de coagulación.
- Síndrome metabólico: es un grupo de condiciones que ponen en riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca y diabetes tipo 2.
- Transaminasas: son enzimas contenidas principalmente en el hígado y en los músculos, pero también en los riñones y el corazón.
- Transferrina: Es la proteína transportadora específica del hierro en el plasma.

ANEXOS

ANEXO 1 Extracción de ADN en Sangre Periférica

Sambrook y cols., 1989

1. Tomar de 5 ml de sangre periférica con EDTA (tubo tapa lila)
2. Ingresar los datos al cuaderno de registro y dar un código a la muestra.
3. De la muestra coger (250 uL, 500uL o 1ml), y colocar en un tubo estéril eppendorff de 1.8ml, previamente etiquetado.
4. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 10000RPM.
5. Retirar el plasma, con una micro pipeta de 1000ul estéril; sin agitar el tapón celular (cuidado con los glóbulos blancos).
6. Llenar el tubo con buffer de lisis de eritrocitos o agua ultra pura (1ml), agitar suavemente hasta que se re suspenda el botón celular.
7. Colocar la muestra a 4°C por 5 minutos.
8. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 10000 RPM
9. Descartar el sobrenadante (600uL) con micro pipeta estéril, evitando tomar los núcleos
10. Agregar buffer de lisis de eritrocitos o agua ultra pura (1ml), dar Vortex por 10 seg, Centrifugar la muestra por 10 minutos a 10000 RPM. (Repetir este pasó 3 veces, hasta que el botón celular quede limpio).
11. Descartar el sobrenadante (600uL) con micro pipeta estéril, evitando tomar los núcleos.
12. Re suspender el tapón de núcleos en:
 - a. 500 ul de buffer de lisis de leucocitos
 - b. 10ul de Proteinasa K (PK) 10mg/ml
 - c. 50ul de DUODECIL sulfato de sodio (SDS) AL 10%

13. Incubar la muestra en baño de maría húmedo a 37°C por toda la noche (56°C por 2 horas)

AL DÍA SIGUIENTE

14. Colocar 200 ul de Cloruro de Sodio (CLNa), 5M, a la muestra
15. Agitar suavemente la muestra (cabeza-cola) por 2 minutos, (no Vortex)
16. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 12000 RPM
EL ADN se encuentra a partir de este paso en el sobrenadante.
17. Recuperar el sobrenadante (500 uL) y pasarlo a un nuevo tubo estéril previamente etiquetado (no llevar nada del precipitado).
18. Añadir Fenol (250uL) y Cloroformo-Isoamyl alcohol (250uL); dar vortex no más de 10 seg. y centrifugar a 15 minutos a 12000 RPM.
19. Recuperar el sobrenadante (400uL) y pasarlo a otro tubo eppendorff rotulado y agregar un volumen = de cloroformo, dar vortex por 10 segundos y centrifugar por 2 minutos a 12000 RPM (para limpiar el ADN)
20. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a otro tubo eppendorff rotulado y añadir (300ul) de Isopropanol (helado), invertir la muestra suavemente hasta que la medusa del ADN se observe.
21. Centrifugar el tubo de Eppendorff por 2 minutos a 10000 RPM.
22. Retirar el sobrante tener cuidado de no llevarse la medusa de DNA y añadir (500ul) de etanol a 70% (helado)
23. Centrifugar el tubo de Eppendorff por 2 minutos de 10000 RPM y descartar el sobrante, teniendo cuidado de no perder la medusa de ADN
24. Dejar evaporar el etanol a temperatura ambiente o baño de maría seco a 37° por 1 hora, resuspender la medusa en TE (100uL-150UI), por 15 min a 56°C o 30 min a 37°C
25. Verificar la concentración y pureza del DNA, en un gel de agarosa al 1% guardar el DNA a -20°C

ANEXO 2 Protocolo de Cuantificación de ADN

1. Conectar el NanoDrop 2000 con el equipo
2. Elegir la opción de Cuantificación de Ácidos Nucleicos
3. Utilizar 1 micropipeta y le agregamos agua 1ul en el NanoDrop 2000 (para limpiar)
4. Se limpia y luego se agrega otro 1ul de agua y se aplasta la opción Black
5. Luego medimos el blanco aplastado Measure (Valor del Blanco tiene que salir 0 o -0)
6. Añadimos con una micropipeta un 1ul de la muestra de ADN y verificamos a través del Nanodrop la cuantificación de ácidos nucleicos y el nivel de contaminación
 - a. ► Verificamos que la contaminación se encuentre en el rango permitido (1.5- máximo 2)
 - b. ► Verificamos que la concentración de ácidos nucleicos no sea superior a 700
7. Finalmente se limpia con agua 1ul 2 veces hasta que salga nuevamente valores de (0 a -0)

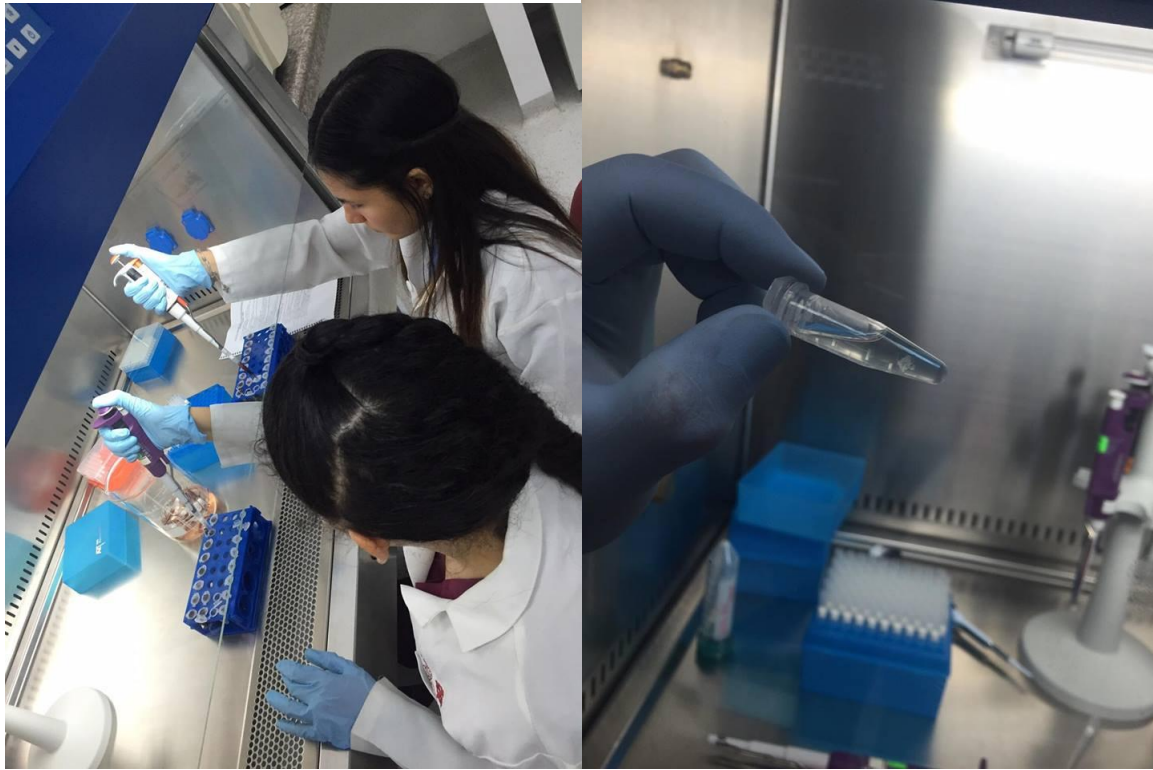
Nota: Los ácidos nucleicos son grandes polímeros formados por la repetición de monómeros denominados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster.

ANEXO 3 Protocolo de PCR en Tiempo Real

1. Mezcla del kit (Fast Star Mix plus) (Agua, Sonda, Mix de reacción)
2. Colocar los capilares en la porta capilares
3. Homogenizamos con la micropipeta la solución realizada del 1er paso
4. Colocamos dicha solución homogenizada en cada capilar (7.5ul de Fast Star Mix plus)
5. Homogenizamos cada muestra de ADN
6. Con la micropipeta colocamos 5ul de ADN en cada capilar
7. Colocamos cada capilar en la centrifuga por 10sg (para que todo lo que este en los bordes del capilar se quede en la parte de abajo- 10sg para mantener la estabilidad de la taq polimeraza)
8. Colocamos cada muestra del capilar en el termociclador (light cycler) para así cumplir con los 3 ciclos del PCR en tiempo real (Desnaturalización, Hibridación y Extensión) para asi leer los resultados de cada muestra
9. Hacemos un autorreconocimiento del termociclador, que es para conectarse con el software del equipo (se reconocen mutuamente)
10. Colocamos las muestras al equipo (204 muestras)
11. Analizamos la amplificación de las muestras y observamos los resultados

Nota: Técnica utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN)

ANEXO 4 Extracción de ADN en Sangre Periférica.



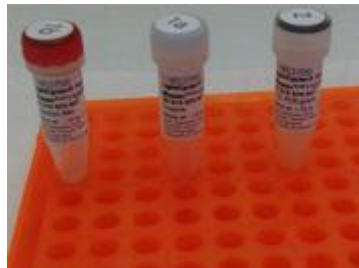
ANEXO 5 Proceso de Cuantificación de Ácidos Nucleicos.



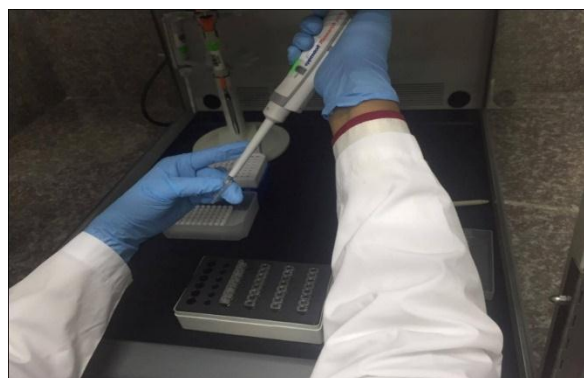
ANEXO 6 Proceso de PCR en Tiempo Real y Amplificación.



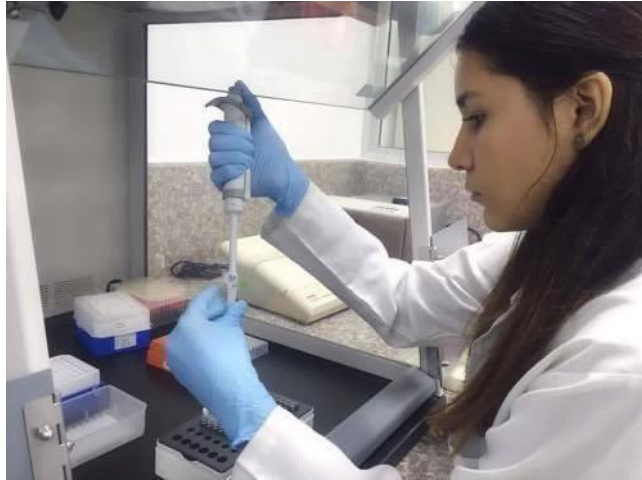
ANEXO 7 Reactivos: FastStart DNA Master, H2O, Reagent Mix.



ANEXO 8 Preparación de los reactivos.



ANEXO 9 Preparación del mix más las muestras previo a la amplificación.

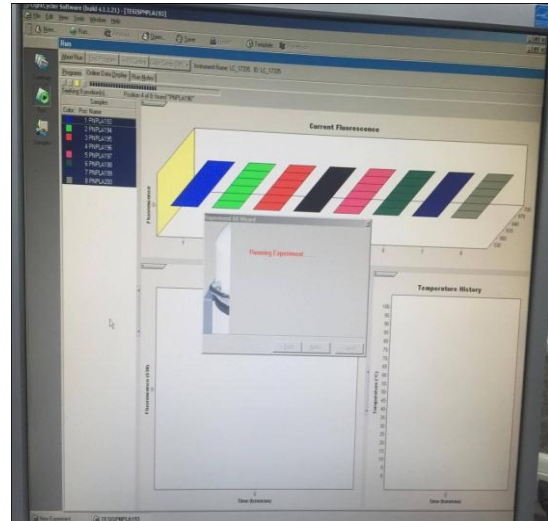
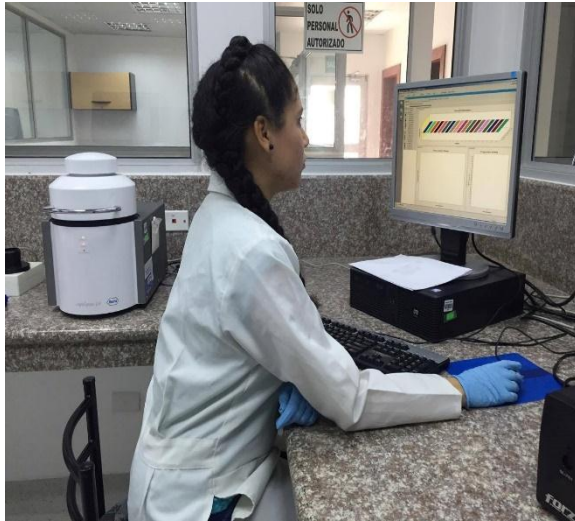


ANEXO 10 Proceso de amplificación mediante el LightCycler.



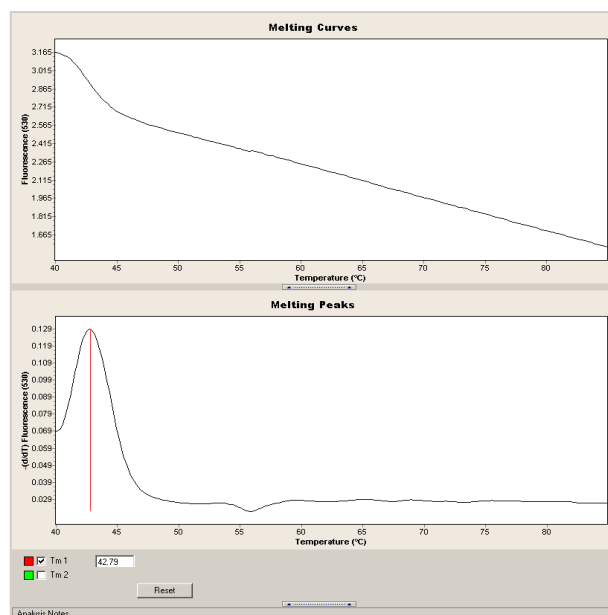
El LightCycler es un equipo que nos permite monitorear la amplificación de la muestra en forma de PCR en tiempo real.

ANEXO 11 Visualización del procedimiento del PCR en tiempo real.



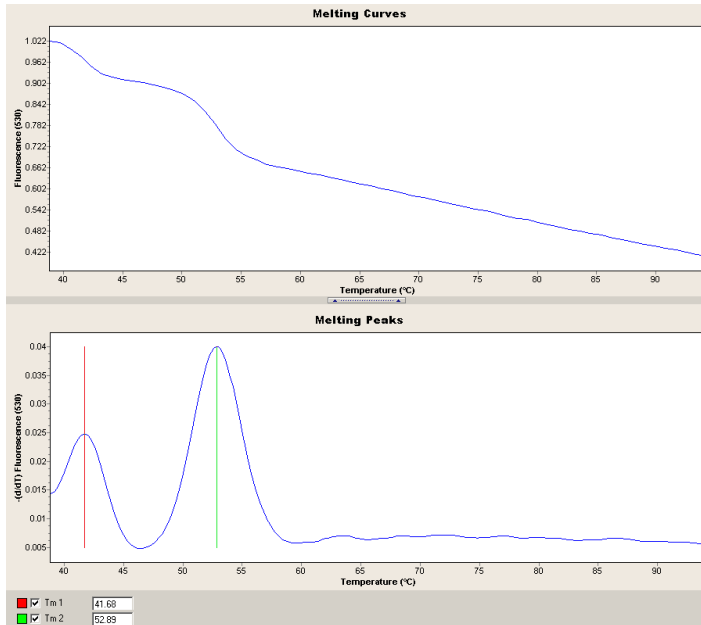
Software especial donde se visualiza el procedimiento del PCR en tiempo real.

ANEXO 12 Análisis De La Amplificación.



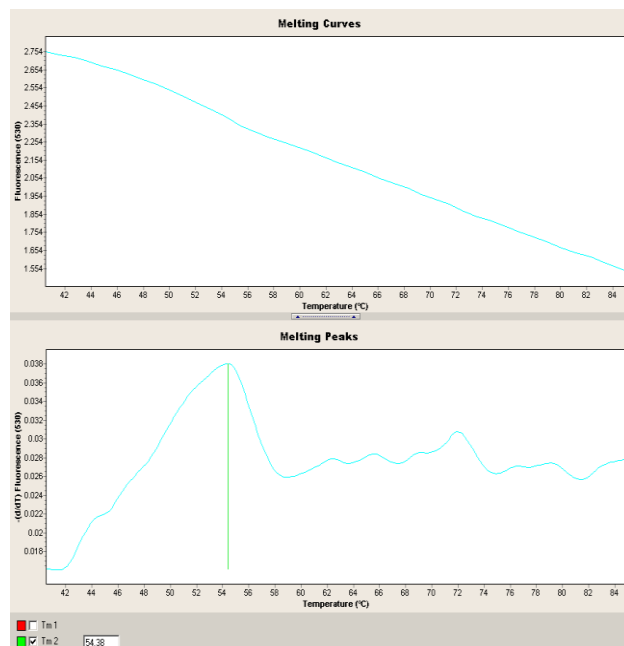
Se observa el alelo CC Homocigoto con una temperatura \pm 42.79°

ANEXO 13 Curva de Melting con el alelo CG Heterocigoto.



Se observa el alelo CG Heterocigoto con una temperatura que varía entre $\pm 11^\circ$ (41. 68 $^\circ$ - 52. 89 $^\circ$)

ANEXO 14 Curva de Melting con el alelo GG Homocigoto.



Se observa el alelo GG Homocigoto con una temperatura $\pm 54.38^\circ$



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Nosotras, **Drouet Macías, Keila Sarai** con C.C: # 0931271670 Y **Leon Peralta, Andrea Estefanía** con C.C: #0941575979 autor/a del trabajo de titulación: **Polimorfismo del Gen PNPLA3 en la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico en Estudiantes de la UCSG, 2016**, previo a la obtención del título de **Licenciado en Nutrición, Dietética y Estética** en la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

1.- Declaramos tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las instituciones de educación superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de titulación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizamos a la SENESCYT a tener una copia del referido trabajo de titulación, con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Guayaquil, 16 de marzo del 2017

AUTORAS:

Drouet Macías, Keila Sarai

Leon Peralta, Andrea Estefanía



REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA Y SUBTEMA:	Polimorfismo del Gen PNPLA3 en la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico en Estudiantes de la UCSG, 2016		
AUTOR(ES)	Keila Sarai Drouet Macías y Andrea Estefanía Leon Peralta		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES)	Gustavo Saúl Escobar Valdivieso		
INSTITUCIÓN:	Universidad Católica de Santiago de Guayaquil		
FACULTAD:	Ciencias Médicas		
CARRERA:	Nutrición, Dietética y Estética		
TÍTULO OBTENIDO:	Licenciado en Nutrición, Dietética y Estética		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	16 de marzo del 2017	No. DE PÁGINAS:	(96 páginas)
ÁREAS TEMÁTICAS:	Nutrición, Genética, Hígado Graso no Alcohólico.		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	POLIMORFISMO; PNPLA3; HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO; GENÉTICA; GENOTIPO; ALTERACIÓN LIPÍDICA.		
RESUMEN/ABSTRACT (150-250 palabras):			
<p>Introducción. El hígado graso no alcohólico (EHGNA) se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos del parénquima hepático. Objetivo. Determinar la presencia del polimorfismo del gen PNPLA3 en la EHGNA en estudiantes de la Universidad Católica Santiago de Guayaquil, año 2016. Metodología. El presente trabajo de titulación es tipo descriptivo, no experimental de corte trasversal con un enfoque cuantitativo, se basó en el análisis del material genético de las muestras crio-conservadas de estudiantes con hígado graso no alcohólico. Resultados. De acuerdo a la presencia del hígado graso no alcohólico un 54% de la población de estudio no presenta hígado graso a diferencia del 46% de los cuales un 60,64% estuvo presente en el sexo femenino, el genotipo mutado estuvo presente en un 15,95% de las muestras con alteraciones lipídicas y un 22,52% con alteraciones no lipídicas, en relación a las variables de estudio hígado graso no alcohólico y el polimorfismo del gen PNPLA3 el genotipo mutado GG y el genotipo premutado CG, no existe una asociación debido que el valor correspondiente a la significancia para el genotipo GG (mutado) es $p=0,23$ y el genotipo heterocigoto CG (premutado) es $p=0,19$; por lo tanto se demuestra que ambas variables son consideradas independientes en este estudio con el número de muestra analizadas. Conclusión. En consideración tampoco se podría descartar la asociación del polimorfismo del gen PNPLA3 debido a que una mutación en una población determinada donde el número de muestras analizadas es inferior al número estimado.</p>			
ADJUNTO PDF:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: +593 999204215 042364380	E-mail: keiladrouet@hotmail.com E-mail: aslp.93_aerdn@hotmail.com	
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN (COORDINADOR DEL PROCESO UTE):	Álvarez Córdova Ludwig Roberto Teléfono: +593-(0994130303) / 2220695 E-mail: drludwigalvarez@gmail.com		
SECCIÓN PARA USO DE BIBLIOTECA			
Nº. DE REGISTRO (en base a datos):			
Nº. DE CLASIFICACIÓN:			
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):			